

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE MATEMÁTICA, ESTATÍSTICA E COMPUTAÇÃO CIENTÍFICA
DEPARTAMENTO DE ESTATÍSTICA

**Métodos Estatísticos Aplicados em Estudos de
Bioequivalência Média**

Rogério Antonio de Oliveira

Profa. Dra. Cicília Yuko Wada

Orientadora

Dissertação apresentada junto ao Departamento de Estatística do Instituto de Matemática Estatística e Computação Científica da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Estatística.

Campinas

2003

Métodos Estatísticos Aplicados em Estudos de Bioequivalência Média

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação devidamente corrigida e defendida por Rogério Antonio de Oliveira e aprovada pela comissão julgadora.

Campinas, 2 de outubro de 2003.

Profa. Dra. Cicília Yuko Wada
Orientadora

Banca Examinadora:

1. Profa. Dra. Cicília Yuko Wada - Orientadora-IMECC/UNICAMP
2. Prof. Dr. Mário Hissamitsu Tarumoto-FCT/UNESP
3. Prof. Dr. Reinaldo Charnet-IMECC/UNICAMP

Dissertação apresentada ao Instituto de Matemática Estatística e Computação Científica, UNICAMP, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE em ESTATÍSTICA.

Resumo

A biodisponibilidade de uma droga é definida como a taxa e a extensão em que o princípio ativo é absorvido e torna-se disponível no sítio de ação da droga. Portanto, duas formulações de uma mesma droga, ou duas drogas diferentes, são bioequivalentes se suas biodisponibilidades não apresentam diferenças significativas, segundo limites clinicamente especificados. Tais limites são denominados de limites de bioequivalência.

Os estudos de bioequivalência são realizados mediante a administração de duas formulações: Teste T e Referência R , em um número de voluntários, geralmente usando-se um planejamento experimental *crossover*. Após a retirada de amostras sanguíneas, ao longo do tempo, examina-se as concentrações do fármaco para estudar as medidas farmacocinéticas: Área Sob a Curva da concentração sanguínea versus tempo (ASC), a Concentração máxima (C_{max}) e o Tempo em que a concentração máxima ocorre (t_{max}).

O objetivo deste trabalho é apresentar uma revisão de alguns métodos paramétricos e não-paramétricos aplicados em estudos de bioequivalência média para experimentos *crossover* de duas formulações. Para os métodos paramétricos, aborda-se a análise de bioequivalência, considerando-se a medida farmacocinética nas escalas original e logarítmica. Ainda, o poder do teste de Schuirmann é estudado, utilizando-se a integração numérica da distribuição t bivariada não-central e também através de um estudo de simulação paramétrica. Baseando-se neste teste, apresenta-se um estudo do tamanho de amostra aproximado para a realização de um experimento *crossover*, considerando-se a medida farmacocinética com e sem transformação logarítmica. Um exemplo com dados reais é utilizado para ilustrar como se realiza uma análise de bioequivalência média.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IMECC DA UNICAMP.

OL4m	Oliveira, Rogério Antonio de . Métodos Estatísticos Aplicados em Estudos de Bioequivalência Média / Rogério Antonio de Oliveira – Campinas, [SP:s.n.], 2003. Orientadora: Cicília Yuko Wada. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Matemática, Estatística e Computação Científica. 1. Planejamento experimental. 2. Bioestatística. 3. Testes de hipóteses (Estatística). I. Wada, Cicília Yuko. II. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Matemática, Estatística e Computação Científica. III. Título
------	---

Abstract

The bioavailability of a drug is defined as the rate and extent to which the active drug ingredient is absorbed and becomes available at the site of drug action. Hence two different drugs or formulations of the same drug are bioequivalent if their bioavailabilities do not show a significant difference, according to clinically important limits. In a bioequivalence study, these limits are called bioequivalence limits.

Bioequivalence studies are run by administering the two formulations (Test formulation T and Reference formulation R) to a number of subjects, usually according to a randomized crossover design. Then blood samples are taken at regular intervals and the concentration by time measurements are analysed at laboratory. The blood concentration-time curves are studied by means of several pharmacokinetic parameters such as area under the curve (ASC), maximum concentration (C_{max}) e time to achieve maximum concentration (t_{max}).

The aim of this work is to present a review of the current statistical methods, including parametric methods on the original e logarithmic scales and nonparametric methods for assessment of average bioequivalence. The power of the Schuirmann's test is calculated by numerical integration of a bivariate noncentral t distribution and conducting a simulation study. An approximate sample size for a crossover design based on the Schuirmann's test are present on the original and logarithmic scales. An example is used to illustrate how to study the average bioequivalence.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter sempre me proporcionado forças nos momentos que precisei, permitindo que eu tivesse acesso a chave do conhecimento.

Agradeço a minha família por estar ao meu lado em todos os momentos, incentivando-me a seguir sempre em frente. Especialmente, a minha mãe Elisabete por fazer de tudo para minimizar as dificuldades encontradas durante essa longa caminhada.

Agradeço a Profa. Dra. Cícilia Yuko Wada pelos seus ensinamentos e por ter me ajudado a vencer mais essa etapa da minha vida.

Agradeço aos Professores Mário Tarumoto, Reinaldo Charnet por contribuírem na conclusão deste trabalho.

Agradeço também a todos os professores do IMECC que colaboraram para a minha formação, especialmente, a Profa. Nancy e aos Professores Hotta e Hervé. Agradeço a Profa. Hildete por ter me ajudado a conseguir uma bolsa de iniciação científica da FAPESP, durante a minha graduação.

Agradeço a todos os meus amigos que me acompanharam durante essa caminhada da minha vida, principalmente, a Graciella, Rosemeire, Ana Cláudia, Paula, Rossana, Raquel e Roberta. Agradeço também aos meus colegas de curso: Cézar, Benilton e aqueles que colaboraram com algumas dicas para as resoluções dos meus problemas computacionais.

Agradeço aos funcionários do IMECC que sempre me auxiliaram nas minhas atividades, especialmente, os funcionários da secretaria de pós-graduação: Tânia e Cidinha, que me ajudaram com as muitas dúvidas burocráticas. Agradeço aos funcionários da BIMECC, principalmente a Cláudia, por sua atenção nos momentos que precisei e também pelos momentos de descontração, e ao Reginaldo, por ter me ajudado a conseguir algumas referências bibliográficas.

Agradeço ao CNPq por ter me concedido a bolsa para a execução deste trabalho.

Muito obrigado,
Rogério Antonio de Oliveira.

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Medidas Farmacocinéticas	3
1.1.1	Área Sob a Curva (ASC): Métodos de Estimação	3
1.1.2	Outras Medidas Farmacocinéticas	15
2	Planejamento Experimental para Estudos de Biodisponibilidade	18
2.1	Princípios Básicos de um Planejamento Experimental	20
2.1.1	Replicação	20
2.1.2	Blocagem	20
2.1.3	Aleatorização	21
2.1.4	Coleta dos Dados Longitudinais do Experimento	25
2.2	Planejamento Experimental <i>Crossover</i>	26
2.2.1	Modelo Estatístico e Contrastes Lineares	27
2.2.2	Delineamento Experimental <i>Crossover</i> de Duas Formulações para Bioequivalência Média	28
2.2.3	Delineamento Experimental <i>Crossover</i> 4 x 2, 2 x 3, 2 x 4 e 4 x 4.	30
2.2.4	Planejamento Experimental <i>Crossover</i> com Três ou Mais Formulações	36
2.2.5	Planejamento Experimental Balanceado em Blocos Incompleto	39
2.3	Planejamento de Experimento Paralelo	41
2.4	Tamanho de Amostra para um Estudo de Bioequivalência	42
3	Inferências para os Efeitos dos Modelos dos Experimentos <i>Crossover</i> para Duas Formulações R e T	43
3.1	Planejamento Experimental <i>Crossover</i> 2 x 2	43
3.1.1	Análise Gráfica	44
3.1.2	Análise Paramétrica	47
3.1.3	Análise de Variância	53
3.1.4	Análise Não-paramétrica	56
3.1.5	Análise Estatística na Presença do Efeito de <i>Carry-over</i> Significativo	58

3.1.6	Exemplo Ilustrativo dos Métodos Paramétricos e Não-paramétricos	60
3.2	Experimentos <i>Crossover</i> de Ordem Superior para Duas Formulações	67
3.2.1	Experimento <i>Crossover</i> 4 x 2	68
3.2.2	Experimento <i>Crossover</i> 2 x 3	70
3.2.3	Experimento <i>Crossover</i> 2 x 4	73
3.2.4	Experimento <i>Crossover</i> 4 x 4	75
3.2.5	Exemplo Ilustrativo	77
3.3	Medida Farmacocinética na Escala Logarítmica	80
3.3.1	Estimador de Máxima Verossimilhança	81
3.3.2	Estimador de Média das Formulações	82
3.3.3	Exemplo Ilustrativo	84
4	Métodos Estatísticos para Bioequivalência Média	86
4.1	Introdução	86
4.2	Limites de Bioequivalência Média	86
4.2.1	Medidas Farmacocinéticas em Escala Original	86
4.2.2	Medida Farmacocinética em Escala Logarítmica	87
4.3	Intervalo de Confiança	88
4.3.1	Intervalo de Confiança Clássico	88
4.3.2	Intervalo de Confiança Simétrico de Westlake	91
4.3.3	Intervalo de Confiança de Locke	92
4.4	Testes de Hipóteses Intervalares	96
4.4.1	Os Dois Testes t Unilaterais de Schuirmann	97
4.4.2	Teste Paramétrico de Anderson e Hauck	99
4.5	Aplicação dos Métodos Paramétricos	102
4.6	Métodos Não-Paramétricos	104
4.6.1	Teste de Hipóteses de Wilcoxon-Mann-Whitney	104
4.6.2	Intervalo de Confiança Não-Paramétrico	106
4.6.3	Intervalo de Confiança Bootstrap	108
4.7	Aplicação dos Métodos não-paramétricos	110
4.8	Poder do Teste	113
4.8.1	Método da Integração Numérica	113
4.8.2	Método do Poder Empírico	115
4.8.3	Exemplo Ilustrativo	118
4.9	Tamanho de Amostra de um Experimento <i>Crossover</i>	121
5	Aplicação dos Métodos Estatísticos na Análise de Bioequivalência Média	125
5.1	Apresentação dos Dados e Análise da Medida C_{max}	125
6	Conclusão	136

7	Apêndice de Programas	137
8	Bibliografia	172

Lista de Figuras

1.1.1 Aproximação da Curva da Função Densidade Normal $N(15, 25)$ através do Método Interpolação Linear, o da Suavização por <i>Splines</i> Cúbicas para as Amplitudes Intervales iguais a 2, 5 e 3, 5.	8
1.1.2 Ilustração Gráfica dos Dados de Concentração de Primidone da Tabela 1.1.3.	9
3.1.1 Valores Observados dos Indivíduos, na Seqüência 1(RT).	45
3.1.2 Valores Observados dos Indivíduos, na Seqüência 2(TR).	45
3.1.3 Alguns Possíveis Gráficos para as Médias das Formulações R e T , por Período. . . .	46
3.1.4 Valores Observados da ASC dos Indivíduos na Seqüência 1(RT).	61
3.1.5 Valores Observados da ASC dos Indivíduos na Seqüência 2(TR).	61
3.1.6 Médias Amostras das Formulações R e T por Período.	64
3.2.7 Médias Amostras de Seqüência por Período das Formulações R e T	77
5.1.1 Curva de Concentração Plasmática Média das Formulações R e T dos 28 Voluntários.	129
5.1.2 Médias Amostras de C_{max} de R e T nos Períodos 1 e 2.	129

Lista de Tabelas

1.1.1 Estimativas Intervalares da ASC da Função Densidade Normal (15, 25) para as Amplitudes Intervalares iguais a 2, 5 e 3, 5.	7
1.1.2 Estimativas da ASC da Função Densidade Normal (15, 25) para Diferentes Amplitudes Intervalares.	8
1.1.3 Estimativas da ASC_{32} obtidas pelo Método Trapezoidal e da Suavização por <i>Splines</i> Cúbicas.	10
1.1.4 Estimativas da ASC_{32} obtidas pelos Métodos Trapezoidal e o das <i>Splines</i> Cúbicas considerando o Caso 1.	11
1.1.5 Estimativas da ASC_{32} obtidas pelos Métodos Trapezoidal e o das <i>Splines</i> Cúbicas considerando o Caso 2.	12
1.1.6 Estimativas da ASC_{24} obtidas pelos Métodos Trapezoidal e o das <i>Splines</i> Cúbicas considerando o Caso 3.	13
1.1.7 Estimativas da ASC_{48} obtidas pelos Métodos Trapezoidal e o das <i>Splines</i> Cúbicas considerando a última concentração não quantificável.	14
1.1.8 Estimativas da ASC_{32} e ASC_{∞} obtidas pelo Método Trapezoidal e das <i>Splines</i> Cúbicas.	17
2.1.1 Alocação Aleatória Simples de 24 voluntários de um Experimento composto por Dois Tratamentos R e T	23
2.2.2 Respostas do i -ésimo indivíduo em um Planejamento Experimental <i>Crossover</i> 2 x 2.	28
2.2.3 Planejamentos Experimentais <i>Crossover</i> para Duas Formulações: Referência R e Teste T	32
2.2.4 Valores das Médias das Sequências por Período para o Planejamento Experimental de Balaam.	33
2.2.5 Valores das Médias das Sequências por Período para o Planejamento Experimental <i>Crossover</i> 2 x 3.	33
2.2.6 Valores das Médias das Sequências por Período para o Planejamento Experimental <i>Crossover</i> 4 x 4.	34
2.2.7 Valores das Médias das Sequência por Períodos para o Planejamento Experimental <i>Crossover</i> 2 x 4.	35
2.2.8 Quadrado Latino para Três Formulações.	37

2.2.9 Delineamento Experimental de Williams para Quatro Formulações	38
2.2.10 Delineamento Experimental de Williams para Três Formulações	39
2.2.11 Planejamento Experimental Balanceado em Blocos Incompleto para 4 Formulações e 3 Períodos.	40
2.2.12 Planejamento Experimental Balanceado em Blocos Incompleto para 5 Formulações e 4 Períodos.	41
3.1.1 Tabela de Análise de Variância do modelo em(3.1.1) de um Delineamento Experi- mental <i>Crossover</i> 2 x 2.	55
3.1.2 <i>ASC</i> para as Formulações Teste <i>T</i> e Referência <i>R</i>	62
3.1.3 Médias Amostrais para as Formulações Teste e Referência nos Períodos 1 e 2 de um Planejamento Experimental <i>Crossover</i>	63
3.1.4 Os Totais e as Diferenças Individuais dos Dados da Tabela 3.1.2.	63
3.1.5 Inferências Estatísticas dos Efeitos Fixos do modelo em(3.1.1).	65
3.1.6 Análise de Variância para <i>ASC</i> em escala original da Tabela 3.1.2.	65
3.1.7 Análise de Variância para <i>ASC</i> em escala logarítmica	66
3.2.8 Graus de Liberdade da tabela ANOVA para um experimento de Balaam.	68
3.2.9 Graus de Liberdade da tabela ANOVA para um experimento <i>crossover</i> 2 x 3.	71
3.2.10 Graus de Liberdade da tabela ANOVA para um experimento <i>crossover</i> 2 x 4.	73
3.2.11 Graus de Liberdade da tabela ANOVA para um experimento <i>crossover</i> 4 x 4.	76
3.2.12 Dados de C_{max} e Constrastes Intraindivíduos.	78
3.2.13 Médias de Sequência por Período da Tabela 3.2.12	78
3.2.14 Análise dos Efeitos Fixos do Modelo do Experimento <i>Crossover</i> 2 x 3.	79
3.3.15 Médias e Medianas de X_{ijk} por sequência e período.	81
4.3.1 Probabilidade de Cobertura do Intervalo de Confiança de 90% para $\mu_T - \mu_R$ conter o verdadeiro valor para a diferença de médias e estar dentro dos Limites de Bioequi- valência $(-0, 2\mu_R; 0, 2\mu_R)$	90
4.4.2 Relação entre os Erros de Tipo <i>I</i> e <i>II</i> em Estudos de Bioequivalência.	96
4.5.3 Médias de <i>ASC</i> das Formulações Teste <i>T</i> e Referência <i>R</i> da Tabela 3.1.2.	102
4.5.4 Intervalos de Confiança de 90% para $\mu_T - \mu_R$ e μ_T/μ_R de ASC_t das formulações <i>R</i> e <i>T</i>	102
4.5.5 Hipóteses de Bioequivalência para a Medida Farmacocinética nas Escalas Original e Logarítmica.	103
4.5.6 Resultados do Teste de Schuirmann para a <i>ASC</i> da Tabela 3.1.2.	103
4.5.7 Resultados do Teste de Anderson-Hauck para a <i>ASC</i> da Tabela 3.1.2.	103
4.6.8 Valores de $w_{(0,05)}$ para a Construção de Intervalos de Confiança Não-paramétricos	

de 90% para $\mu_T - \mu_R$ e Coeficiente de Confiança do Intervalo Não-paramétrico para tamanhos amostrais $n_1 + n_2$, que variam de 6 a 24.	108
4.7.9 Valores e Postos das estimativas de b_{infik} e b_{supik} , para os Dados de <i>ASC</i> da Tabela 3.1.2.	110
4.7.10 Diferenças dos períodos d_{ik} para os dados da Tabela 3.1.2.	111
4.8.11 Poder dos Testes Paramétricos de Schuirman e de Anderson-Hauck e do teste Não-Paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney para alguns valores de <i>CV</i>	120
5.1.1 Concentrações Plasmáticas (<i>ng/ml</i>) ao longo do tempo (horas) correspondentes à formulação Referência <i>R</i>	126
5.1.2 Concentrações Plasmáticas (<i>ng/ml</i>) ao longo do tempo (horas) correspondentes à formulação Teste <i>T</i>	126
5.1.3 Estatísticas Sumárias das Concentrações Plasmáticas (<i>ng/ml</i>) ao longo do tempo (hs) da Formulação Referência.	127
5.1.4 Estatísticas Sumárias das Concentrações Plasmáticas (<i>ng/ml</i>) ao longo do tempo (hs) da Formulação Teste.	127
5.1.5 Medidas Farmacocinéticas dos 28 Voluntários para as Formulações <i>R</i> e <i>T</i>	128
5.1.6 Estatísticas Básicas das Medidas Farmacocinéticas das Formulações <i>R</i> e <i>T</i>	130
5.1.7 Médias Amostrais da C_{max} para as Formulações Teste e Referência nas Sequências 1 e 2 e nos Períodos 1 e 2.	130
5.1.8 Análise de Variância para C_{max} em Escala Original.	131
5.1.9 Análise de Variância para C_{max} em Escala Logarítmica.	131
5.1.10 Análise Não-paramétrica dos Efeitos Fixos do modelo em (3.1.1).	132
5.1.11 Médias de C_{max} das Formulações Teste <i>T</i> e Referência <i>R</i>	132
5.1.12 Intervalos de Confiança de 90% para $\mu_T - \mu_R$ e μ_T/μ_R de C_{max} das formulações <i>R</i> e <i>T</i>	133
5.1.13 Hipóteses de Bioequivalência para a Medida Farmacocinética nas Escalas Original e Logarítmica.	133
5.1.14 Estimativas da Variância e do Vício dos Estimadores $\hat{\delta}_{NVMV}$, $\hat{\delta}_{MV}$ e $\hat{\delta}_{RM}$	134
5.1.15 Resultados do Teste de Schuirman para a C_{max}	135
5.1.16 Resultados do Teste de Anderson-Hauck para a C_{max}	135
5.1.17 Resultados do Teste de Não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney para a C_{max}	135

Métodos Estatísticos Aplicados em Estudos de Bioequivalência Média

Capítulo 1

Introdução

O surgimento dos medicamentos genéricos no mercado brasileiro aumentou a atenção para os estudos de biodisponibilidade/bioequivalência, cujo objetivo é avaliar a bioequivalência de formulações genéricas e de formulações de medicamentos já existentes no mercado.

O estudo de bioequivalência consiste em avaliar a equivalência biológica através da biodisponibilidade, que é representada pela taxa e extensão de absorção de um princípio ativo na circulação sistêmica. Assim, duas drogas diferentes ou duas formulações de uma determinada droga são consideradas bioequivalentes se apresentam uma mesma ou similar biodisponibilidade segundo limites clinicamente especificados, denominados de limites de bioequivalência. Em geral, a bioequivalência é estudada através de medidas de concentração do fármaco presente em líquidos biológicos, como sangue ou urina, cujas amostras são coletadas ao longo do tempo, sob as mesmas condições experimentais. O experimento consiste da retirada de plasmas sangüíneos ao longo do tempo, em pontos previamente determinados. A partir desses plasmas, as concentrações do fármaco são processadas em laboratório. Algumas medidas farmacocinéticas são obtidas para as formulações Teste T e Referência R , a partir das respectivas curvas de concentrações ao longo do tempo. Basicamente, três medidas são mais freqüentemente estudadas: a área sob a curva da concentração observada *versus* tempo (ASC), a concentração máxima observada (C_{max}) e o seu respectivo tempo (t_{max}). Essas e outras medidas de biodisponibilidade, utilizadas em estudos de bioequivalência de medicamentos, serão abordadas na próxima seção.

Devido a grande variabilidade metabólica presente nos indivíduos em estudos de biodisponibilidade/ bioequivalência, os experimentos *crossover* são geralmente recomendados. Estes delineamentos experimentais apresentam grandes vantagens, em termos de precisão estatística e custo, quando são comparados aos demais, pois cada indivíduo serve como seu próprio controle. O planejamento experimental *crossover* mais simples é o 2×2 , que é composto por dois tratamentos, um Teste T e um Referência R , dois períodos e duas seqüências, RT e TR . Alguns delineamentos experimentais

crossover, empregados em estudos de bioequivalência, serão brevemente apresentados no Capítulo 2. Um enfoque à análise de um experimento *crossover* 2 x 2 é dado no Capítulo 3.

Nos Estados Unidos, para a obtenção do registro junto ao órgão federal de controle de medicamentos e alimentos, a *Food and Drug Administration (FDA)*, os laboratórios farmacêuticos precisam comprovar, através de métodos laboratoriais e estatísticos, que a formulação testada T é bioequivalente a um determinado medicamento original R , previamente aprovado. O *Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*, em 2001, regulamentou como os novos produtos farmacêuticos e versões genéricas devem ser avaliados para comprovarem sua bioequivalência a medicamentos já aprovados e disponíveis no mercado.

No Brasil, com o início de pesquisas farmacêuticas com formulações genéricas, a preocupação do governo em regulamentar tais medicamentos aumentou, o que resultou na publicação do Decreto n° . 793, de abril de 1993. Com este decreto, o governo apontou algumas diretrizes para o controle e a aprovação dos medicamentos genéricos de interesse no mercado nacional. Com a Lei n° . 9782, de 26 de janeiro de 1999, o governo brasileiro instituiu a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a *ANVISA*, cuja função na área de medicamentos é aprovar, registrar, controlar e inspecionar a produção, a comercialização e o uso dos medicamentos no Brasil. A falta de uma política específica para medicamentos farmacêuticos e a inexistência de uma lei de patentes, até 1996, foram as principais causas da existência da multiplicidade de medicamentos que continham o mesmo fármaco, porém estavam sendo comercializados por laboratórios diferentes. Para sanar tais problemas, foi instituída a Lei da Política Nacional de Medicamentos Genéricos, a Lei n° 9.787, de 11 de fevereiro de 1999, que regulamenta a produção, comercialização, prescrição e uso de medicamentos genéricos. Os laboratórios farmacêuticos interessados em obterem o registro do medicamento genérico junto à *ANVISA* devem seguir os procedimentos apresentados nas Resoluções de n° s 896 e 898, de 29 de maio de 2003 e na Lei n° 9.787, de 10 de fevereiro de 1999, que estabeleceram as bases legais para a instituição do medicamento genérico no país.

O objetivo de um estudo de bioequivalência é verificar se as biodisponibilidades das formulações Teste T e Referência R são equivalentes, segundo limites de bioequivalência clinicamente aceitos. Existem três tipos de bioequivalências: a bioequivalência média, a populacional e a individual. Atualmente, a bioequivalência média é a mais empregada em estudos de bioequivalência para a aprovação e a obtenção do registro de medicamentos junto à agência reguladora. A bioequivalência média se restringe apenas a comparar as médias populacionais da medida farmacocinética de interesse das formulações Teste T e Referência R . No entanto, devido a dificuldade em assegurar a intercambialidade das formulações para cada indivíduo, alguns métodos de bioequivalência populacional e individual estão sendo recentemente estudados. Estes métodos de bioequivalência realizam a comparação das médias e das variâncias da medida de biodisponibilidade das formulações R e T . A bioequivalência populacional analisa basicamente as distribuições das medidas farmacocinéticas

das formulações R e T . A bioequivalência individual estuda a variabilidade intra-indivíduos das formulações R e T e a interação entre estas formulações, que são testadas para cada indivíduo. Neste trabalho, são apenas abordados, no Capítulo 4, os principais métodos estatísticos aplicados a estudos de bioequivalência média. No Capítulo 5, é apresentado uma aplicação dos métodos estatísticos na avaliação da bioequivalência média de duas formulações da droga Furosemida.

1.1 Medidas Farmacocinéticas

Em estudos comparativos de biodisponibilidade, para quantificar a extensão e a taxa de absorção de uma determinada droga, são utilizadas algumas medidas de interesse, denominadas medidas farmacocinéticas. Estas medidas são representadas pela área sob a curva da concentração *versus* tempo (ASC), pela concentração máxima (C_{max}) e pelo tempo (t_{max}), correspondente a C_{max} . A estimação destas medidas podem ser obtidas a partir das concentrações observadas do fármaco em algum líquido biológico, por exemplo o sangue, cujas amostras são coletadas ao longo do tempo, após a administração do medicamento em cada voluntário.

1.1.1 Área Sob a Curva (ASC): Métodos de Estimação

A ASC é uma das principais medidas farmacocinéticas, pois permite medir a quantidade de fármaco absorvido pelo corpo e sua eliminação ao longo do tempo. Yeh e Kwan (1978) apresentaram alguns métodos que podem ser utilizados para a estimação da ASC : o método da regra trapezoidal e o da suavização por funções *splines*.

A - Método Trapezoidal

O método trapezoidal emprega a interpolação linear e, portanto a estimativa da ASC pode ser subestimada ou superestimada, dependendo da concavidade da curva e, principalmente, da amplitude dos intervalos. Este método tem sido o mais difundido para a estimação da ASC em estudos de biodisponibilidade devido à sua simplicidade matemática e por estar disponível em pacotes computacionais.

Considere $C_0, C_1, \dots, C_k$ como sendo as concentrações sanguíneas obtidas nos tempos $t_0, t_1, \dots, t_k$, respectivamente. Assim, utilizando-se o método da regra trapezoidal, para cada um dos intervalos, $[t_0, t_1], \dots, [t_{k-1}, t_k]$, emprega-se a interpolação linear para as concentrações observadas, ou seja, ajusta-se uma reta para os pontos (t_{i-1}, C_{i-1}) e (t_i, C_i) , como apresentado a seguir.

$$C = \frac{t_i C_{i-1} - C_i t_{i-1}}{h_i} + \frac{C_i - C_{i-1}}{h_i} t, \quad (1.1.1)$$

onde $t \in [t_{i-1}, t_i]$ e $h_i = t_i - t_{i-1}$.

A integração da reta C em (1.1.1), de t_{i-1} a t_i , fornece a área sob a reta neste intervalo, o que equivale a área dada por um trapézio delimitado pelos pontos (t_{i-1}, C_{i-1}) e (t_i, C_i) . Portanto, a ASC do intervalo $[t_0, t_k]$ (ASC_{t_k}) pode ser estimada através da soma das áreas dos trapézios formados pelos pontos dos intervalos, ou seja, por

$$ASC_{t_k} = \sum_{i=1}^k \left(\frac{C_i + C_{i-1}}{2} \right) (t_i - t_{i-1}). \quad (1.1.2)$$

A estimativa de ASC_{t_k} pode ser obtida através da implementação da expressão (1.1.2), por exemplo, em linguagem *SAS*, utilizando-se *PROC IML* ou *PROC EXPAND*. No Apêndice, estão apresentados os programas para estimar a ASC_{t_k} .

B - Método da Suavização por *Splines* Cúbicas

O método de suavização por funções *Splines*, utilizado para obter uma estimativa da ASC_{t_k} , emprega basicamente a idéia de dividir o intervalo original $[t_0, t_k]$ em subintervalos menores, delimitados pelos tempos amostrais, ou seja, $[t_0, t_1]$, $[t_1, t_2]$, $\dots$, $[t_{k-1}, t_k]$. Para cada um dos intervalos, $[t_i, t_{i+1}]$, $i = 0, 1, \dots, k-1$, ajusta-se uma função polinomial segmentada de ordem m . Estas funções segmentadas são construídas independentemente uma da outra, porém todas são unidas suavemente através dos nós $t_1, t_2, \dots, t_k$, o que garante a continuidade das $m-1$ derivadas em $[t_0, t_k]$.

Para ilustrar a aplicação deste método na estimação da ASC_{t_k} , considere a seguinte função de *spline* cúbica ($m = 3$):

$$s = \theta_0 + \theta_1 t + \theta_2 t^2 + \theta_3 t^3, \quad (1.1.3)$$

onde $t \in [t_{i-1}, t_i]$, $i = 1, 2, \dots, k$ e os coeficientes $\theta_i \in \Re$, $i = 0, 1, 2$ e 3 . A segunda derivada de (1.1.3) resulta na seguinte expressão:

$$s^{(2)} = 2\theta_2 + 6\theta_3 t.$$

Escrevendo a função $s^{(2)}$ para o intervalo $[t_{i-1}, t_i]$, obtém-se como resultado:

$$s^{(2)} = \frac{s_{i-1}^{(2)}}{h_i}(t_i - t) + \frac{s_i^{(2)}}{h_i}(t - t_{i-1}), \quad (1.1.4)$$

onde $h_i = t_i - t_{i-1}$, $i = 1, 2, \dots, k$. Integrando a expressão (1.1.4) em $[t_{i-1}, t_i]$, obtém-se

$$s^{(1)} = \frac{-s_{i-1}^{(2)}}{2h_i}(t_i - t)^2 + \frac{s_i^{(2)}}{2h_i}(t - t_{i-1})^2 + c_1 \quad (1.1.5)$$

$$s = \frac{s_{i-1}^{(2)}}{6h_i}(t_i - t)^3 + \frac{s_i^{(2)}}{6h_i}(t - t_{i-1})^3 + c_1 t + c_2, \quad (1.1.6)$$

onde c_1 e c_2 são constantes resultantes da integração. A partir da expressão (1.1.6), são obtidas as respectivas equações para t_{i-1} e t_i :

$$s_{i-1} = \frac{s_{i-1}^{(2)}}{6h_i}(h_i)^3 + c_1 t_{i-1} + c_2, \quad (1.1.7)$$

$$s_i = \frac{s_i^{(2)}}{6h_i}(h_i)^3 + c_1 t_i + c_2. \quad (1.1.8)$$

A resolução das duas equações (1.1.7) e (1.1.8) fornece os seguintes valores de c_1 e c_2 :

$$c_1 = \frac{1}{h_i}(s_i - s_{i-1}) - \frac{h_i}{6}(s_i^{(2)} - s_{i-1}^{(2)}); \quad c_2 = \frac{1}{h_i}(t_i s_{i-1} - s_i t_{i-1}) - \frac{h_i}{6}(t_i s_{i-1}^{(2)} - s_i^{(2)} t_{i-1}).$$

Os valores das segundas derivadas $s_{i-1}^{(2)}$ e $s_i^{(2)}$ podem ser obtidos, através de (1.1.5). Portanto, tem-se como resultado para os intervalos, $[t_{i-2}, t_{i-1}]$ e $[t_{i-1}, t_i]$, as respectivas equações abaixo:

$$s_{i-1}^{(1)} = \frac{s_{i-1}^{(2)} h_{i-1}}{2} + \frac{(s_{i-1} - s_{i-2})}{h_{i-1}} - h_{i-1} \frac{(s_{i-1}^{(2)} - s_{i-2}^{(2)})}{6}, \quad (1.1.9)$$

$$s_{i-1}^{(1)} = \frac{-s_{i-1}^{(2)} h_i}{2} + \frac{(s_i - s_{i-1})}{h_i} - h_i \frac{(s_i^{(2)} - s_{i-1}^{(2)})}{6}, \quad (1.1.10)$$

onde $h_{i-1} = t_{i-1} - t_{i-2}$. A combinação das equações (1.1.9) e (1.1.10) fornece a expressão:

$$\frac{h_{i-1}}{6} s_{i-2}^{(2)} + \frac{1}{3}(h_i + h_{i-1}) s_{i-1}^{(2)} + \frac{h_i}{6} s_i^{(2)} = \frac{(s_i - s_{i-1})}{h_i} - \frac{(s_{i-1} - s_{i-2})}{h_{i-1}}, \quad (1.1.11)$$

para $i = 3, 4, \dots, k$. As $k - 2$ equações, obtidas a partir de (1.1.11), são utilizadas para a suavização das curvas. No entanto, são necessárias mais duas equações para encontrar a solução do sistema de equações de suavização. Estas duas equações restantes são obtidas através das seguintes condições adicionais para o uso das *Splines* cúbicas: $s_2^{(3)} = s_3^{(3)}$ e $s_{k-1}^{(3)} = s_k^{(3)}$. Os valores da terceira derivada de s para $i = 2, 3, k - 1$ e k são dados, respectivamente, por

$$\begin{aligned} s_2^{(3)} &= \frac{s_2^{(2)} - s_1^{(2)}}{h_2}; \quad s_3^{(3)} = \frac{s_3^{(2)} - s_2^{(2)}}{h_3}; \\ s_{k-1}^{(3)} &= \frac{s_{k-1}^{(2)} - s_{k-2}^{(2)}}{h_{n-1}}; \quad s_k^{(3)} = \frac{s_k^{(2)} - s_{k-1}^{(2)}}{h_k}. \end{aligned}$$

A combinação de $s_2^{(3)}$ e $s_3^{(3)}$ resulta na equação abaixo:

$$\frac{1}{h_2} s_1^{(2)} - \left(\frac{1}{h_2} + \frac{1}{h_3} \right) s_2^{(2)} + \frac{1}{h_3} s_3^{(2)} = 0. \quad (1.1.12)$$

Combinando-se as equações de $s_{k-1}^{(3)}$ e $s_k^{(3)}$, pode-se obter a equação:

$$\frac{1}{h_{k-1}}s_{k-1}^{(2)} - \left(\frac{1}{h_{k-1}} + \frac{1}{h_k} \right) s_{k-1}^{(2)} + \frac{1}{h_k}s_k^{(2)} = 0. \quad (1.1.13)$$

Os valores de $s_i^{(2)}$, $i = 1, 2, \dots, k$, são determinados através da solução do sistema formado pelas k equações, que são dadas por (1.1.11), (1.1.12) e (1.1.13).

Portanto, a estimativa da área sob a curva do intervalo dado por $[t_{i-1}, t_i]$ pode ser calculada através da integração de (1.1.6) em $[t_{i-1} - t_i]$. Então, tem-se que

$$ASC(t_{i-1} - t_1) = \frac{h_i^3}{24}(s_i^{(2)} + s_{i-1}^{(2)}) + h_i[0, 5c_1(t_i + t_{i-1}) + c_2].$$

A estimativa da ASC_{t_k} é dada pela soma das estimativas das áreas sob as curvas dos intervalos $[t_{i-1} - t_i]$ ($ASC(t_{i-1} - t_i)$), $i = 0, 2, \dots, k$, ou seja, através de

$$ASC_{t_k} = \sum_{i=1}^k \frac{h_i^3}{24}(s_i^{(2)} + s_{i-1}^{(2)}) + h_i[0, 5c_1(t_i + t_{i-1}) + c_2]. \quad (1.1.14)$$

A implementação das expressões em (1.1.11), (1.1.12) e (1.1.13) foi realizada em linguagem *SAS*, utilizando o *PROC IML* e o *PROC EXPAND*. Os programas, utilizados para o cálculo da estimativa da ASC_{t_k} , estão apresentados no Apêndice.

C - Ilustração Numérica e Validação dos Programas para o Cálculo da Área sob a Curva.

Exemplo A: Comparação das estimativas da área sob a curva real, trapezoidal e *splines* cúbicas.

Com o objetivo de comparar as estimativas da ASC obtidas pelo método trapezoidal e pela suavização por *Splines* cúbicas, considere a curva da função densidade Normal com média 15 e variância 25, como mostra a Figura 1.1.1. As estimativas da ASC , utilizando-se o método trapezoidal e o das *Splines*, foram encontradas através dos programas apresentados no Apêndice do capítulo. A Tabela 1.1.1 apresenta as áreas intervalares sob as curvas $N(15, 25)$ real, trapezoidal e *splines*, cujos intervalos possuem amplitudes iguais a 2, 5 e 3, 5.

Através dos resultados apresentados na Tabela 1.1.1, observa-se que quanto maior a amplitude dos intervalos, maiores são as diferenças entre os valores das probabilidades e das estimativas da $ASC(t_{i-1} - t_i)$ obtidas pelos dois métodos. No entanto, as melhores estimativas intervalares são obtidas pelo método de suavização por *Splines* cúbicas. Entretanto, devido à soma das estimativas intervalares $ASC(t_{i-1} - t_i)$, as diferenças intervalares observadas em cada método com relação à

Tabela 1.1.1: Estimativas Intervalares da *ASC* da Função Densidade Normal (15, 25) para as Amplitudes Intervalares iguais a 2,5 e 3,5.

Amplitude		Probabilidade	Regra	Diferença	Spline	Diferença
Intervalar	t_i	Teórica	Trapezoidal	da Teórica	Cúbicas	da Teórica
2,5	0	0,00135	-	-	-	-
	0-2,5	0,00486	0,00549	0,00063	0,00490	0,00004
	2,5-5	0,01654	0,01788	0,00134	0,01652	-0,00002
	5-7,5	0,04406	0,04588	0,00182	0,04409	0,00003
	7,5-10	0,09185	0,09287	0,00102	0,09189	0,00004
	10-12,5	0,14988	0,14851	-0,00137	0,14990	0,00002
	12,5-15	0,19146	0,18776	-0,00370	0,19140	-0,00006
	15-17,5	0,19146	0,18775	-0,00371	0,19140	-0,00006
	17,5-20	0,14988	0,14851	-0,00137	0,14990	0,00002
	20-22,5	0,09185	0,09288	0,00103	0,09189	0,00004
	22,5-25	0,04406	0,04587	0,00181	0,04409	0,00003
	25-27,5	0,01654	0,01788	0,00134	0,01652	-0,00002
	27,5-30	0,00486	0,00444	-0,00042	0,00490	0,00004
3,5	0	0,00135	-	-	-	-
	0-3,5	0,00937	0,01147	0,00210	0,00921	-0,00016
	3,5-7	0,04408	0,04873	0,00465	0,04414	0,00006
	7-10,5	0,12926	0,13196	0,00270	0,12962	0,00036
	10,5-14	0,23668	0,23000	-0,00668	0,23654	-0,00014
	14-17,5	0,27072	0,26009	-0,01063	0,27023	-0,00049
	17,5-21	0,19347	0,19119	-0,00228	0,19358	0,00011
	21-24,5	0,08635	0,09093	0,00458	0,08694	0,00059
	24,5-28	0,02406	0,01902	-0,00504	0,02278	-0,00128
	28-31,5	0,02406	0,00870	-0,01536	0,01787	-0,00619

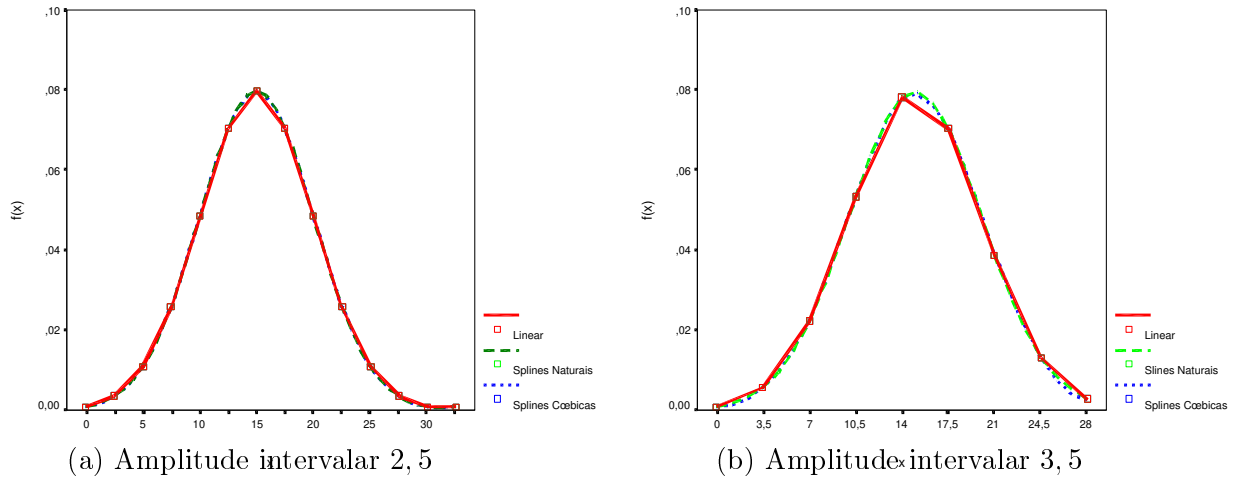


Figura 1.1.1: Aproximação da Curva da Função Densidade Normal $N(15, 25)$ através do Método Interpolação Linear, o da Suavização por *Splines* Cúbicas para as Amplitudes Intervalares iguais a 2,5 e 3,5.

Tabela 1.1.2: Estimativas da *ASC* da Função Densidade Normal $(15, 25)$ para Diferentes Amplitudes Intervalares.

Método	Amplitude do Intervalo						
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5
Regra Trapezoidal	0,99770	0,99797	0,99755	0,99697	0,99677	0,99655	0,99209
Splines Cúbicas	0,99766	0,99776	0,99811	0,99805	0,99778	0,99756	1,00191

verdadeira *ASC* acabam se compensando no cálculo final da estimativa da $ASC(0 - t_k)$. Isto pode ser observado através da Tabela 1.1.2, que apresenta as estimativas da área sob a curva de uma distribuição $N(15, 25)$, para diferentes amplitudes intervalares. Nota-se que as estimativas de *ASC* são bastante próximas, não dependendo do método de estimação empregado.

Exemplo B: Cálculo das estimativas da *ASC* utilizando Dados Completos.

Para ilustrar o emprego dos programas em *SAS*, apresentados no Apêndice, considere como exemplo os dados da Tabela 1.1.3, que foram apresentados por Chow e Liu (2000), página 11 do Capítulo 1. Nesta Tabela, os autores apresentam os dados de concentração sanguínea da droga primidone em *ng/ml*, com coleta de 0 a 32 horas e as respectivas concentrações, além do cálculo da área sob a curva em cada intervalo pelo método trapezoidal.

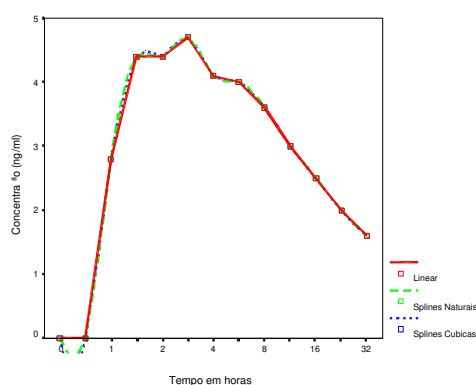


Figura 1.1.2: Ilustração Gráfica dos Dados de Concentração de Primidone da Tabela 1.1.3.

Tabela 1.1.3: Estimativas da ASC_{32} obtidas pelo Método Trapezoidal e da Suavização por *Splines* Cúbicas.

Tempo (hs)	Concentração (ng/ml)	Trapezoidal	Splines Cúbicas
0,0	0,0	-	-
0,5	0,0	0,0000	0,0000
1,0	2,8	0,7000	0,7275
1,5	4,4	1,8000	1,8725
2,0	4,4	2,2000	2,2324
3,0	4,7	4,5500	4,5268
4,0	4,1	4,4000	4,4528
6,0	4,0	8,1000	7,8768
8,0	3,6	7,6000	7,7023
12,0	3,0	13,2000	12,9884
16,0	2,5	11,0000	11,0044
24,0	2,0	18,0000	17,5720
32,0	1,6	14,4000	14,6937
ASC_{32}		85,9500	85,6506

Chow e Liu (2000), página 11 do Cap. 1

Utilizando os dados da Tabela 1.1.3, calculou-se as áreas sob as curvas em cada intervalo, pelos métodos trapezoidal e *Splines* cúbicas. Nota-se que o resultado do método trapezoidal é o mesmo apresentado por Chow e Liu (2000) e o resultado da suavização por *Splines* cúbicas é aproximado à do método trapezoidal.

Exemplo C: Cálculo das Estimativas da ASC utilizando Dados Faltantes.

Na prática, devido a algum erro na execução do experimento ou na transcrição dos dados, podem existir voluntários que possuem algumas concentrações faltantes para alguns tempos experimentais, em que as amostras sanguíneas foram coletas. Essas concentrações faltantes, denominadas também por *missing values*, podem não prejudicar a análise de bioequivalência das formulações, se não existirem muitas e se não ocorrerem próximas ao pico da curva da concentração. Os programas, apresentados no Apêndice, podem calcular as estimativas da ASC , sem qualquer problema, como mostrado em alguns casos a seguir.

Tabela 1.1.4: Estimativas da ASC_{32} obtidas pelos Métodos Trapezoidal e o das *Splines* Cúbicas considerando o Caso 1.

Tempo (hs)	Concentração (ng/ml)	Trapezoidal	Splines Cúbicas
0,0	0,0	-	-
0,5	0,0	0,0000	0,0000
1,0	2,8	0,7000	0,7275
1,5	4,4	1,8000	1,8725
2,0	4,4	2,2000	2,2324
3,0	4,7	4,5500	4,5262
4,0	4,1	4,4000	4,4551
6,0	4,0	8,1000	7,8310
8,0	.	-	-
12,0	3,0	21,0000	22,1252
16,0	2,5	11,0000	10,8031
24,0	2,0	18,0000	17,8950
32,0	1,6	14,4000	14,3716
ASC_{32}		86,1500	86,8397

Caso 1: Considere que não foi possível determinar a concentração no tempo $t = 8$, por exemplo, devido a perda da amostra sanguínea retirada neste tempo experimental, durante o processo de centrifugação. Utilizando os programas do Apêndice, as estimativas da ASC_{32} foram calculadas pelos métodos trapezoidal e das *Splines* cúbicas e os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 1.1.4. Note que as estimativas da ASC , obtidas pelos dois métodos de estimação, para o conjuntos de dados completo e sem a concentração no tempo $t = 8$, possuem estimativas aproximadas.

Tabela 1.1.5: Estimativas da ASC_{32} obtidas pelos Métodos Trapezoidal e o das *Splines* Cúbicas considerando o Caso 2.

tempo (hs)	Concentração (ng/ml)	Trapezoidal	Splines Cúbicas
0,0	0,0	-	-
0,5	0,0	0,0000	0,0000
1,0	2,8	0,7000	0,7275
1,5	4,4	1,8000	1,8725
2,0	4,4	2,2000	2,2324
3,0	4,7	4,5500	4,5260
4,0	4,1	4,4000	4,4580
6,0	4,0	8,1000	7,8162
8,0	.	-	-
12,0	.	-	-
16,0	2,5	32,5000	35,7350
24,0	2,0	18,0000	16,9091
32,0	1,6	14,4000	15,3576
ASC_{32}		86,6500	89,6322

Caso 2: Agora, considere que as concentrações dos tempos experimentais $t = 8$ e $t = 12$ não foram encontradas. As estimativas da área sob a curva para cada um dos intervalos, encontradas através dos programas do Apêndice, estão apresentadas na Tabela 1.1.5.

Tabela 1.1.6: Estimativas da ASC_{24} obtidas pelos Métodos Trapezoidal e o das *Splines* Cúbicas considerando o Caso 3.

Tempo (hs)	Concentração (ng/ml)	Trapezoidal	Splines Cúbicas
0,0	0,0	-	-
0,5	0,0	0,0000	0,0000
1,0	2,8	0,7000	0,7275
1,5	4,4	1,8000	1,8725
2,0	4,4	2,2000	2,2324
3,0	4,7	4,5500	4,5268
4,0	4,1	4,4000	4,4528
6,0	4,0	8,1000	7,8768
8,0	3,6	7,6000	7,7023
12,0	3,0	13,2000	12,9884
16,0	2,5	11,0000	11,0044
24,0	2,0	18,0000	17,5720
32,0	.	-	-
ASC_{24}		71,55	70,3958

Caso 3: Considere que o valor da concentração sanguínea correspondente ao último tempo experimental $t = 32$ não foi analisada, ou seja, é uma concentração faltante. Utilizando os programas para calcular as estimativas da ASC de cada intervalo, obteve-se os resultados apresentados na Tabela 1.1.6. É importante lembrar que neste caso não é possível interpolar a última concentração faltante. Portanto, a falta dessa observação poderá comprometer a estimativa da ASC e, conseqüentemente, o estudo de biodisponibilidade/bioequivalência. Isto pode ser verificado através das estimativas da ASC da Tabela 1.1.3 e da Tabela 1.1.6.

Comparando-se as estimativas da ASC para os três casos, utilizando-se os métodos trapezoidal e *splines*, observa-se que os métodos apresentam uma pequena diferença na estimativa final calculada, devido à interpolação dos dados. Com a Resolução nº 896, de 29 de maio de 2003, a ANVISA regulamentou que não serão aceitos conjuntos de dados com falta de mais de 10% dos valores das concentrações sanguíneas do fármaco, para cada voluntário em um estudo de bioequivalência.

Tabela 1.1.7: Estimativas da ASC_{48} obtidas pelos Métodos Trapezoidal e o das *Splines* Cúbicas considerando a última concentração não quantificável.

Tempo (hs)	Concentração (ng/ml)	Trapezoidal	Splines Cúbicas
0	0,0	-	-
0,5	0,0	0,0000	0,0000
1,0	2,8	0,7000	0,7275
1,5	4,4	1,8000	1,8725
2,0	4,4	2,2000	2,2324
3,0	4,7	4,5500	4,5268
4,0	4,1	4,4000	4,4529
6,0	4,0	8,1000	7,8767
8,0	3,6	7,6000	7,7023
12,0	3,0	13,2000	12,9890
16,0	2,5	11,0000	11,0022
24,0	2,0	18,0000	17,6178
32,0	1,6	14,4000	14,5111
48,0	0	12,8	14,6490
ASC_{48}		98,7500	100,1601

Exemplo D: Cálculo da estimativa da ASC utilizando concentrações não-quantificáveis.

Após as retiradas das amostras sanguíneas em alguns tempos experimentais, estas são processadas em laboratório para determinar a concentração da droga estudada. Quando a concentração for inferior a um determinado limite quantificável conhecido por um profissional, então a concentração da droga é considerada muito pequena e, portanto, denominada de concentração não-quantificável. Isto, geralmente, ocorre nas concentrações das amostras sanguíneas dos últimos tempos experimentais, devido ao processo de eliminação da droga.

Para ilustrar este caso, considere que a concentração do último tempo $t = 48$ é não-quantificável, ou seja, é uma concentração nula. Empregando-se os programas para estimar a área sob a curva de cada intervalo pelos dois métodos, tem-se os resultados apresentados na Tabela 1.1.7.

Baseado nos resultados apresentados pelos programas, pode-se verificar que o *PROC IML* do *SAS* possui a vantagem de facilitar a implementação das fórmulas através de recursos vetoriais e matriciais. No entanto, este módulo do *SAS* requer uma certa familiaridade do usuário com as notações matriciais e um certo conhecimento em programação.

A programação utilizando o *PROC EXPAND* do *SAS* é mais simples, pois utiliza-se funções internas, já implementadas no *SAS*. No entanto, é importante ressaltar que o *PROC EXPAND* pode apresentar um erro no cálculo final da estimativa da ASC_{t_k} , pois o programa pode fornecer um valor incorreto para ASC , dependendo do valor da última concentração C_k . Por exemplo, se $C_k \neq 0$, então o verdadeiro valor da estimativa de ASC corresponde ao segundo resultado do arquivo "saída" da soma acumulada das áreas sob as curvas dos intervalos. Porém, quando $C_k = 0$, o verdadeiro valor da estimativa da ASC corresponde ao primeiro valor do arquivo "saída". Como sugestão para corrigir este erro, apresenta-se um procedimento em *MACRO*, que verifica o valor da última concentração e, a partir deste valor, o programa fornece a estimativa correta da ASC .

1.1.2 Outras Medidas Farmacocinéticas

Existem outras medidas farmacocinéticas que também são utilizadas em estudos de bioequivalência como, por exemplo, a concentração máxima do fármaco C_{max} e o tempo t_{max} correspondente a C_{max} . A seguir, é apresentado como estas e outras medidas farmacocinéticas podem ser estimadas a partir das concentrações observadas do fármaco ao longo do tempo.

A estimativa de ASC para o intervalo $[0 - \infty]$, denotada por (ASC_∞) , pode ser obtida por

$$ASC_\infty = ASC_{t_k} + \frac{C_k}{k_{el}}, \quad (1.1.15)$$

onde C_k é a concentração da última amostra sanguínea e k_{el} representa a taxa de eliminação da droga, cuja estimativa pode ser obtida através do coeficiente angular do modelo de regressão linear de mínimos quadrados dos logaritmos naturais das últimas 4 a 6 concentrações, multiplicado por -1 . Note que se a última concentração for não-quantificável, então a estimativa ASC_∞ é igual a ASC_{t_k} .

O pico da concentração máxima C_{max} do fármaco e o tempo para atingir este pico t_{max} devem ser obtidos diretamente da curva da concentração sanguínea do fármaco *versus* tempo, sem a interpolação dos dados.

Outra medida farmacocinética importante é representada pelo tempo de meia-vida de eliminação do fármaco ($t_{1/2}$), que determina o tempo em que a concentração de um determinado medicamento diminui em cerca de 50% na circulação sanguínea. Por este motivo, recomenda-se que o cronograma de coleta das amostras deve contemplar um tempo igual ou superior a 3 ou 5 vezes a meia-vida

de eliminação do fármaco. Assim procedendo, a estimativa da ASC_{t_k} pode ser igual ou superior a 80% da ASC_{∞} . Considerando que a taxa de decaimento da concentração do fármaco ao longo do tempo possa ser obtida através de uma equação diferencial de primeira ordem, então tem-se:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{el}C,$$

onde C é a concentração da formulação e k_{el} representa a taxa de eliminação da droga. Integrando a equação diferencial, obtém-se

$$\int_{C_0}^C \frac{dC}{C} = -k_{el} \int_0^t dt \implies \ln C / C_0 = -k_{el}t / 0 \implies \ln C - \ln C_0 = -k_{el}t.$$

Como $t = t_{1/2}$ e $C = C_0/2$, tem-se

$$\ln \left(\frac{C_0}{2} \right) - \ln C_0 = -k_{el}t_{1/2} \implies t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}}, \quad (1.1.16)$$

onde k_{el} é taxa de eliminação do fármaco.

Para exemplificar a estimação das medidas farmacocinéticas, considere os dados apresentados na Tabela 1.1.3. Antes de calcular a estimativa de ASC_{∞} , é necessário estimar a taxa de eliminação k_{el} . Portanto, utilizando os logaritmos naturais das últimas 6 concentrações e seus respectivos tempos, ajustou-se o seguinte modelo de regressão linear por mínimos quadrados:

$$\ln C_i = 1,4925 - 0,03247 * t_i \quad i = 8, \dots, 13.$$

Baseando-se no coeficiente angular do modelo de regressão linear e multiplicando-o por -1 , obtém-se que a estimativa de k_{el} é igual a $0,03247 \text{ hs}^{-1}$. Conseqüentemente, através de (1.1.16), obtém-se que a estimativa da meia-vida de eliminação deste fármaco é igual a $21,343 \text{ hs}$.

As estimativas de ASC_{∞} apresentadas na Tabela 1.1.8 foram obtidas através de um acréscimo equivalente a $\frac{C_{tk}}{k_{el}} = \frac{1,6}{0,03247} = 49,276$ nas estimativas de ASC_{32} da Tabela 1.1.3.

Tabela 1.1.8: Estimativas da ASC_{32} e ASC_{∞} obtidas pelo Método Trapezoidal e das *Splines* Cúbicas.

Estimativas	Métodos	
	Trapezoidal	Splines Cúbicas
ASC_{32}	85,950	85,650
ASC_{∞}	135,226	134,926

As estimativas da concentração máxima C_{max} e do tempo t_{max} podem ser obtidas diretamente das concentrações observadas ao longo das 32 horas, sem o uso da interpolação. Então, obtem-se que C_{max} é igual a 4,7 ng/ml e o tempo t_{max} correspondente a C_{max} é de 3 horas.

Para a análise de bioequivalência das formulações T e R , é necessário estimar as medidas farmacocinéticas, a partir da curva de concentração sangüínea das formulações R e T fármaco *versus* tempo, para cada um dos voluntários do ensaio clínico. Para um estudo adequado das biodisponibilidades das formulações testadas, é importante a escolha de um planejamento experimental apropriado para a coleta de amostras sangüíneas dos voluntários ao longo do tempo, segundo um cronograma experimental previamente determinado. Alguns planejamentos experimentais, freqüentemente empregados em estudos de bioequivalência, são brevemente apresentados no próximo capítulo.

Capítulo 2

Planejamento Experimental para Estudos de Biodisponibilidade

Os estudos de biodisponibilidade/bioequivalência são realizados através de experimentos planejados, que têm por objetivo fornecer informações das biodisponibilidades das formulações testadas, as quais são administradas em uma amostra de voluntários.

Para a realização e a validação de um estudo experimental, é necessário o uso de um protocolo experimental, onde são detalhados todos os procedimentos e considerações utilizadas durante o experimento: os objetivos do estudo, os critérios empregados na seleção e exclusão de voluntários, as características e as formas de dosagem das formulações testadas, a escolha do delineamento experimental, a metodologia aplicada na coleta e na análise laboratoriais das amostras e os métodos estatísticos empregados na análise das biodisponibilidades.

O objetivo de um estudo de bioequivalência é avaliar a bioequivalência das formulações Teste T e Referência R de um produto farmacêutico através de suas biodisponibilidades observadas, segundo limites clinicamente aceitos.

Uma característica da maioria dos estudos de bioequivalência é o emprego de indivíduos sadios em seus experimentos. Como existe uma grande variabilidade metabólica presente nos voluntários, é importante escolher critérios capazes de manter homogêneas as características do grupo de indivíduos participantes do experimento. Por exemplo, devem ser considerados o sexo, a idade, o peso, os hábitos alimentares, o estado de saúde e devem ser excluídos os voluntários que apresentam alergias a fármacos, que estão com tratamentos em andamento ou que apresentam qualquer tipo de dependência de drogas como álcool, tabagismo e outras. Durante os experimentos, os voluntários devem ser submetidos às mesmas condições experimentais durante todo o experimento, ou seja, uma dieta semelhante, por exemplo, com uma mesma quantidade de líquidos e alimentos, e com

um mesmo período de jejum.

Os critérios aprovados pela *ANVISA* para a etapa clínica de um estudo de bioequivalência de medicamentos genéricos estão apresentados na Resolução *n*º 896 de 29 de maio de 2003. Baseando-se nos procedimentos deste regulamento, tem-se:

- (i) os voluntários participantes do experimento devem ser sadios, ter idade entre 18 e 50 anos e conscientes do objetivo do estudo;
- (ii) os experimentos clínicos devem ser conduzidos com voluntários do sexo masculino, feminino ou de ambos os sexos, sendo que no último caso, o número de mulheres e homens deverá ser igual;
- (iii) o peso dos indivíduos deverá estar em um limite de $\pm 15\%$ do peso normal para homens e mulheres, considerando a altura e a estrutura física de cada um;
- (iv) deve-se evitar indivíduos fumantes, em tratamento com outro medicamento ou com histórico de abuso de álcool ou drogas. Caso sejam incluídos, estes voluntários deverão estar devidamente identificados;
- (v) os voluntários participantes do estudo experimental que necessitarem de confinamento devem permanecer em local apropriado, sob a supervisão de um médico.
- (vi) nos estudos em que são necessários voluntários com características diferentes das citadas acima, a inclusão deverá ser justificada cientificamente.

O uso de uma metodologia estatística eficiente depende basicamente do planejamento do experimento utilizado para a coleta dos resultados de biodisponibilidade das formulações testadas. Portanto, é importante o uso de um planejamento experimental adequado às características do fármaco testado.

Neste capítulo, serão abordados brevemente alguns planejamentos experimentais frequentemente aplicados em estudos de bioequivalência, enfocando algumas de suas características e circunstâncias às quais determinados planejamentos são melhor indicados.

2.1 Princípios Básicos de um Planejamento Experimental

A metodologia empregada no delineamento experimental e na análise de experimentos é usualmente creditada a Fisher (1935), pois foi quem primeiro introduziu o princípio da aleatorização e de análise de variância. Inicialmente, a aleatorização e a análise de variância foram aplicadas em planejamentos de experimentos agrícolas e, desde então, grande progresso ocorreu no planejamento e na análise de experimentos, embora a metodologia continue essencialmente a mesma. Todo delineamento experimental depende de três princípios básicos: a replicação, a blocagem e a aleatorização.

2.1.1 Replicação

Para obter uma precisão adequada na análise do experimento, é necessário que o experimento possua um certo número de unidades experimentais, isto é, algumas unidades amostrais alocadas aos tratamentos testados. Em estudos de bioequivalência, cada unidade experimental é representada por um voluntário. O uso da replicação no planejamento de um experimento de bioequivalência consiste em administrar as formulações testadas mais de uma vez, em períodos diferentes de tratamento, ou seja, existe repetições de uma ou mais formulações para cada um dos voluntários. Portanto, a realização de um experimento de bioequivalência com um número adequado de replicações dos tratamentos administrados possibilita estimar a variabilidade metabólica presente nos indivíduos. Com o aumento do número de indivíduos no experimento, aumenta-se a precisão no teste de bioequivalência. Na comparação das médias de dois grupos de tratamentos independentes, por exemplo, quanto maior for o tamanho de ambas as amostras, maiores serão os graus de liberdade no teste t , o que aumenta a eficiência e a sensibilidade deste teste.

2.1.2 Blocagem

Para controlar algumas fontes de variação conhecidas ou suspeitas de um experimento, pode-se empregar a blocagem, que consiste em dividir cada unidade experimental, segundo algum fator de blocagem, em subgrupos relativamente homogêneos, denominados blocos. Como os voluntários participantes dos experimentos de bioequivalência apresentam uma grande variabilidade metabólica, os blocos podem ser representados por cada indivíduo. O interesse não está em estudar o efeito desta fonte de variação já conhecida, mas sim em controlá-la, devido ao metabolismo dos voluntários. Se algumas fontes de variação existirem, então uma metodologia de blocagem bem planejada, combinada a uma análise estatística apropriada, permite que as variações causadas por essas fontes possam ser identificadas e removidas do erro experimental, aumentando-se a precisão dos testes estatísticos. Frequentemente, utiliza-se o sexo, a idade ou o peso dos voluntários como fatores de blocagem para a realização de um experimento.

2.1.3 Aleatorização

A aleatorização dos voluntários aos grupos de tratamentos desempenha um importante papel na validação dos resultados obtidos através da realização de um estudo experimental.

O termo aleatorização significa que cada um dos indivíduos participantes do experimento são designados a um ou mais tratamentos de forma aleatória, isto é, casual. Por exemplo, cada um dos voluntários tem a mesma chance de ser escolhido e alocado a um dos grupos de tratamentos disponíveis. Este método de alocação, não intencional, não promove o benefício de um determinado tratamento.

Existem, basicamente, três razões para aplicar a aleatorização em um estudo experimental. Primeiramente, a aplicação da aleatorização proporciona uma certa homogeneidade nos grupos em que são administrados os tratamentos, pois a aleatorização remove algumas fontes de variação relacionadas a algumas características dos voluntários. Durante a realização de um experimento, estas características, denominadas também por covariáveis, podem ser, por exemplo, o peso, a idade, o sexo ou a condição física dos indivíduos.

A segunda razão para o uso da aleatorização em experimentos está relacionada à validação dos resultados obtidos pelo experimento para que uma inferência estatística possa ser aplicada aos resultados do experimento e as conclusões expandidas para a população. É importante lembrar que experimentos são realizados apenas com uma amostra de indivíduos provenientes de uma determinada população de interesse.

O terceiro ponto, refere-se a aleatorização como um método eficiente no mascaramento das identidades dos tratamentos administrados aos voluntários, pois isto evita possíveis vícios na alocação dos indivíduos e na condução do experimento. Por exemplo, em ensaios clínicos aleatorizados duplamente cegos, os voluntários não têm conhecimento das formulações que recebem e os profissionais da saúde envolvidos também desconhecem as formulações que administram durante o experimento, pois as formulações são devidamente codificadas. No entanto, existem também os ensaios clínicos aleatorizados cego simples, estes experimentos consistem na administração das formulações aos voluntários, porém estes desconhecem o tratamento oferecido. A impossibilidade de distinguir os tratamentos administrados aos voluntários evita que alguns aspectos psicológicos possam interferir e mascarar os efeitos das formulações testadas.

Uma vantagem adicional no emprego da aleatorização está relacionada a credibilidade dos resultados obtidos por um estudo experimental que incorpora algum método de aleatorização em seu planejamento para a alocação dos voluntários aos tratamentos disponíveis. Por isso, a ausência da aleatorização num experimento diminui a credibilidade e levanta suspeitas acerca de algumas conclusões. Kunz e Oxman (1998) apontaram que os resultados obtidos por ensaios clínicos não-

aleatorizados podem não ser reproduzidos através de ensaios clínicos aleatorizados. Portanto, a presença de vícios de seleção podem superestimar ou subestimar alguns dos resultados do experimento.

Procedimento de Aleatorização

Quando o interesse está em alocar, com a mesma probabilidade de alocação, os n voluntários aos t tratamentos, utiliza-se a aleatorização fixa. Estas probabilidades de alocação permanecem inalteradas durante todo o procedimento de aleatorização dos voluntários aos grupos de tratamento.

Em sua versão mais simples, a aleatorização fixa em um estudo experimental consiste, por exemplo, em alocar uma amostra de n voluntários aos dois tratamentos Teste T e Teferência R , com as mesmas probabilidades de alocação ($p_T = p_R$). Este procedimento de aleatorização pode ser facilmente realizado através de tabelas de números aleatórios, disponíveis em vários livros, ou com o uso de algum programa estatístico. Por exemplo, utilizando-se a tabela de números aleatórios, pode-se alocar os n voluntários aos grupos de tratamento R e T considerando-se o seguinte critério:

- (i) se o número aleatório é par, aloca-se o i -ésimo indivíduo ao tratamento R ; caso contrário, aloca-se o i -ésimo indivíduo ao tratamento T .

Como ilustração, considere um experimento composto por 24 indivíduos, que precisam ser alocados aleatoriamente aos tratamentos R e T . Baseando-se em uma tabela de números aleatórios, pode-se obter alguns números aleatórios para a aleatorização dos voluntários do experimento. Por exemplo, considere a coluna de números aleatórios apresentados abaixo:

5	3	4	7	9	9
7	3	4	4	6	6
0	2	3	9	9	7
7	6	3	0	1	7

A aplicação deste procedimento de aleatorização pode fornecer um experimento não-balanceado, onde os números de voluntários n_1 e n_2 alocados, respectivamente, aos tratamentos R e T não são os mesmos.

Existem outros procedimentos de alocação de n voluntários aos t tratamentos de um estudo experimental. A aleatorização pode ser realizada utilizando uma razão de alocação, a estratificação ou a blocagem.

A - Razão de Alocação

O uso da razão de alocação nos procedimentos de aleatorização é freqüentemente aplicada, por exemplo, nos casos em que a diferença nos custos da realização do experimento com grupos de

Tabela 2.1.1: Alocação Aleatória Simples de 24 voluntários de um Experimento composto por Dois Tratamentos R e T .

indivíduo	Número Aleatório	Tratamento Alocado	indivíduo	Número Aleatório	Tratamento Alocado
1	5	T	13	0	R
2	3	T	14	2	R
3	4	R	15	3	T
4	7	T	16	9	T
5	9	T	17	9	T
6	9	T	18	7	T
7	7	T	19	7	T
8	3	T	20	6	R
9	4	R	21	3	T
10	4	R	22	0	R
11	6	R	23	1	T
12	6	R	24	7	T

tratamento alocado	número de voluntários
R	9
T	15

tratamento de mesmo número é grande ou quando os tratamentos estudados possuem alguns níveis de toxicidade.

O procedimento de alocação mais comum utiliza a alocação proporcional ou uniforme, onde as probabilidades de alocação são iguais durante todo o processo de alocação dos n voluntários aos t tratamentos do experimento, isto é, $p_1 = p_2 = \dots = p_t$ e $\sum_{i=1}^t p_i = 1$. Porém, se existir no mínimo uma probabilidade diferente das demais e $\sum_{i=1}^t p_i = 1$, então a alocação deste planejamento experimental é desproporcional ou não-uniforme.

A alocação de n indivíduos aos t tratamentos de um estudo experimental pode ser expressa através da razão r_i de voluntários alocados ao tratamento i . Portanto, as probabilidades p_i de alocação aos tratamentos são escolhidas afim de fornecer um número esperado de alocações próximos das razões desejadas. Geralmente, utiliza-se a alocação uniforme, pois fornece um experimento balanceado, onde cada grupo de tratamento possui o mesmo número de indivíduos alocados.

Por exemplo, considere um estudo experimental realizado com n voluntários e dois tratamentos R e T . Portanto, considerando a razão de alocação 1 : 2 para os tratamentos R e T , tem-se uma proporção de dois voluntários alocados ao tratamento T para cada voluntário alocado ao tratamento R .

B - Estratificação

Quando o interesse está em estudar as influências de algumas covariáveis, por exemplo, o sexo ou a idade dos voluntários, nos resultados do experimento, pode-se utilizar a estratificação. Esta metodologia consiste em dividir, segundo as covariáveis de interesse, o número total de voluntários do estudo experimental em grupos menores, denominados estratos.

Além de possibilitar o estudo das influências das covariáveis nas respostas dos indivíduos, a estratificação também pode aumentar a precisão do experimento com a redução da variabilidade devido às covariáveis estratificadoras.

Considere, por exemplo, o sexo e a idade dos voluntários como covariáveis estratificadoras. Desta forma, os n voluntários podem ser classificados segundo a covariável sexo em dois estratos: homens e mulheres. Cada um desses estratos também pode ser estratificado de acordo com os três níveis da covariável idade (menores de 45 anos, de 45 a 55 anos e maiores de 55 anos). Portanto, os n indivíduos formam 6 estratos, cada um com uma categoria da covariável sexo (M e F) e um nível da covariável idade (menores de 45 anos, de 45 a 55 anos e maiores de 55 anos). Neste caso, a alocação dos voluntários aos tratamentos é realizada dentro de cada um dos estratos utilizando-se algum método de aleatorização, por exemplo a aleatorização simples.

Note que a estratificação pode se tornar complexa se existir um número grande de covariáveis estratificadoras com vários níveis ou categorias. Em termos gerais, um estudo experimental com c covariáveis estratificadoras e cada uma delas com l_i níveis, formam $l_1.l_2 \dots l_c$ estratos. Nestes casos, pode haver a formação de estratos com um número reduzido de representantes e, conseqüentemente, formar estudos experimentais não-balanceados.

C - Blocagem

Os estudos experimentais realizados para a análise de bioequivalência geralmente utilizam a blocagem para a remoção da variabilidade metabólica inter-indivíduos da análise estatística, pois a precisão das comparações entre os tratamentos é determinada pela variabilidade dentro dos blocos. Portanto, a blocagem também pode estar associada a alguma metodologia de aleatorização. Nestes experimentos, aplica-se uma aleatorização restrita, ou seja, aleatoriza-se apenas dentro de cada um dos blocos formados.

A aleatorização também pode apresentar alguns entraves quando é aplicada em alguns estudos experimentais, pois um dilema fundamental pode surgir do conflito existente entre a alocação aleatória dos voluntários e os princípios da ética médica. Isto ocorre, principalmente, nos casos em que um determinado tratamento é reconhecidamente melhor e pode ser decisivo na saúde dos voluntários. Outro exemplo está relacionado ao desenvolvimento de novas drogas, cujos efeitos colaterais são desconhecidos e podem levar à morte dos voluntários. Diante destas limitações, Meinert e Tonascia (1986) aconselhou que o ensaio clínico não deve ser conduzido, a menos que seja eticamente justificado.

A escolha de um procedimento de aleatorização mais adequado depende, basicamente, do planejamento experimental selecionado para o estudo de biodisponibilidade/bioequivalência. Nas próximas seções deste capítulo, serão apresentados alguns planejamentos de experimento empregados em estudos de bioequivalência.

2.1.4 Coleta dos Dados Longitudinais do Experimento

Após a administração do fármaco aos voluntários, as amostras de algum líquido biológico, por exemplo, sangue ou urina, são coletadas ao longo do tempo, sob as mesmas condições experimentais para todos os voluntários do estudo experimental. A partir dessas amostras, as concentrações do fármaco, para cada um dos voluntários, são processadas em laboratório.

Alguns estudos experimentais pilotos podem ser realizados com alguns voluntários para determinar previamente os tempos experimentais que devem ser utilizados durante a execução do experimento. Outra forma de determinar os tempos experimentais é através de referências sobre a formulação R . Portanto, a partir dos tempos observados da concentração máxima dos estudos pilotos, pode-se determinar o cronograma dos tempos experimentais em que as amostras dos indivíduos devem ser coletadas durante a realização do estudo experimental. O planejamento dos tempos experimentais possibilita uma melhor estimativa das medidas farmacocinéticas: C_{max} e t_{max} . Através da Resolução n° 896, a ANVISA determinou que o cronograma de coleta das amostras deve ser igual, ou superior, a 3 – 5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou do metabólico.

É conveniente ressaltar que os tempos amostrais, utilizados em um estudo experimental de bioequivalência, não precisam ser necessariamente os mesmos, porém é importante manter os mesmos tempos experimentais, para os tempos próximos ao pico da concentração máxima das formulações testadas.

2.2 Planejamento Experimental *Crossover*

Os delineamentos experimentais *crossover* são geralmente recomendados aos estudos de bioequivalência, pois existe uma grande variabilidade metabólica presente nos voluntários participantes destes experimentos. Os estudos experimentais *crossover* possuem grandes vantagens, em termos de precisão estatística e custos, quando comparados aos experimentos completamente aleatorizados.

Um planejamento experimental *crossover* é uma modificação do planejamento de experimentos aleatorizados em blocos, onde cada bloco recebe mais de uma formulação da droga em diferentes períodos de tratamento. Nestes experimentos, o bloco pode ser um indivíduo ou um grupo de indivíduos homogêneos. Estes experimentos clínicos consistem em alocar, segundo um técnica de aleatorização, os voluntários às seqüências de formulações. Um planejamento experimental é denominado de *crossover* completo se cada uma das seqüências contém todas as formulações testadas. Não é necessário que o número de formulações em cada seqüência seja maior ou igual ao número de formulações testadas em um experimento *crossover*. O delineamento experimental *crossover* composto por g seqüências administradas em p períodos de tratamento é denominado de experimento *crossover* $g \times p$.

Como os voluntários de um experimento *crossover* são utilizados como seus próprios controles, estes experimentos são capazes de identificar e remover a variabilidade inter-indivíduos e, conseqüentemente, aumentar a precisão da análise estatística das biodisponibilidades das formulações. Com a redução da variabilidade proporcionada pelo uso de um experimento *crossover*, é necessário um tamanho de amostra inferior ao planejamento paralelo para a obtenção de uma mesma precisão, o que pode reduzir o custo para a realização do estudo experimental.

Os períodos de administração das formulações de um experimento *crossover* são usualmente separados por um período de *washout*, ou seja, um período para a eliminação da formulação administrado no período de tratamento anterior. A duração do período de *washout* deve ser de, no mínimo, sete meias-vidas de eliminação do fármaco e/ou do metabólico, segundo a Resolução nº 896 da ANVISA. Este período de *washout* deve ser longo o suficiente para que os efeitos de *carry-over* ou residuais da droga administrada no período anterior sejam completamente eliminados.

Se a droga possuir um tempo de meia-vida muito longo ou se o período de *washout* entre os tratamentos for insuficiente, o efeito da droga pode persistir mesmo depois do final do período de tratamento. Neste caso, é necessário distinguir a diferença existente entre o efeito *direto* da droga e o efeito de *carry-over*, ou residual. O efeito direto da droga é o efeito apresentado pela droga durante o período em que é administrada. O efeito de *carry-over* é o efeito da droga que persiste mesmo após o término do seu período de tratamento. Se o efeito de *carry-over* permanecer por apenas um período de tratamento é denominado de efeito de *carry-over* de primeira

ordem. Então, se o efeito de *carry-over* de uma determinada droga persiste por até c períodos de tratamento, é dito que esta droga possui um efeito de *carry-over* de c -ésima ordem. No entanto, em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência, é improvável que o efeito de *carry-over* de uma determinada droga exista por mais de um período de tratamento, desde que seja considerado um período de *washout* suficiente para a eliminação da droga. A presença dos efeitos de *carry-over* nas medidas farmacocinéticas é a principal desvantagem dos experimentos *crossover* em estudos de bioequivalência.

2.2.1 Modelo Estatístico e Contrastes Lineares

Considere o seguinte modelo estatístico para um experimento *crossover* realizado para testar f formulações, que formam g seqüências administradas em p períodos de tratamento:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk} \quad (2.2.1)$$

onde

Y_{ijk} representa a variável resposta de alguma medida farmacocinética, por exemplo a ASC ou C_{max} do i -ésimo indivíduo no j -ésimo período e na k -ésima seqüência, para $i = 1, 2, \dots, n_k, j = 1, 2, \dots, p$ e $k = 1, 2, \dots, g$;

μ representa a média geral;

S_{ik} é o efeito aleatório do i -ésimo indivíduo na k -ésima seqüência, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2, \dots, g$;

P_j representa o efeito do j -ésimo período, para $j = 1, 2, \dots, p$ e $\sum_{j=1}^p P_j = 0$;

$F_{(j,k)}$ é o efeito direto da formulação administrada no j -ésimo período, na k -ésima seqüência tal que $\sum F_{(j,k)} = 0$;

$C_{(j-1,k)}$ representa o efeito residual do $(j-1)$ -ésimo período para o j -ésimo período na k -ésima seqüência, sendo que $C_{(0,k)} = 0$ e $\sum C_{(j-1,k)} = 0$;

e_{ijk} é o erro aleatório do i -ésimo indivíduo, no j -ésimo período e na k -ésima seqüência.

Assume-se que S_{ik} e e_{ijk} são variáveis aleatórias independentes com médias iguais a zero e variâncias respectivamente iguais a σ_s^2 e σ_t^2 , onde $t = 1, 2, \dots, f$. A estimativa de σ_s^2 é utilizada para quantificar a variabilidade inter-indivíduos, enquanto que a estimativa de σ_t^2 é usada para avaliar a variabilidade intra-indivíduos para a t -ésima formulação.

A análise de um modelo estatístico pode ser realizada através de contrastes lineares, ou seja, de combinações lineares. Por exemplo, a combinação linear dada por $c_1F_1 + c_2F_2 + \dots + c_fF_f$, onde $c_1 + c_2 + \dots + c_f = 0$, é um contraste. Um contraste linear, $c_1F_1 + c_2F_2 + \dots + c_fF_f$, é ortogonal a outro $d_1F_1 + d_2F_2 + \dots + d_fF_f$, se a soma do produto de seus coeficientes é nula, isto é, se $c_1d_1 + c_2d_2 + \dots + c_fd_f = 0$. Portanto, para três formulações, tem-se que o conjunto de contrastes $F_2 - F_1$ e $2F_3 - F_2 - F_1$ são ortogonais entre si. Em geral, pode-se escrever $f - 1$ contrastes ortogonais para um experimento de f formulações.

Um contraste linear dentro dos indivíduos, para a k -ésima seqüência, pode ser escrito como uma combinação linear das médias dos períodos, $\bar{Y}_{.1k}, \bar{Y}_{.2k}, \dots, \bar{Y}_{.pk}$, como mostrado abaixo:

$$c = c_1 \bar{Y}_{.1k} + c_2 \bar{Y}_{.2k} + \dots + c_p \bar{Y}_{.pk},$$

onde $\bar{Y}_{.jk} = \frac{\sum_{i=1}^{n_k} Y_{ijk}}{n_k}$, $k = 1, 2, \dots, g$; $j = 1, 2, \dots, p$ e $\sum_{j=1}^p c_j = 0$.

Note que a variância de c envolve apenas a variabilidade intra-indivíduos σ_t^2 , onde $t = 1, 2, \dots, f$. Portanto, as inferências estatísticas para os efeitos de um planejamento experimental *crossover* podem ser realizadas através da variabilidade intra-indivíduos usando-se os contrastes lineares das médias.

2.2.2 Delineamento Experimental *Crossover* de Duas Formulações para Bioequivalência Média

A versão mais simples de experimentos *crossover* para duas formulações, uma Teste T e outra Referência R , é o experimento *crossover* 2 x 2. Este experimento é composto por duas seqüências (RT e TR) e dois períodos de tratamento (I e II). Em estudos de bioequivalência, os experimentos *crossover* são realizados com uma amostra de $n_1 + n_2$ voluntários, geralmente sadios, que são alocados aleatoriamente a uma das seqüências de tratamentos (n_1 para a seqüência RT e n_2 para TR). Por exemplo, metade dos indivíduos alocados à seqüência RT recebem primeiramente a formulação R durante o primeiro período e a segunda formulação T , no segundo período de tratamento, enquanto que os demais seguem o mesmo procedimento para a segunda seqüência, TR . Os períodos são, usualmente, separados por um período de *washout* que corresponde, no mínimo, de 3 a 7 meia-vidas do princípio ativo da droga testada. Este período deve ser longo o suficiente para que os efeitos residuais da droga administrada no primeiro período sejam completamente eliminados.

A partir do modelo estatístico em (2.2.1), obtém-se as respostas apresentadas na Tabela 2.2.2 para o i -ésimo indivíduo nas seqüências 1 e 2 de um experimento *crossover* 2 x 2.

Tabela 2.2.2: Respostas do i -ésimo indivíduo em um Planejamento Experimental *Crossover* 2 x 2.

Seqüência	Período I	Período II
1(RT)	$Y_{i11} = \mu + S_{i1} + P_1 + F_R + e_{i11}$	$Y_{i21} = \mu + S_{i1} + P_2 + F_T + C_R + e_{i21}$
2(TR)	$Y_{i12} = \mu + S_{i2} + P_1 + F_T + e_{i12}$	$Y_{i22} = \mu + S_{i2} + P_2 + F_R + C_T + e_{i22}$

Onde $P_1 + P_2 = 0$; $F_R + F_T = 0$ e $C_R + C_T = 0$.

Cada voluntário do planejamento de experimento *crossover* 2 x 2 possui um par de observações que correspondem a alguma medida farmacocinética, por exemplo a ASC ou C_{max} , as quais são

observadas nos períodos 1 e 2. Este par de observações (período1, período2) pode ser representado pelo vetor aleatório bivariado

$$Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k})' \quad i = 1, 2, \dots, n_k \quad e \quad k = 1, 2. \quad (2.2.2)$$

Como os vetores aleatórios bivariados são independentes, tem-se que o vetor de médias e a matriz de covariâncias para a sequência 1 são

$$\mu_{RT} = \begin{pmatrix} \mu + P_1 + F_R \\ \mu + P_2 + F_T + C_R \end{pmatrix}$$

$$\Sigma_{RT} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix}.$$

Com relação à sequência 2, obtem-se o vetor de médias e a matriz de covariâncias, que são apresentados a seguir.

$$\mu_{TR} = \begin{pmatrix} \mu + P_1 + F_T \\ \mu + P_2 + F_R + C_T \end{pmatrix}$$

$$\Sigma_{TR} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix}.$$

Como as variabilidades intra-indivíduos das formulações T e R , denotadas respectivamente por σ_T^2 e σ_R^2 , não podem ser estimadas neste planejamento experimental, é necessário utilizar a pressuposição de que $\sigma_R^2 = \sigma_T^2 = \sigma_e^2$. Assim, obtem-se que $\Sigma_{RT} = \Sigma_{TR} = \Sigma$, onde

$$\Sigma = \begin{pmatrix} \sigma_e^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_e^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix}.$$

Em um experimento *crossover* 2 x 2, existem 3 graus de liberdade, que estão associadas às 4 médias de sequência por período, sendo um grau de liberdade para o efeito de sequência, um para o efeito de período e um para a interação entre sequência e período, que é o efeito direto da formulação quando o efeito de *carry-over* não é significativo no modelo. No entanto, na presença de efeito de *carry-over*, este experimento possui as seguintes desvantagens:

- (i) o efeito da sequência não pode ser estimado separadamente, devido ao confundimento com o efeito de *carry-over*;

- (ii) não existe estimativa não-viciada para o efeito direto da formulação;
- (iii) não é possível determinar as estimativas das variabilidades intra-indivíduos para as duas formulações σ_T^2 e σ_R^2 (pois não há replicação de cada formulação para cada um dos indivíduos).

Devido a estas limitações do planejamento de experimento *crossover* 2 x 2 em estudos de bioequivalência, alguns outros delineamentos experimentais podem ser considerados, por exemplo os planejamentos experimentais *crossover* de ordem superior. Estes planejamentos são assim denominados porque possuem um número de períodos, ou de seqüências, superior ao número de formulações testadas. A seguir, são apresentados alguns planejamentos de experimento *crossover* de ordem superior, que podem ser utilizados em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência.

2.2.3 Delineamento Experimental *Crossover* 4 x 2, 2 x 3, 2 x 4 e 4 x 4.

Estes planejamentos de experimento são também chamados de planejamentos de experimento *crossover* replicado, pois pelo menos uma das formulações é replicada em cada um dos voluntários participantes do estudo. Conforme a Resolução nº 898, de 29 de maio de 2003, a ANVISA recomenda o emprego destes estudos experimentais quando a variabilidade dos fármacos for alta, ou seja, quando o coeficiente de variação (*CV*), dado por $CV = \sigma_e/\mu_R$, for maior ou igual a 30%, incluindo aqueles que são de liberação imediata, liberação modificada e outros produtos de administração oral.

Considere o seguinte modelo para um planejamento de experimento *crossover* de ordem superior:

$$Y_{ijk} = \mu + G_k + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk}, \quad (2.2.3)$$

onde Y_{ijk} , μ , P_j , $F_{(j,k)}$, $C_{(j-1,k)}$, S_{ik} e e_{ijk} para $i = 1, 2, \dots, n_k$, $k = 1, 2, \dots, g$ e $j = 1, 2, \dots, p$ são definidos como no modelo em (2.2.1) da Seção 2.2.1, com acréscimo de G_k , que é o efeito fixo da k -ésima seqüência, em que $k = 1, 2, \dots, g$ e $G_1 + G_2 + \dots + G_g = 0$.

Diferente do modelo em (2.2.1) para um planejamento experimental *crossover* 2 x 2, o modelo em (2.2.3), para o delineamento de experimento *crossover* de ordem superior, possui o efeito de seqüência G_k . Portanto, estes experimentos permitem testar o efeito da seqüência, que também pode ser utilizado para avaliar o sucesso no processo de aleatorização dos voluntários às k seqüências de formulações.

Basicamente, existem quatro delineamentos experimentais *crossover* de ordem superior que são freqüentemente aplicados em estudos de bioequivalência com duas formulações: T e R . Estes planejamentos experimentais estão apresentados na Tabela 2.2.3. Como as estimativas do efeito direto de formulação e do efeito de *carry-over* são obtidas através dos contrastes lineares intra-indivíduos, as inferências estatísticas para a análise destes experimentos são realizadas através da variabilidade intra-indivíduo σ_e^2 .

O delineamento experimental *A*, também conhecido como planejamento de experimento de Balaam (1968), é um dos mais eficientes na classe dos delineamentos experimentais *crossover* com dois períodos e duas formulações. Este planejamento consiste em adicionar mais duas seqüências *RR* e *TT* às seqüências de um delineamento experimental *crossover* 2 x 2. Desta forma, obtem-se um experimento composto por 4 seqüências: *RT*, *TR*, *RR* e *TT*. As replicações das formulações, devido as novas seqüências *RR* e *TT*, permitem a estimação das variabilidades intra-indivíduos para as formulações *R* e *T*. Além disso, o efeito de *carry-over* também pode ser estimado utilizando os contrastes lineares intra-indivíduos.

Cada voluntário do planejamento de experimento *crossover* 4 x 2 fornece um par de alguma medida farmacocinética, por exemplo, de *ASC* para os períodos 1 e 2. Portanto, considere o vetor aleatório bivariado da medida observada

$$Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k})' \quad i = 1, 2, \dots, n_k \quad e \quad k = 1, 2, 3 \text{ e } 4. \quad (2.2.4)$$

Os valores esperados das médias das seqüências por período $\bar{Y}_{jk} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} Y_{ijk}$, $j = 1, 2$; $k = 1, 2, 3$ e 4, do modelo em (2.2.3) do experimento *A*, estão apresentados na Tabela 2.2.4. As matrizes de Variância-Covariância do vetor aleatório bivariado Y_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2, 3$ e 4, para as seqüências 1, 2, 3 e 4, são respectivamente iguais a

$$\Sigma_{TT} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 \\ \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix};$$

$$\Sigma_{RR} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 \\ \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix};$$

$$\Sigma_{RT} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix};$$

$$\Sigma_{TR} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix}.$$

O planejamento de experimento *B* é um planejamento de experimento *crossover* com duas seqüências, três períodos e duas formulações. Este delineamento experimental é constituído pela adição de um novo período no experimento *crossover* 2 x 2. Desta forma, os tratamentos administrados no terceiro período são os mesmos administrados no período anterior. Estes experimentos são realizados com duas seqüências: *RTT* e *TRR*.

Tabela 2.2.3: Planejamentos Experimentais *Crossover* para Duas Formulações: Referência R e Teste T .

Seqüência	Delineamento A	
	Período	
	I	II
1	T	T
2	R	R
3	R	T
4	T	R

Seqüência	Delineamento B		
	Período		
	I	II	III
1	T	R	R
2	R	T	T

Seqüência	Delineamento C			
	Período			
	I	II	III	IV
1	T	T	R	R
2	R	R	T	T
3	T	R	R	T
4	R	T	T	R

Seqüência	Delineamento D			
	Período			
	I	II	III	IV
1	T	T	R	R
2	R	R	T	T

Tabela 2.2.4: Valores das Médias das Seqüências por Período para o Planejamento Experimental de Balaam.

Seqüência	Período I	Período II
1(<i>TT</i>)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_T + C_T$
2(<i>RR</i>)	$\mu + G_2 + P_1 + F_R$	$\mu + G_2 + P_2 + F_R + C_R$
3(<i>RT</i>)	$\mu + G_3 + P_1 + F_R$	$\mu + G_3 + P_2 + F_T + C_R$
4(<i>TR</i>)	$\mu + G_4 + P_1 + F_T$	$\mu + G_4 + P_2 + F_R + C_T$

Tabela 2.2.5: Valores das Médias das Seqüências por Período para o Planejamento Experimental *Crossover* 2 x 3.

Seqüência	Período I	Período II	Período III
1(<i>TRR</i>)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_1 + P_3 + F_R + C_R$
2(<i>RTT</i>)	$\mu + G_2 + P_1 + F_R$	$\mu + G_2 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_2 + P_3 + F_T + C_T$

Baseado no modelo em (2.2.3) de um planejamento de experimento *crossover* 2 x 3, obtem-se os valores esperados das médias das seqüências por período, que estão apresentados na Tabela 2.2.5. Considere o vetor aleatório $Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k}, Y_{i3k})'$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ e 3, como sendo o vetor da medida farmacocinética observada do i -ésimo indivíduo na k -ésima seqüência. Portanto, a estrutura das matrizes de Variância-Covariância para as duas seqüências de um experimento *crossover* 2 x 3 são, respectivamente, iguais a

$$\Sigma_{TRR} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix};$$

$$\Sigma_{RTT} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix}.$$

O delineamento experimental C é um constituído por quatro seqüências: *TTRR*, *RRTT*, *TRRT* e *RTTR*, onde os dois primeiros períodos são os mesmos do experimento de Balaam e os dois últimos correspondem às imagens espelhadas das seqüências dos períodos *I* e *II*.

A Tabela 2.2.6 apresenta os valores esperados das médias da seqüência por período para o modelo em (2.2.3) de um planejamento de experimento *crossover* 4 x 4. As respostas da medida

Tabela 2.2.6: Valores das Médias das Seqüências por Período para o Planejamento Experimental *Crossover* 4 x 4.

Seqüência	Período I	Período II	Período III	Período IV
1(<i>TTRR</i>)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_1 + P_3 + F_R + C_R$	$\mu + G_1 + P_4 + F_T + C_R$
2(<i>RRTT</i>)	$\mu + G_2 + P_1 + F_R$	$\mu + G_2 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_2 + P_3 + F_T + C_T$	$\mu + G_2 + P_4 + F_R + C_T$
3(<i>TRRT</i>)	$\mu + G_3 + P_1 + F_T$	$\mu + G_3 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_3 + P_3 + F_R + C_R$	$\mu + G_3 + P_4 + F_T + C_R$
4(<i>RTTR</i>)	$\mu + G_4 + P_1 + F_R$	$\mu + G_4 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_4 + P_3 + F_T + C_T$	$\mu + G_4 + P_4 + F_R + C_T$

farmacocinética observada do i -ésimo indivíduo da k -ésima seqüência nos quatro períodos podem ser representadas pelo vetor aleatório $Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k}, Y_{i3k}, Y_{i4k})'$, $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2, 3$ e 4. A estrutura das matrizes de Variância-Covariância para as quatro seqüências de um experimento clínico *crossover* 4 x 4 são dadas, respectivamente, por

$$\Sigma_{TTRR} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix};$$

$$\Sigma_{RRTT} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix};$$

$$\Sigma_{TRRT} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix};$$

$$\Sigma_{RTTR} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix}.$$

O planejamento de experimento *crossover* D é um composto por duas seqüências e quatro períodos. Este planejamento é realizado com duas seqüências: *TRRT* e *RTTR*, onde os tratamentos

Tabela 2.2.7: Valores das Médias das Seqüência por Períodos para o Planejamento Experimental *Crossover* 2 x 4.

Seqüência	Período I	Período II	Período III	Período IV
1(<i>TRRT</i>)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_1 + P_3 + F_R + C_R$	$\mu + G_1 + P_4 + F_T + C_R$
2(<i>RTTR</i>)	$\mu + G_2 + P_1 + F_R$	$\mu + G_2 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_2 + P_3 + F_T + C_T$	$\mu + G_2 + P_4 + F_R + C_T$

nos três primeiros períodos são os mesmos do experimento *B* com duas seqüências e três períodos. O tempo para a realização deste experimento é um pouco longo, quando comparado ao delineamento *B*. Por este motivo, os planejamentos com mais de três períodos são geralmente evitados, pois pode existir um aumento nas chances de desistência dos voluntários, durante a realização do estudo.

A Tabela 2.2.7 apresenta os valores esperados das médias das seqüências por período para o modelo em (2.2.3) de um planejamento de experimento *crossover* 4 x 4. As respostas da medida farmacocinética observada do *i*-ésimo indivíduo da *k*-ésima seqüência nos quatro períodos podem ser representadas pelo vetor aleatório $Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k}, Y_{i3k}, Y_{i4k})'$, $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2, 3$ e 4. Portanto, a estrutura das matrizes de Variância-Covariância para as duas seqüências de um experimento *crossover* 2 x 4 são dadas, respectivamente, por

$$\Sigma_{TRRT} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix};$$

$$\Sigma_{RTTR} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix}.$$

Em resumo, os planejamentos de experimentos *crossover* replicados oferecem algumas vantagens, quando comparados ao não-replicados 2 x 2, estas vantagens são as seguintes:

- (i) permite comparações das variabilidades intra-indivíduos para a formulação *T* e *R*, σ_T^2 e σ_R^2 ;
- (ii) indica se a formulação *T* apresenta maior ou menor variabilidade intra-indivíduos nas medidas farmacocinéticas, quando comparada à formulação *R*;
- (iii) reduz o número de voluntários necessários para a realização do estudo de bioequivalência.

No entanto, os delineamentos *crossover* replicados possuem a desvantagem de aumentar o tempo para a término do experimento, devido aos tempos necessários de *washout* entre os períodos. Isto pode aumentar o número de desistências dos voluntários em participar ou em continuar o experimento.

2.2.4 Planejamento Experimental *Crossover* com Três ou Mais Formulações

Os planejamentos de experimento utilizados em estudos de bioequivalência de três ou mais formulações são mais complicados em relação aos planejamentos de apenas duas formulações. A seguir, serão enfocados brevemente apenas os planejamentos cujo número de períodos equivale ao número de formulações testadas.

Considere a realização de um experimento *crossover* para um estudo de bioequivalência de três formulações diferentes de um determinado medicamento. Neste caso, existem três possíveis comparações pareadas entre as formulações: a formulação 1 *versus* a formulação 2, a formulação 1 *versus* a 3, a formulação 2 *versus* a 3. Estas diferenças pareadas são estimadas com a mesma precisão, ou seja, utiliza-se $V(\hat{F}_i - \hat{F}_j) = \nu\sigma_e^2$, onde ν é uma constante e σ_e^2 representa a variabilidade intra-indivíduos. Os planejamentos experimentais que possuem esta propriedade são conhecidos como experimentos com variância balanceada. Como o valor de ν pode variar de acordo com o planejamento adotado, o planejamento ideal será aquele que apresentar o menor valor de ν . Jones e Kenward (1989) apontaram que os planejamentos experimentais balanceados satisfazem as seguintes condições:

- (i) cada indivíduo recebe apenas uma vez cada formulação testada;
- (ii) cada formulação ocorre o mesmo número de vezes em cada período;
- (iii) O número de indivíduos que recebem a formulação i , em algum período seguido da administração da formulação j , no próximo período é o mesmo para todo $i \neq j$.

Quando o número de períodos p é igual ao número de formulações f , então o balanceamento pode ser obtido através de um Quadrado Latino, exceto quando $f = 6$. Um exemplo de quadrado latino com $f = 3$ está apresentado na Tabela 2.2.8. Note que quanto maior é o número de formulações testadas, maior é o número de seqüências e, conseqüentemente, um maior número de indivíduos é necessário para a realização do experimento.

Para resolver este problema, Williams(1949) propôs um delineamento experimental balanceado que requer um número pequeno de seqüências e de períodos para ser realizado. Um experimento de Williams é composto por f formulações e p períodos e pode ser construído através dos seguintes passos:

- (i) Codifique as formulações testadas de 1, 2, ..., f ;

Tabela 2.2.8: Quadrado Latino para Três Formulações.

Seqüência	Período		
	I	II	III
1	R^*	T_1	T_2
2	T_1	T_2	R
3	T_2	R	T_1
4	R	T_2	T_1
5	T_1	R	T_2
6	T_2	T_1	R

* R é a Referência e T_1 e T_2 são as formulações Teste 1 e 2, respectivamente

- (ii) Inicie com um quadrado latino padrão $f \times f$, onde as formulações na i -ésima linha são dadas por $i, i + 1, \dots, f, 1, 2, \dots, i - 1$;
- (iii) Entrelace cada linha do quadrado latino padrão com a imagem espelhada, isto é, em ordem inversa. Após este passo, obtem-se um retângulo de $f \times 2f$;
- (iv) Divida o retângulo de $f \times 2f$ ao meio e obtenha dois quadrados de $f \times f$. A coluna de cada quadrado $f \times f$ corresponde aos períodos de tratamento e as linhas são as seqüências. Lembre-se que as representações numéricas dos quadrados são as codificações das formulações;
- (v) Se f for par, escolha qualquer um dos dois quadrados $f \times f$. No entanto, se f for ímpar, deve-se usar ambos os quadrados $f \times f$.

Utilizando os passos do procedimento acima, pode-se construir um experimento de Williams para 4 formulações (uma Referência R e três Testes T_1 , T_2 e T_3):

- (i) Codifique a formulação Referência R por 1, e as formulações Teste T_1 , T_2 e T_3 por 2, 3 e 4, respectivamente;
- (ii) Um quadrado latino padrão 4×4 pode ser escrito como:

1	2	3	4
2	3	4	1
3	4	1	2
4	1	2	3

- (iii) Permutando as colunas do quadrado latino padrão 4 x 4 e escrevendo sua imagem, obtém-se um retângulo de 4 x 8:

1	4	2	3		3	2	4	1
2	1	3	4		4	3	1	2
3	2	4	1		1	4	2	3
4	3	1	2		2	1	3	4

- (iv) Dois quadrados latinos 4 x 4 são obtidos através da divisão do retângulo de 4 x 8:

Quadrado	Seqüência	Período			
		I	II	III	IV
1	1	1	4	2	3
	2	2	1	3	4
	3	3	2	4	1
	4	4	3	1	2
2	1	3	2	4	1
	2	4	3	1	2
	3	1	4	2	3
	4	2	1	3	4

- (vi) Como o número de formulações é par, pode-se escolher qualquer um dos dois quadrados para realizar o experimento. Após a decodificação (1, 2, 3 e 4 por R , T_1 , T_2) para o quadrado 1, obtém-se o planejamento de experimentos de Williams, apresentado na Tabela 2.2.9.

Tabela 2.2.9: Delineamento Experimental de Williams para Quatro Formulações

Seqüência	Período			
	I	II	III	IV
1	R	T_3	T_1	T_2
2	T_1	R	T_2	T_3
3	T_2	T_1	T_3	R
4	T_3	T_2	R	T_1

Baseando-se no exemplo para 4 formulações, observa-se que o experimento de Williams necessita apenas de 4 seqüências, enquanto que um experimento quadrado latino 4 x 4 completo

necessita de 12 seqüências para ser realizado. Efetuando-se os mesmos passos do procedimento descrito anteriormente, pode-se obter também o delineamento experimental de Williams com três formulações da Tabela 2.2.10.

Tabela 2.2.10: Delineamento Experimental de Williams para Três Formulações

Seqüência	Período		
	I	II	III
1	R	T_2	T_1
2	T_1	R	T_2
3	T_2	T_1	R
4	T_1	T_2	R
5	T_2	R	T_1
6	R	T_1	T_2

2.2.5 Planejamento Experimental Balanceado em Blocos Incompleto

Em estudos de bioequivalência de três ou mais formulações de uma determinada droga, alguns delineamentos experimentais *crossover* podem não ser apropriados devido às seguintes razões:

- (i) O tempo para a realização do experimento *crossover* pode ser demorado quando o número de formulações f é grande, pois são necessários $f - 1$ períodos de *washout*;
- (ii) Podem não ser permitidas muitas retiradas de amostras sanguíneas de cada indivíduo ao longo do tempo, devido às recomendações médicas (por exemplo, pacientes debilitados);
- (iii) Em virtude de um longo tempo para a execução do estudo clínico, os voluntários podem desistir do experimento.

Westlake (1974) sugeriu o emprego de um delineamento experimental balanceado em blocos incompletos para estudos de bioequivalência de três ou mais formulações. Estes experimentos consistem em administrar um número mínimo de formulações aos voluntários. A denominação bloco incompleto é utilizada porque o número de formulações administradas em cada bloco é menor em relação ao número de formulações testadas. Quando este planejamento experimental é empregado em estudos de bioequivalência, os blocos e as formulações não são ortogonais entre si, portanto os efeitos de blocos e os efeitos de formulações não podem ser estimados separadamente.

Devido ao confundimento de alguns efeitos do planejamento experimental em blocos incompletos, recomenda-se que as formulações administradas em cada um dos blocos deste experimento

sejam alocadas aleatoriamente de forma balanceada, isto é, quaisquer duas formulações aparecem juntas o mesmo número de vezes. O planejamento experimental balanceado em blocos incompleto possui as seguintes vantagens em relação a um planejamento experimental incompleto:

- (i) As diferenças entre os efeitos de quaisquer duas formulações sempre podem ser estimadas com a mesma precisão;
- (ii) A análise é mais simples, apesar da existência de não-ortogonalidade, quando existe o balanceado no planejamento do experimento;
- (iii) Podem-se obter estimativas não-viciadas para os efeitos das formulações.

Considere a realização de um experimento para avaliar a bioequivalência de f formulações, em que cada indivíduo pode apenas receber h formulações ($f > h$). Portanto, as seqüências do planejamento experimental balanceado em blocos incompletos podem ser construídas através das combinações de f formulações em h . Após a aplicação de um método de aleatorização, as seqüências de formulações são alocadas a cada um dos voluntários. No entanto, é preferível que as alocações das formulações sejam realizadas de tal forma que o planejamento seja balanceado em cada período, ou seja, cada formulação deve aparecer o mesmo número de vezes nos períodos do experimento. Por exemplo, para um número par de formulações $f = 2n$ e $h = 2$, é necessário que o número de seqüências seja igual a $g = 2n(2n-1)$. Entretanto, para um número ímpar de formulações $f = 2n+1$ e $h = 2$, são necessárias $g = (2n+1)n$ seqüências. As Tabelas 2.2.11 e 2.2.12 apresentam alguns exemplos deste planejamento de experimento.

Tabela 2.2.11: Planejamento Experimental Balanceado em Blocos Incompleto para 4 Formulações e 3 Períodos.

Seqüência	Período		
	I	II	III
1	T_1	T_2	T_3
2	T_2	T_3	R
3	T_3	R	T_1
4	R	T_1	T_2

Tabela 2.2.12: Planejamento Experimental Balanceado em Blocos Incompleto para 5 Formulações e 4 Períodos.

Seqüência	Período			
	I	II	III	IV
1	T_1	T_2	T_3	T_4
2	T_2	T_3	T_4	R
3	T_3	T_4	R	T_1
4	T_4	R	T_1	T_2
5	R	T_1	T_2	T_3

2.3 Planejamento de Experimento Paralelo

Um delineamento experimental paralelo, ou completamente aleatorizado, consiste num delineamento em que cada indivíduo recebe apenas uma das formulações testadas, após um método de aleatorização. A versão mais simples deste experimento consiste na realização do experimento para duas formulações (uma Referência R e outra Teste T) com uma amostra de $n_1 + n_2$ voluntários. Portanto, aloca-se aleatoriamente n_1 voluntários à formulação R e n_2 voluntários, à formulação T .

Como os indivíduos recebem apenas uma das formulações, este planejamento de experimento pode não ser apropriado para estudos de biodisponibilidade/bioequivalência, pois a variabilidade das observações, constituída pela variabilidade inter e intra-indivíduos, não pode ser identificada e decomposta nestas duas fontes de variação.

Embora este experimento possua a desvantagem de ser incapaz de remover a variabilidade inter-indivíduos na comparação das biodisponibilidades das formulações testadas, há algumas raras ocasiões em que este delineamento é mais recomendado. Por exemplo, para estudo de bioequivalência de um genérico de um fungicida local, é necessário a realização de três grupos de tratamentos completamente aleatorizados: um correspondente ao Teste T , outro à Referência R e um terceiro, ao Controle C . Os planejamentos experimentais paralelos também são recomendados nos casos em que o fármaco testado apresenta um tempo de meia-vida muito longo, pois o experimento pode ser realizado em um tempo menor ao do experimento *crossover*. Quando voluntários debilitados são utilizados para um estudo de biodisponibilidade, emprega-se geralmente o planejamento de experimento paralelo, pois o experimento pode ser concluído rapidamente, evitando agravar o estado de saúde dos pacientes. Portanto, o delineamento experimental paralelo é o mais indicado nos casos em que:

- (i) A variabilidade inter-indivíduos é relativamente pequena, se comparada a variabilidade intra-indivíduos;
- (ii) A droga é potencialmente tóxica e/ou seu tempo de meia-vida é muito longo;
- (iii) A população de interesse é formada por pacientes debilitados;
- (iv) O custo no aumento do número de voluntários é reduzido, quando comparado ao custo da introdução de um novo período de tratamento.

A escolha de um planejamento experimental adequado para um estudo de biodisponibilidade/bioequivalência é muito importante para o desenvolvimento de um protocolo de estudo. O delineamento experimental selecionado pode afetar a análise, a interpretação dos resultados e a determinação da bioequivalência entre as formulações. Então, é necessário conhecer todas as possíveis circunstâncias em que o experimento está envolvido antes de realizar uma criteriosa seleção entre os possíveis planejamentos de experimentos.

2.4 Tamanho de Amostra para um Estudo de Bioequivalência

Conforme as Resoluções $n^{\circ}896$ e 898 , de 29 de maio de 2003, a *ANVISA* regulamentou que não é permitido a utilização de um tamanho da amostra inferior a 12 indivíduos. No entanto, é importante lembrar que o protocolo deverá também conter um número suficiente de voluntários, prevendo a existência de possíveis desistências durante a realização do experimento. O tamanho da amostra para planejamento experimental mais apropriado pode ser calculado a partir do coeficiente de variação CV , previamente conhecido através de um estudo piloto ou devido às especificações do medicamento Referência, afim de que possa garantir a confiabilidade necessária para a análise dos resultados do experimento de biodisponibilidade/bioequivalência. Maiores detalhes sobre o cálculo do tamanho da amostra para experimentos *crossover* são apresentados no Capítulo 4.

Capítulo 3

Inferências para os Efeitos dos Modelos dos Experimentos *Crossover* para Duas Formulações R e T

Neste capítulo, serão apresentadas brevemente as análises estatísticas para os efeitos dos modelos dos delineamentos de experimentos *crossover*, abordados no Capítulo 2. Um enfoque maior será dado ao experimento *crossover* 2 x 2, devido a seu atual emprego em estudos de bioequivalência de duas formulações.

Em estudos de bioequivalência, a análise dos efeitos fixos do experimento *crossover* utilizado deve ser realizada antes da aplicação dos testes de bioequivalência, pois esta análise preliminar dos dados pode indicar quais serão as próximas etapas no estudo de bioequivalência de *T* e *R*. Por exemplo, se existe o efeito de *carry-over* nas medidas farmacocinéticas de interesse de um delineamento *crossover* 2 x 2, então a análise de bioequivalência deverá utilizar apenas os dados do primeiro período do experimento.

3.1 Planejamento Experimental *Crossover* 2 x 2

Um planejamento é composto por duas formulações, uma Teste *T* e uma Referência *R*, dois períodos de tratamento e duas seqüências (*RT* e *TR*). Baseando-se no modelo em (2.2.1), tem-se o seguinte modelo estatístico, para este experimento 2 x 2:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk}, \quad (3.1.1)$$

onde Y_{ijk} representa a variável resposta de alguma medida farmacocinética, por exemplo, a *ASC* ou C_{max} , do i -ésimo indivíduo, no j -ésimo período e na k -ésima seqüência, onde $i = 1, 2, \dots, n_k$,

$j = 1, 2$ e $k = 1, 2$;

μ representa a média geral;

S_{ik} é o efeito aleatório do i -ésimo indivíduo, na k -ésima seqüência, $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$;

P_j representa o efeito do j -ésimo período, $j = 1, 2$ e $P_1 + P_2 = 0$;

$F_{(j,k)}$ é o efeito direto da formulação administrada no j -ésimo período, na k -ésima seqüência, onde $F_{(j,k)} = F_R$ se $j = k$ e $F_{(j,k)} = F_T$ se $j \neq k$, para $j = 1, 2$ e $k = 1, 2$ e $F_R + F_T = 0$;

$C_{(j-1,k)}$ representa o efeito residual do $(j-1)$ -ésimo período para o j -ésimo período, na k -ésima seqüência, sendo que $C_{(j-1,k)} = C_R$, se $j = 2$ e $k = 1$, $C_{(j-1,k)} = C_T$, se $j = 2$ e $k = 2$ e $C_R + C_T = 0$;

e_{ijk} é o erro aleatório do i -ésimo indivíduo no j -ésimo período, na k -ésima seqüência.

Assume-se que S_{ik} e e_{ijk} são variáveis aleatórias independentes com médias iguais a zero e variâncias iguais a σ_s^2 e σ_e^2 , respectivamente. A estimativa de σ_s^2 é freqüentemente utilizada para quantificar a variabilidade inter-indivíduos, enquanto que a estimativa de σ_e^2 é usada para avaliar a variabilidade intra-indivíduos e, conseqüentemente, para testar a bioequivalência das formulações R e T .

3.1.1 Análise Gráfica

É importante o uso de algum recurso gráfico para a visualização dos dados do experimento, pois estes podem apresentar algumas evidências, que então são verificadas através de alguns testes estatísticos. Para um experimento *crossover* 2 x 2, Jones e Kenward (1989) e Hills e Armitage (1979) sugeriram basicamente duas metodologias gráficas:

- (i) Os gráficos das respostas dos indivíduos para as seqüências RT e TR , podem mostrar como as medidas farmacocinéticas de cada indivíduo mudam nos dois períodos de tratamento. Por exemplo, considerando os dados de Patel (1983), obtem-se as Figuras 3.1.1 e 3.1.2 para as respostas individuais nos períodos 1 e 2, para as seqüências RT e TR , respectivamente. Uma desvantagem desta visualização gráfica aparece quando o número de indivíduos graficados é muito grande, pois é difícil a distinção e a visualização das respostas de cada indivíduo;
- (ii) O gráfico das médias observadas das formulações R e T , nos períodos 1 e 2, pode ser utilizado para verificar a possível interação entre formulação e período. A visualização desta interação deverá ser confirmada através de testes estatísticos adequados. A confirmação da presença da interação entre formulação e período significa que os efeitos das formulações R e T dependem do período em que R e T são administradas.

A Figura 3.1.3 apresenta alguns possíveis gráficos que podem ser observados na prática para as médias amostrais das formulações R e T por período. O paralelismo das retas de R e T , apresentado em na Figura 3.1.3 (a), indica que o efeito das formulações é o mesmo para os dois períodos de tratamento, portanto pode não existir interação entre formulação e período. No entanto, como os dados reais possuem variabilidade, as retas de R e T podem não ser exatamente paralelas e ter um

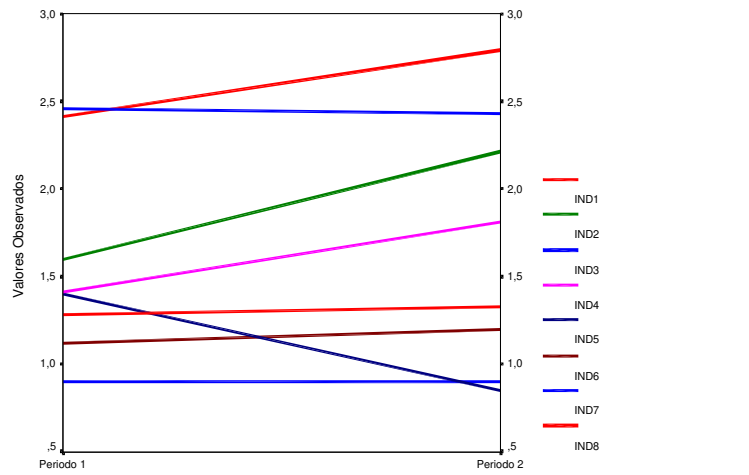


Figura 3.1.1: Valores Observados dos Indivíduos, na Sequência 1(RT).

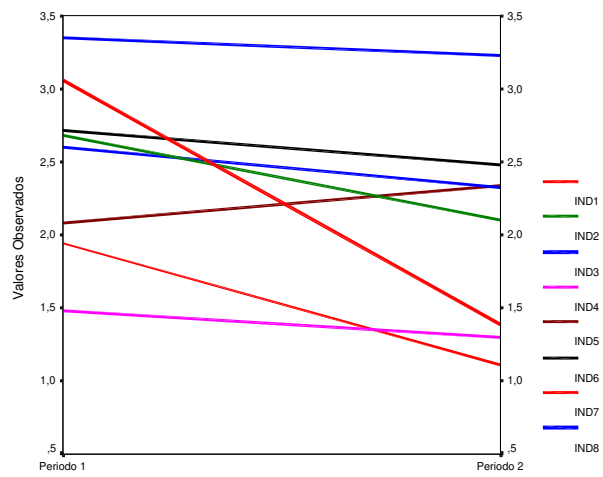


Figura 3.1.2: Valores Observados dos Indivíduos, na Sequência 2(TR).

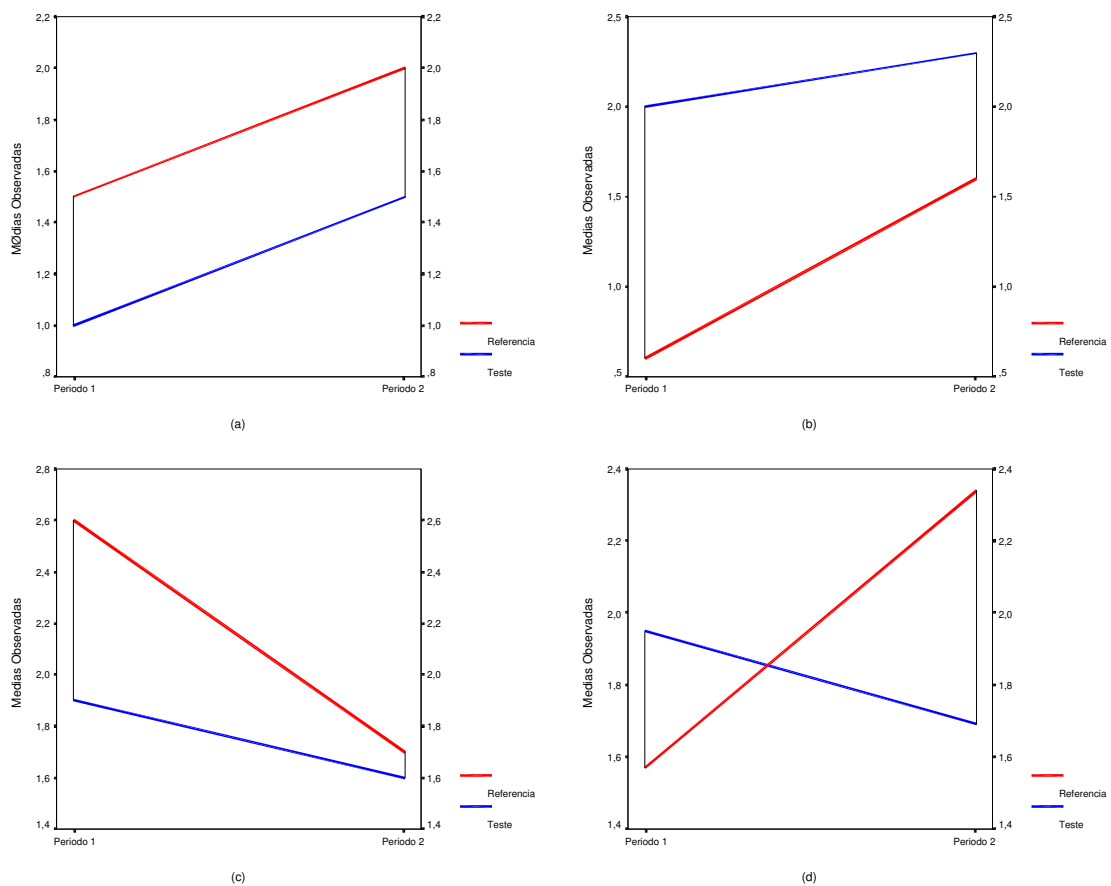


Figura 3.1.3: Alguns Possíveis Gráficos para as Médias das Formulações R e T , por Período.

comportamento semelhante às retas em 3.1.3(b) e 3.1.3 (c), por exemplo. Porém, se o gráfico das médias das formulações, por período, apresentar um comportamento de não-paralelismo, como por exemplo na 3.1.3 (d), isto pode indicar interação entre período e formulação ou existência de efeito de *carry-over*. Estas visualizações gráficas devem ser testadas para confirmarem as suspeitas. Por exemplo, se os efeitos de *carry-over* não são significativos, então as retas de R e T podem apresentar um certo paralelismo entre si, a menos que exista uma grande variabilidade nas médias amostrais das formulações por período.

A seguir, serão abordados alguns métodos paramétricos e não-paramétricos para a análise dos efeitos fixos do experimento *crossover* 2 x 2, juntamente com um exemplo ilustrativo dos métodos.

3.1.2 Análise Paramétrica

Os testes paramétricos utilizados para a inferência estatística dos efeitos de um experimento *crossover* 2 x 2 como em (3.1.1) assumem que S_{ik} e e_{ijk} são variáveis aleatórias normais independentes com médias iguais a zero e variâncias iguais a σ_s^2 e σ_e^2 , respectivamente.

Sob a pressuposição de normalidade para S_{ik} e e_{ijk} , as análises estatísticas dos efeitos fixos do modelo em (3.1.1) podem ser realizadas através da estatística t , como apresentado a seguir.

A - Efeito de *Carry-over*

A análise dos efeitos de *carry-over* deve ser a primeira a ser efetuada para os efeitos fixos do modelo em (3.1.1) de um experimento *crossover* 2 x 2, pois diferentes procedimentos podem ser utilizados no estudo da bioequivalência das formulações R e T , dependendo das conclusões do teste do efeito de *carry-over*.

Considere os totais individuais para cada seqüência, isto é,

$$U_{ik} = Y_{i1k} + Y_{i2k}, \quad i = 1, 2, \dots, n_k \quad k = 1, 2. \quad (3.1.2)$$

O valor esperado e a variância de U_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2$ são iguais a

$$E(U_{ik}) = \begin{cases} 2\mu + P_1 + P_2 + F_R + F_T + C_R, & \text{para os indivíduos da Seqüência 1} \\ 2\mu + P_1 + P_2 + F_R + F_T + C_T, & \text{para os indivíduos da Seqüência 2,} \end{cases}$$

$$\text{e } \sigma_u^2 = V(U_{ik}) = 2(2\sigma_s^2 + \sigma_e^2).$$

Para avaliar o efeito de *carry-over*, considere $C = C_T - C_R$. Logo, sob a restrição de que $C_T + C_R = 0$, tem-se que os efeitos de *carry-over* são iguais para as duas formulações R e T , ou

seja, $C = 0$ se, e somente se, $C_R = C_T = 0$. Portanto, os efeitos de *carry-over* podem ser testados através das seguintes hipóteses estatísticas:

$$H_0 : C = C_R - C_T = 0 \quad \text{vs} \quad H_1 : C = C_R - C_T \neq 0. \quad (3.1.3)$$

As inferências estatísticas de $C = C_R - C_T$ utilizam as seguintes médias amostrais dos totais individuais das seqüências 1 e 2:

$$\bar{U}_{.k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} U_{ik}, \quad k = 1, 2.$$

Sob a pressuposição de normalidade e independência de S_{ik} e e_{ijk} , tem-se que $\bar{U}_{.1}$ e $\bar{U}_{.2}$ são as médias amostrais de duas populações normais independentes com variâncias iguais. Portanto, as inferências estatísticas de C podem ser realizadas através da estatística t .

Pode-se obter uma estimativa de C através da diferença entre as médias amostrais dos totais individuais das seqüências 1 e 2, ou seja,

$$\hat{C} = \bar{U}_{.2} - \bar{U}_{.1} = (\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22}) - (\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.21}),$$

onde $\bar{Y}_{.jk} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} Y_{ijk}$, para $k = 1, 2$; e $j = 1, 2$. Portanto, sob a pressuposição de normalidade e independência de $\bar{U}_{.1}$ e $\bar{U}_{.2}$, tem-se que $\hat{C}$ tem distribuição Normal com média C e variância $V(\hat{C})$ igual a

$$V(\hat{C}) = 2(2\sigma_s^2 + \sigma_e^2) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) = \sigma_u^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$$

onde σ_u^2 representa a variância amostral ponderada das somas individuais das duas seqüências.

$$\begin{aligned} \hat{V}(\hat{C}) &= \hat{\sigma}_u^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right), \\ \hat{\sigma}_u^2 &= \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (U_{ik} - \bar{U}_{.k})^2. \end{aligned}$$

Os estimadores $\hat{C}$ e $\hat{\sigma}_u^2$ são não-viciados para C e σ_u^2 , respectivamente. Como $(n_1 + n_2 - 2)\hat{\sigma}_u^2$ é independente de $\hat{C}$ e tem distribuição $\sigma_u^2 \chi^2(n_1 + n_2 - 2)$, então sob a hipótese $H_0 : C_R = C_T$, obtém-se a seguinte estatística para o teste:

$$T_c = \frac{\hat{C}}{\hat{\sigma}_u \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}, \quad (3.1.4)$$

que tem distribuição t com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade. Portanto, rejeita-se a hipótese nula $H_0 : C_R = C_T$, com nível de significância α , quando $|T_c| > t_{(\alpha/2, n_1+n_2-2)}$.

A estatística do teste T_c depende da estimativa de $\sigma_u^2 = 2(2\sigma_s^2 + \sigma_e^2)$, que inclui as variabilidades intra σ_e^2 e inter-indivíduos σ_s^2 . Em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência, a variabilidade inter-indivíduos σ_s^2 é freqüentemente superior a variabilidade intra-indivíduos σ_e^2 . Por isso, a estatística T_c pode apresentar baixo poder para o teste do efeito de *carry-over*. Para aumentar o poder deste teste, Grizzle(1965) sugeriu testar a hipótese nula ao nível de 10% de significância, ao invés do tradicional 5%.

Pode-se construir um intervalo de confiança de $(1 - \alpha) \times 100\%$ para C através de

$$\hat{C} \pm t_{(\alpha/2, n_1+n_2-2)} \hat{\sigma}_u \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}. \quad (3.1.5)$$

B - Efeito Direto da Formulação

Se os efeitos de *carry-over* não apresentam diferenças significativas, então o efeito direto da formulação pode ser analisado através da diferença dos períodos para cada indivíduo:

$$d_{ik} = \frac{1}{2}(Y_{i2k} - Y_{i1k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k \quad k = 1, 2. \quad (3.1.6)$$

O valor esperado e a variância das diferenças dos períodos são

$$E(d_{ik}) = \begin{cases} \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + C_R], & \text{para os indivíduos da Seqüência 1} \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_R - F_T) + C_T], & \text{para os indivíduos da Seqüência 2,} \end{cases}$$

e $V(d_{ik}) = \sigma_d^2 = \sigma_e^2/2$. A variância das diferenças dos períodos $V(d_{ik})$ depende apenas da variabilidade intra-indivíduos, pois a variabilidade inter-indivíduos é removida da análise das formulações. Por este motivo, os experimentos *crossover* são empregados em estudos de bioequivalência.

Denote o efeito direto da droga por $F = F_T - F_R$ e o efeito de período por $P = P_2 - P_1$. Se os efeitos de *carry-over* não apresentam diferenças significativas $C_R = C_T$, pode-se obter uma estimativa para F através das médias amostrais das diferenças dos períodos para cada seqüência, $\hat{F} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}$. Logo,

$$E(\hat{F}) = E(\bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}) = \left[(F_T - F_R) + \frac{(C_R - C_T)}{2} \right] = F - \frac{C}{2} = F,$$

onde $\bar{d}_{.k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} d_{ik}$, para $k = 1, 2$ e $C = C_R - C_T = 0$.

Um estimador não-viciado para F pode ser escrito como

$$\hat{F} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2} = \frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.12})] = \bar{Y}_T - \bar{Y}_R,$$

onde

$$\bar{Y}_R = \frac{1}{2}(\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.22}), \quad \bar{Y}_T = \frac{1}{2}(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.12}).$$

As médias amostrais das formulações $\bar{Y}_R$ e $\bar{Y}_T$ são denominadas médias de mínimos quadrados das formulações R e T , respectivamente. Portanto, $\hat{F} = \bar{Y}_T - \bar{Y}_R$ é um contraste linear das médias amostrais das seqüências por períodos.

Em um experimento *crossover* balanceado 2 x 2, isto é, em um experimento em que o número de indivíduos alocados às seqüências RT e TR é o mesmo ($n_1 = n_2$), pode-se obter uma estimativa para F através da diferença das médias amostrais das formulações T e R , ou seja, por

$$\hat{F}^* = \bar{Y}_T^* - \bar{Y}_R^*, \quad (3.1.7)$$

onde

$$\bar{Y}_R^* = \frac{1}{n_1 + n_2} \left\{ \sum_{i=1}^{n_1} Y_{i11} + \sum_{i=1}^{n_2} Y_{i22} \right\}; \quad \bar{Y}_T^* = \frac{1}{n_1 + n_2} \left\{ \sum_{i=1}^{n_1} Y_{i21} + \sum_{i=1}^{n_2} Y_{i12} \right\}.$$

Quando $C_R = C_T$, tem-se que

$$\begin{aligned} E(\bar{Y}_R^*) &= \frac{1}{n_1 + n_2} [(n_1 + n_2)\mu + (n_1 + n_2)F_R + n_1P_1 + n_2P_2], \\ E(\bar{Y}_T^*) &= \frac{1}{n_1 + n_2} [(n_1 + n_2)\mu + (n_1 + n_2)F_T + n_1P_2 + n_2P_1]. \end{aligned}$$

Logo,

$$E(\hat{F}^*) = E(\bar{Y}_T^* - \bar{Y}_R^*) = (F_T - F_R) + \frac{1}{n_1 + n_2} [(n_2 - n_1)P_1 + (n_1 - n_2)P_2]. \quad (3.1.8)$$

O estimador $\hat{F}^*$ é não-viciado para F se, e somente se, o experimento *crossover* 2 x 2 for balanceado, isto é, experimentos em que $n_1 = n_2$.

Sob a pressuposição de normalidade de S_{ik} e e_{ijk} , a diferença entre as médias das formulações $\hat{F}$ apresenta distribuição Normal com média F e variância igual a

$$V(\hat{F}) = \sigma_d^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right). \quad (3.1.9)$$

Como d_{i1} , $i = 1, 2, \dots, n_1$ e d_{i2} , $i = 1, 2, \dots, n_2$ são duas amostras independentes de uma população Normal com variâncias iguais, quando $C_R = C_T$, então as hipóteses do efeito direto da formulação

$$H_0 : F = F_R - F_T = 0 \quad vs \quad H_1 : F = F_R - F_T \neq 0, \quad (3.1.10)$$

podem ser testadas através da seguinte estatística:

$$T_d = \frac{\hat{F}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}, \quad (3.1.11)$$

onde $\hat{\sigma}_d^2$ é a estimativa da variância amostral ponderada das diferenças dos períodos das duas seqüências, dada por

$$\hat{\sigma}_d^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (d_{ik} - \bar{d}_{.k})^2, \quad \bar{d}_{.k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} d_{ik}, \quad k = 1, 2. \quad (3.1.12)$$

Sob a hipótese nula $H_0 : F_R = F_T$, a estatística T_d tem distribuição t , com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade. Adotado um nível de significância α , a hipótese nula $H_0 : F_R - F_T = 0$ é rejeitada quando $|T_d| > t_{(\alpha/2, n_1+n_2-2)}$.

Um intervalo de confiança de $(1 - \alpha) \times 100\%$ para F pode ser obtido por

$$\hat{F} \pm t_{(\alpha/2, n_1+n_2-2)} \hat{\sigma}_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}. \quad (3.1.13)$$

É conveniente ressaltar que o teste das hipóteses em (3.1.10) é realizado apenas para testar a igualdade dos efeitos diretos das formulações do modelo *crossover* 2 x 2 como em (3.1.1) e não para testar a bioequivalência das formulações T e R . No próximo capítulo, serão apresentados alguns métodos estatísticos que são utilizados em estudos de bioequivalência média das formulações R e T .

C - Efeito de Período

Quando os efeitos de *carry-over* não apresentam diferenças significativas, o efeito de período pode ser analisado através das diferenças cruzadas O_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2$, dada por

$$O_{ik} = \begin{cases} d_{ik}, & \text{para os indivíduos da Seqüência 1} \\ -d_{ik}, & \text{para os indivíduos da Seqüência 2.} \end{cases}$$

O valor esperado e a variância das diferenças cruzadas são

$$E(O_{ik}) = \begin{cases} \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + C_R], & \text{para os indivíduos da Sequência 1} \\ \frac{1}{2}[(P_1 - P_2) + (F_T - F_R) - C_T], & \text{para os indivíduos da Sequência 2} \end{cases}$$

$$\text{e } V(O_{ik}) = \sigma_d^2 = \sigma_e^2/2.$$

Considere $\overline{O}_{.1}$ e $\overline{O}_{.2}$ como sendo as médias amostrais das diferenças cruzadas das seqüências 1 e 2, respectivamente. Logo,

$$\overline{O}_{.k} = \begin{cases} \overline{d}_{.1}, & \text{para } k = 1 \\ -\overline{d}_{.2}, & \text{para } k = 2. \end{cases}$$

Logo, se $C_R + C_T = 0$, um estimador não-viciado para o efeito do período P pode ser obtido como

$$\hat{P} = \overline{O}_{.1} - \overline{O}_{.2} = \frac{1}{2}[(\overline{Y}_{.21} - \overline{Y}_{.11}) - (\overline{Y}_{.12} - \overline{Y}_{.22})].$$

As hipóteses utilizadas para testar o efeito de período do modelo em (3.1.1) são

$$H_0 : P_1 = P_2 \quad \text{vs} \quad H_1 : P_1 \neq P_2 \quad (3.1.14)$$

e podem ser testadas através da estatística:

$$T_p = \frac{\hat{P}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}. \quad (3.1.15)$$

Portanto, utilizando-se um nível de significância α , rejeita-se a hipótese nula H_0 quando $|T_p| > t_{(\alpha/2, n_1+n_2-2)}$.

Por sua vez, um intervalo de confiança de $(1 - \alpha) \times 100\%$ para P pode ser construído como

$$\hat{P} \pm t_{(\alpha/2, n_1+n_2-2)} \hat{\sigma}_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}. \quad (3.1.16)$$

Os programas em *SAS*, para a análise paramétrica dos efeitos do modelo do experimento *crossover* 2 x 2, estão apresentados no Apêndice do Capítulo 4.

3.1.3 Análise de Variância

Os efeitos fixos do modelo em (3.1.1) de um delineamento experimental *crossover* 2 x 2 podem ser testados utilizando-se os testes t . No entanto, estes efeitos fixos também podem ser analisados através do uso dos testes F , que são obtidos através da análise de variância.

A análise de variância consiste em estudar a variabilidade das medidas farmacocinéticas de interesse através do particionamento da soma total de quadrados (SQ) das observações nas componentes de efeitos fixos e de erros aleatórios. Por exemplo, para um planejamento experimental *crossover* 2 x 2, particiona-se a soma total de quadrados das $2(n_1 + n_2)$ observações nas componentes: efeitos de *carry-over*, efeito de período, efeito direto da formulação e erro aleatório. Considerando-se $\bar{Y}_{..}$ como sendo a média geral de todas as observações, a soma total de quadrados corrigidos pela média geral pode ser escrita como

$$\begin{aligned} SQ_{total} &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{..})^2 = \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{i.k} + \bar{Y}_{i.k} - \bar{Y}_{..})^2 = \\ &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{i.k})^2 + 2 \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (\bar{Y}_{i.k} - \bar{Y}_{..})^2 = SQ_{dentro} + SQ_{entre}, \end{aligned}$$

onde $\bar{Y}_{i.k} = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^2 Y_{ijk}$, SQ_{entre} é a soma de quadrados entre os indivíduos e SQ_{dentro} é a soma de quadrados dentro dos indivíduos. Como temos $2(n_1 + n_2)$ observações, a SQ_{total} possui $2(n_1 + n_2) - 1$ graus de liberdade. Como existe um total de $n_1 + n_2$ indivíduos nas seqüências, então SQ_{entre} e SQ_{dentro} têm graus de liberdade, respectivamente, iguais a $n_1 + n_2 - 1$ e $n_1 + n_2$. A SQ_{entre} pode ser particionada em duas componentes: uma para aos efeitos de *carry-over* e outra para o erro inter-indivíduos. Portanto, tem-se

$$SQ_{entre} = SQ_{carry-over} + SQ_{inter},$$

onde

$$\begin{aligned} SQ_{carry-over} &= \frac{2n_1n_2}{n_1 + n_2} [(\bar{Y}_{.12} + \bar{Y}_{.22}) - (\bar{Y}_{.11} + \bar{Y}_{.21})]^2, \\ SQ_{inter} &= \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} \frac{Y_{i.k}^2}{2} - \sum_{k=1}^2 \frac{Y_{..k}^2}{2n_k}, \end{aligned}$$

onde $Y_{i.k} = 1/2 \sum_{j=1}^2 Y_{ijk}$, para $i = 1, 2, \dots, n_k, k = 1, 2$ e $Y_{..k} = 1/2n_k \sum_{i=1}^{n_k} \sum_{j=1}^2 Y_{ijk}$, para $k = 1, 2$.

As somas de quadrados $SQ_{carry-over}$ e SQ_{intra} têm 1 e $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade, respectivamente. Logo, cada soma de quadrados dividida por seus respectivos graus de liberdade é um

quadrado médio QM . Os valores esperados dos quadrados médios destas somas são

$$\begin{aligned} E(QM_{carry-over}) &= \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2}(C_T - C_R)^2 + 2\sigma_s^2 + \sigma_e^2, \\ E(QM_{inter}) &= 2\sigma_s^2 + \sigma_e^2. \end{aligned}$$

O teste das hipóteses $H_0 : C_R - C_T = 0$, em (3.1.3), pode ser realizado através da seguinte estatística F :

$$F_c = \frac{QM_{carry-over}}{QM_{inter}}, \quad (3.1.17)$$

que, sob a hipótese nula, possui distribuição F com 1 e n_1+n_2-2 graus de liberdade. Rejeita-se H_0 , ao nível de significância α , quando $F_c > F_{(\alpha, 1, n_1+n_2-2)}$. É importante lembrar que a distribuição F com 1 e ν graus de liberdade é igual ao quadrado de uma distribuição t -Student com ν graus de liberdade, ou seja, $F_c = T_c^2$. Portanto, a estatística F_c do teste acima é equivalente a estatística do teste T_c em (3.1.4).

Similarmente, a SQ_{dentro} também pode ser decomposta em três componentes: uma soma de quadrados para o efeito direto da droga, outra para o efeito de período e uma outra para o resíduo intra-indivíduos. Logo,

$$SQ_{dentro} = SQ_{droga} + SQ_{periodo} + SQ_{intra} \quad (3.1.18)$$

onde

$$\begin{aligned} SQ_{droga} &= \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} \left[\frac{1}{2} [(\bar{Y}_{.21} + \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.22} + \bar{Y}_{.12})] \right]^2, \\ SQ_{periodo} &= \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} \left[\frac{1}{2} [(\bar{Y}_{.21} + \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.12} + \bar{Y}_{.22})] \right]^2, \\ SQ_{intra} &= \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} Y_{ijk}^2 - \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} \frac{Y_{i.k}^2}{2} - \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \frac{Y_{.jk}^2}{n_k} + \sum_{k=1}^2 \frac{Y_{..k}^2}{2n_k}. \end{aligned}$$

As somas SQ_{droga} e $SQ_{periodo}$ possuem cada uma um grau de liberdade e SQ_{intra} tem n_1+n_2-2 graus de liberdade. Os valores esperados para os quadrados médios destas somas são

$$\begin{aligned} E(QM_{droga}) &= \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} \left[(F_T - F_R) + \frac{(C_R - C_T)}{2} \right]^2 + \sigma_e^2, \\ E(QM_{periodo}) &= \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} [P_2 - P_1]^2 + \sigma_e^2, \\ E(QM_{intra}) &= \sigma_e^2 = 2\sigma_d^2, \end{aligned}$$

Tabela 3.1.1: Tabela de Análise de Variância do modelo em(3.1.1) de um Delineamento Experimental *Crossover* 2 x 2.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrados	E(Quadrado Médio)	Dstatística F
Inter-indivíduos				
Carry-over	1	$SQ_{carry-over}$	$\frac{2n_1n_2}{n_1+n_2}(C_T - C_R)^2 + 2\sigma_s^2 + \sigma_e^2$	F_c
Resíduos	$n_1 + n_2 - 2$	SQ_{intra}	$2\sigma_s^2 + \sigma_e^2$	F_v
Intra-indivíduos				
Droga	1	SQ_{droga}	$\frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} \left[(F_T - F_R) + \frac{C_R - C_T}{2} \right]^2 + \sigma_e^2$	F_d^*
Período	1	$SQ_{periodo}$	$\frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} [P_2 - P_1]^2 + \sigma_e^2$	F_p
Resíduos	$n_1 + n_2 - 2$	SQ_{intra}	σ_e^2	
Total	$2(n_1 + n_2) - 1$	SQ_{total}		

* F_d é válido somente se $C_R = C_T$.

onde σ_d^2 é a variância amostral ponderada das diferenças dos períodos. Quando os efeitos de *carry-over* não apresentam diferenças significativas $C_R = C_T$, a hipótese nula em (3.1.10) pode ser testada através da seguinte estatística:

$$F_d = \frac{QM_{droga}}{QM_{intra}} \quad (3.1.19)$$

a qual tem distribuição F com 1 e $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade sob a hipótese nula. Adotando-se um nível de significância α , a hipótese nula é rejeitada quando $F_d > F_{(\alpha, 1, n_1 + n_2 - 2)}$. A estatística F_d é equivalente a estatística do teste T_d em (3.1.11), pois $F_d = T_d^2$. Portanto, ambos os testes apresentam a mesma conclusão.

A hipótese nula $H_0 : P_1 = P_2$ em (3.1.14) pode ser testada utilizando-se a estatística:

$$F_p = \frac{QM_{periodo}}{QM_{intra}} \quad (3.1.20)$$

que, sob a hipótese nula, apresenta uma distribuição F com 1 e $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade. Rejeita-se a hipótese nula, ao nível de significância α , quando $F_p > F_{(\alpha, 1, n_1 + n_2 - 2)}$.

A análise dos efeitos fixos do modelo em (3.1.1) de um planejamento experimental *crossover* 2 x 2 pode ser realizado através da análise de variância representada pela Tabela 3.1.1. Os programas em *SAS*, para a análise de variância dos efeitos do modelo do experimento *crossover* 2 x 2, estão apresentados no Apêndice.

Note que um planejamento experimental *crossover* 2 x 2 pode fornecer estimativas e testes para os efeitos de *carry-over*, efeito direto da droga e efeito de período. No entanto, este planejamento não possibilita o estudo de algumas interações, pois não há replicação das formulações para os voluntários. Portanto, para obter as estimativas de algumas interações, por exemplo, das interações de indivíduos por formulação, deve-se empregar um planejamento experimental *crossover* de ordem superior.

3.1.4 Análise Não-paramétrica

Quando as medidas farmacocinéticas na escala original ou transformadas de um experimento *crossover* 2 x 2 não satisfazem as pressuposições de normalidade e homogeneidade de variância, então as análises estatísticas dos efeitos fixos do experimento *crossover* 2 x 2 como em (3.1.1) devem ser realizadas através do teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Este teste emprega as somas dos postos das somas ou diferenças das observações dos indivíduos nos períodos 1 e 2. Jones e Kenward (1989) apresentaram a metodologia não-paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney para a análise dos efeitos fixos de um ensaio *crossover* 2 x 2.

O teste não-paramétrico para as hipóteses em (3.1.3) dos efeitos de *carry-over* é baseado nos postos dos totais individuais $U_{ik} = Y_{i1k} + Y_{i2k}$, $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2$ e pode ser realizado através do seguinte procedimento:

- (i) Calcule U_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2$;
- (ii) Ordene as medidas encontradas U_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$, em ordem crescente, atribuindo-lhes postos R_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$. No caso de observações com mesmo valor, são atribuídos postos médios;
- (iii) Obtenha W através da soma dos postos R_{ik} das medidas dos indivíduos da Sequência 1RT, isto é, $W = \sum_{i=1}^{n_1} R_{i1}$.

Sob a hipótese nula H_0 , tem-se que

$$E(W) = \frac{n_1(n_1 + n_2 + 1)}{2} \quad e \quad V(W) = \frac{1}{12}n_1n_2(n_1 + n_2 + 1 - Q), \quad (3.1.21)$$

onde

$$Q = \frac{1}{(n_1n_2)(n_1 + n_2 - 1)} \sum_{v=1}^q (r_v^3 - r_v),$$

q é o número de grupos com empates e r_v representa o tamanho do v -ésimo grupo.

Note que se não existem observações com empates, então $q = n_1 + n_2$, $r_v = 1$ para $v = 1, 2, \dots, n_1 + n_2$ e, portanto, $Q = 0$.

Para amostras pequenas, é aconselhável o uso do teste exato de Wilcoxon-Mann-Whitney, que é realizado baseando-se na hipótese nula da estatística W da soma dos postos. É importante lembrar que a distribuição da estatística das somas dos postos W é discreta, portanto alguns níveis de significância desejados podem não ser iguais aos níveis de significância exatos da distribuição sob a hipótese nula. Desta forma, considera-se o valor mais próximo do valor de significância desejado. Portanto, não se rejeita a hipótese nula, ao nível de significância α , quando

$$w_{(\alpha/2, n_1, n_2)} < W < w_{(1-\alpha/2, n_1, n_2)},$$

onde $w_{(1-\alpha/2, n_1, n_2)} = n_1(n_1 + n_2 + 1) - w_{(\alpha/2, n_1, n_2)}$.

Quando o tamanho da amostra é grande, pode-se utilizar a distribuição Normal como uma aproximação para a distribuição da estatística W da soma dos postos. Neste caso, as hipóteses podem ser testadas através de

$$Z = \frac{W - E(W)}{\sqrt{V(W)}} = \frac{W - \frac{n_1(n_1 + n_2 + 1)}{2}}{\sqrt{\frac{1}{12}n_1n_2(n_1 + n_2 + 1 - Q)}}, \quad (3.1.22)$$

onde

$$Q = \frac{1}{(n_1n_2)(n_1 + n_2 - 1)} \sum_{v=1}^q (r_v^3 - r_v),$$

q é o número de grupos com empates e r_v representa o tamanho do v -ésimo grupo.

Logo, a hipótese nula é rejeitada, ao nível de significância α , quando $|Z| > z_{\alpha/2}$, onde $z_{\alpha/2}$ é o $\alpha/2$ -ésimo percentil da distribuição Normal padrão.

Se a hipótese $H_0 : C_R = C_T$ não é rejeitada, pode-se testar as hipóteses em (3.1.10) do efeito direto da formulação, utilizando-se o posto das diferenças dos períodos $d_{ik} = 1/2(Y_{i2k} - Y_{i1k})$, $i = 1, 2, \dots, n_k$, $k = 1, 2$ e aplicando-se o procedimento descrito para a medida U_{ik} , para a obtenção da soma dos postos R_{ik} de d_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$. Após calcular a soma dos postos dos indivíduos da Sequência 1, $W = \sum_{i=1}^{n_1} R_{i1}$, pode-se aplicar novamente o teste não-paramétrico de Wilcoxon para as diferenças d_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$.

O teste não-paramétrico do efeito de período para as hipóteses em (3.1.14) pode ser aplicado na soma dos postos das diferenças cruzadas $O_{ik} = d_{ik}$ se o indivíduo for da seqüência 1(RT) e $O_{ik} = -d_{ik}$ se o indivíduo for da seqüência 2(TR), $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$. Após calcular as medidas de O_{ik} , pode-se aplicar o procedimento do teste não-paramétrico para obter a soma dos postos W das diferenças cruzadas para os indivíduos da Seqüência 1. A partir do valor observado da estatística W , o teste não-paramétrico pode ser aplicado para testar as hipóteses dos efeitos de período.

A análise não-paramétrica dos efeitos do modelo do experimento *crossover* 2 x 2 pode ser realizada através do programa em SAS, apresentado no Apêndice.

3.1.5 Análise Estatística na Presença do Efeito de *Carry-over* Significativo

Quando o efeito de *carry-over* é significativo $C_R \neq C_T$, então o planejamento experimental *crossover* 2 x 2 não é adequado, pois não é possível obter estimativas não-viciadas para os efeitos fixos do experimento. Por exemplo, o efeito da seqüência não pode ser estimado separadamente na presença do efeito de *carry-over*, pois existe o confundimento do efeito da seqüência com o de *carry-over*. Isto ocorre porque, em um planejamento experimental *crossover* 2 x 2, existem apenas 3 graus de liberdade para as 4 médias das formulações por período, onde um grau de liberdade é para o efeito de período, outro para o efeito de *carry-over* e o terceiro para a interação entre formulação e período, que é o efeito direto da formulação quando não existe efeito de *carry-over*.

Portanto, $\hat{F} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}$ é um estimador viciado para F na presença do efeito de *carry-over*, pois há o confundimento dos efeitos de *carry-over* com os efeitos direto das formulações R e T . Desta forma, um estimador não-viciado para o efeito direto da formulação F pode ser obtido utilizando-se apenas os dados do Período 1 do experimento *crossover* 2 x 2. Neste caso, é importante lembrar que a perda das informações referentes aos dados do Período 2 do experimento *crossover* 2 x 2 diminui a precisão estatística para o teste da comparação das formulações R e T . Isto ocorre porque a variabilidade inter-indivíduos σ_e^2 não é removida da variabilidade total dos dados, dada por $\sigma_e^2 + \sigma_s^2$. Além disso, devido ao experimento ter sido planejado para um experimento *crossover*, existe um número reduzido de indivíduos, o que também contribui para a diminuição do poder do teste. Portanto, para obter as vantagens de um experimento *crossover* e evitar os problemas devido à presença dos efeitos de *carry-over*, é importante a realização de um experimento *crossover* bem conduzido e com um período de *washout* suficiente para a completa eliminação do efeito da droga administrada no período anterior.

Jones e Kenward (1989) apontaram algumas razões que podem contribuir para a presença dos efeitos de *carry-over*:

- (i) o verdadeiro efeito de *carry-over* pode aparecer quando o período de *washout* entre dois períodos

de tratamento não foi o suficiente para os voluntários eliminarem os efeitos das formulações administradas no período anterior;

- (ii) o efeito de *carry-over* psicológico pode aparecer quando as atitudes dos voluntários no Período 2 dependem das suas experiências no Período 1 de tratamento. Isto pode ocorrer, por exemplo, quando os voluntários conhecem as formulações administradas;
- (iii) a interação entre formulação e período pode surgir quando o efeito da formulação depende do período em que foi administrada;
- (iv) os grupos de voluntários das seqüências 1(*RT*) e 2(*TR*) podem apresentar características, por exemplo idade ou sexo, as quais os tornam significativamente diferentes. Isto pode ocorrer na ausência de um processo adequado de aleatorização para a alocação dos voluntários às duas seqüências de tratamentos.

Se o efeito de *carry-over* é significativo mesmo tomando todas as devidas precauções, então deve-se utilizar apenas os dados do Período 1 do experimento *crossover* 2 x 2 para obter um estimador não viciado para o efeito direto das formulações. Este estimador pode ser obtido através da diferença das médias amostrais $\bar{Y}_{.12}$ e $\bar{Y}_{.11}$, ou seja,

$$E\{\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.11}\} = (\mu + P_1 + F_T) - (\mu + P_1 + F_R) = F_T - F_R = F.$$

Denote este estimador por $\hat{F}/C = \bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.11}$. Neste caso, $\hat{F}/C$ é um estimador não-viciado de F quando os efeitos de *carry-over* apresentam diferenças significativas. A variância de $\hat{F}/C$ é dada por

$$V(\hat{F}/C) = (\sigma_s^2 + \sigma_e^2) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right).$$

Baseando-se na variância $V(\hat{F})$ em (3.1.9), pode-se observar o aumento da variabilidade ocasionada pela perda do Período 2 do experimento *crossover* 2 x 2 na diferença das variâncias abaixo:

$$V(\hat{F}/C) - V(\hat{F}) = (\sigma_s^2 + \frac{\sigma_e^2}{2}) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right).$$

As hipóteses em (3.1.10) podem ser testadas através da estatística:

$$T_{F/C} = \frac{\hat{F}/C}{\hat{S}_1 \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}},$$

onde

$$S_1^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{i1k} - \bar{Y}_{.1k})^2.$$

Sob a hipótese nula $H_0 : F_R = F_T$, a estatística $T_{F/C}$ tem distribuição t com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade. Portanto, rejeita-se a hipótese nula, ao nível de significância α , quando $|T_{F/C}| > t_{(\alpha/2, n_1+n_2-2)}$.

Quando os efeitos de *carry-over* apresentam diferenças significativas, um intervalo de confiança de $(1 - \alpha) \times 100\%$ para F , utilizando-se apenas os dados do Período 1, pode ser obtidos como

$$\hat{F}/C \pm t_{(\alpha/2, n_1+n_2-2)} S_t \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}. \quad (3.1.23)$$

É importante frisar que, embora S_1^2 seja um estimador não-viciado de $\sigma_s^2 + \sigma_e^2$, as estimativas para σ_s^2 e σ_e^2 não podem ser encontradas separadamente quando são usados apenas os dados do Período 1 do experimento *crossover* 2 x 2.

Em estudos de bioequivalência, quando os efeitos de *carry-over* apresentam diferenças significativas, apenas os dados do Período 1 são utilizados para avaliar a bioequivalência das formulações R e T .

3.1.6 Exemplo Ilustrativo dos Métodos Paramétricos e Não-paramétricos

Com o intuito de ilustrar as inferências estatísticas mencionadas no decorrer deste capítulo, considere os dados de bioequivalência de n^2 27 de um planejamento experimental *crossover* 2 x 2, que estão disponíveis na página da internet [http : //www.fda.gov/cder/bioequivdata](http://www.fda.gov/cder/bioequivdata). Neste experimento, foi realizado com uma amostra aleatória de 14 voluntários sadios para um estudo de bioequivalência das formulações R e T de um medicamento anti-arritmia. Após a aleatorização, $n_1 = n_2 = 7$ voluntários foram alocados às seqüências RT e TR . A partir da coleta e processamento das amostras sanguíneas ao longo do tempo, as estimativas da medida farmacocinética ASC foram obtidas para cada um dos voluntários e estão apresentadas na Tabela 3.1.2.

Para uma análise preliminar dos dados, são apresentadas as Figuras 3.1.4 e 3.1.5 das ASC observadas para os indivíduos nos Períodos 1 e 2 em cada uma das seqüências 1(RT) e 2(TR) e a Figura 3.1.6 das médias amostrais das formulações T e R por período da Tabela 3.1.3. Observe através das Figuras 3.1.4 e 3.1.5 que a maioria dos indivíduos não apresentam grandes diferenças nas medidas observadas da ASC nos dois períodos. A Figura 3.1.6 das médias amostrais das formulações por período sugere que a interação entre formulação e período pode não ser significativa, o que indica que o efeito de *carry-over* pode não ser significativo no modelo do experimento *crossover* 2 x 2. No entanto, isto será verificado através de testes estatísticos apropriados.

Os efeitos fixos do modelo em (2.2.1) podem ser analisados utilizando-se os métodos paramétricos e não-paramétricos, como mostrado a seguir.

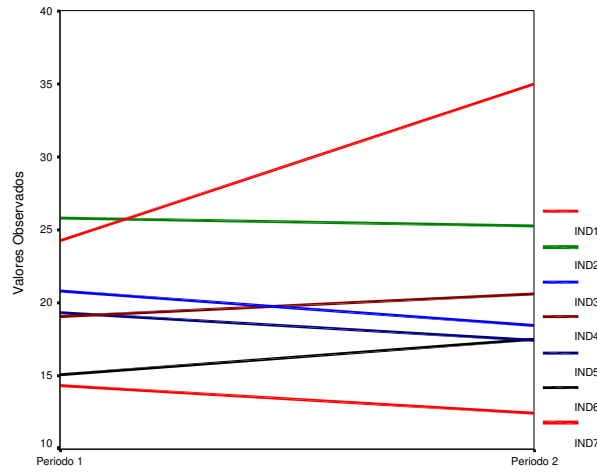


Figura 3.1.4: Valores Observados da *ASC* dos Indivíduos na Sequência 1(*RT*).

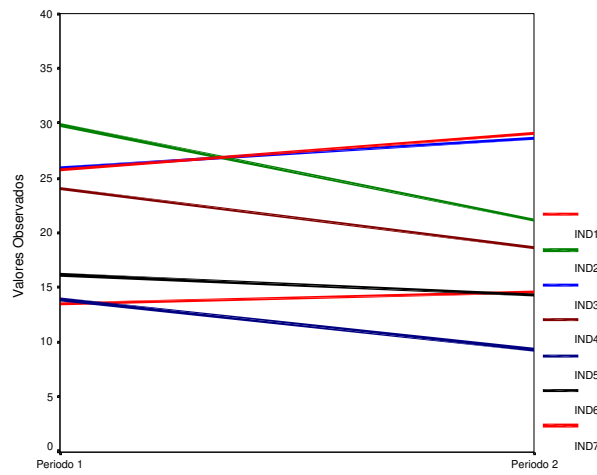


Figura 3.1.5: Valores Observados da *ASC* dos Indivíduos na Sequência 2(*TR*).

Tabela 3.1.2: *ASC* para as Formulações Teste *T* e Referência *R*.

Seqüência	Voluntário	Período 1	Período 2
1 (RT)	1	24,2	35
	3	25,8	25,3
	6	20,8	18,5
	7	19	20,6
	9	19,3	17,4
	12	15,1	17,5
	14	14,3	12,4
2(TR)	2	25,7	29,1
	4	29,8	21,1
	5	25,9	28,6
	8	24	18,6
	10	13,9	9,3
	11	16,2	14,3
	13	13,5	14,6

A - Análise Paramétrica

A Tabela 3.1.4 apresenta as estimativas das medidas empregadas na análise paramétrica dos efeitos fixos do modelo *crossover* 2 x 2.

Efeito de *Carry-over*

Para testar as hipóteses em (3.1.3) dos efeitos de *carry-over*, são necessárias as estimativas de $\bar{U}_{.1}$, $\bar{U}_{.2}$ e σ_u^2 da Tabela 3.1.4 e a estatística T_c em (3.1.4). Logo, aplicando-se o teste, tem-se que

$$T_c = \frac{\bar{U}_{.2} - \bar{U}_{.1}}{\hat{\sigma}_u \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} = \frac{40,657 - 40,742}{15,918 \sqrt{\left(\frac{1}{7} + \frac{1}{7}\right)}} = -0,001. \quad (3.1.24)$$

Portanto, a hipótese nula $H_0 : C_R = C_T$ não é rejeitada ao nível de 5% de significância, pois $|T_c| < t_{(0,025;12)} = 2,1788$. Desta forma, pode-se prosseguir a análise dos demais efeitos fixos do experimento *crossover* 2 x 2 utilizando-se os dados dos dois períodos do experimento *crossover* 2 x 2.

Tabela 3.1.3: Médias Amostrais para as Formulações Teste e Referência nos Períodos 1 e 2 de um Planejamento Experimental *Crossover*

Seqüência	Período 1	Período 2	Média da Seqüência
1(<i>RT</i>)	$\bar{Y}_{11} = 19,785$	$\bar{Y}_{21} = 20,957$	$\bar{Y}_{..1} = 20,371$
2(<i>TR</i>)	$\bar{Y}_{12} = 21,285$	$\bar{Y}_{22} = 19,372$	$\bar{Y}_{..2} = 20,328$
Média do Período	$\bar{Y}_{.1} = 20,536$	$\bar{Y}_{.2} = 20,164$	$\bar{Y}_{...} = 20,349$

Tabela 3.1.4: Os Totais e as Diferenças Individuais dos Dados da Tabela 3.1.2.

Seqüência	Indivíduo	U_{ik}	R_{ik}	d_{ik}	R_{ik}	O_{ik}	R_{ik}
1 (RT)	1	59,20	14	5,40	14	5,40	14
	3	51,10	11	-0,25	8	-0,25	7
	6	39,30	7	-1,15	4	-1,15	3
	7	39,60	8	0,80	10	0,80	8
	9	36,70	6	-0,95	6	-0,95	4,5
	12	32,60	5	1,20	11	1,20	10
	14	26,70	2	-0,95	6	-0,95	4,5
Soma dos	Postos da	Seqüência 1	53		59		51
Seqüência	Indivíduo	U_{ik}	R_{ik}	d_{ik}	R_{ik}	O_{ik}	R_{ik}
2 (TR)	2	54,80	13	1,70	13	-1,70	1
	4	50,90	10	-4,35	1	4,35	13
	5	54,50	12	1,35	12	-1,35	2
	8	42,60	9	-2,70	2	2,70	12
	10	23,20	1	-2,30	3	2,30	11
	11	30,50	4	-0,95	6	0,95	9
	13	28,10	3	0,55	9	-0,55	6
$\bar{U}_{.1} = 40,743$		$\bar{d}_{.1} = 0,586$		$\bar{O}_{.1} = 0,586$			
$\bar{U}_{.2} = 40,657$		$\bar{d}_{.2} = -0,957$		$\bar{O}_{.2} = 0,957$			
$\sigma_u^2 = 253,35$		$\sigma_d^2 = 5,252$		$\sigma_d^2 = 5,252$			

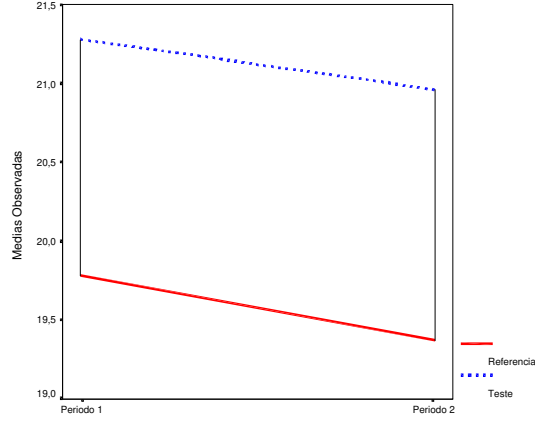


Figura 3.1.6: Médias Amostrais das Formulações R e T por Período.

Efeito Direto da Formulação

A partir da Tabela 3.1.4, tem-se que as estimativas de $\bar{d}_1$, $\bar{d}_2$ e σ_d^2 são, respectivamente, iguais a 0,586, -0,957 e 5,252. Logo, a estimativa de F é dada por $\hat{F} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2} = 1,543$. As hipóteses em (3.1.10), do efeito direto da formulação, podem ser testadas através da seguinte estatística:

$$T_d = \frac{\bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} = \frac{1,543}{2,291 \sqrt{\left(\frac{1}{7} + \frac{1}{7}\right)}} = 1,261. \quad (3.1.25)$$

Logo, como $|T_d| < t_{(0,025;12)} = 2,1788$, a hipótese $H_0 : F_R = F_T$ não é rejeitada ao nível de 5% de significância.

Efeito de Período

Baseando-se na Tabela 3.1.4, obtém-se que $\hat{O}_{.1} = 0,586$; $\hat{O}_{.2} = 0,957$ e $\hat{\sigma}_d^2 = 5,252$. Então, utilizando-se a estatística em (3.1.15), para testar as hipóteses em (3.1.14), tem-se que

$$T_p = \frac{-0,371}{2,291 \sqrt{\left(\frac{1}{7} + \frac{1}{7}\right)}} = -0,303. \quad (3.1.26)$$

Como $|T_p| < t_{(0,025;12)} = 2,1788$, não se rejeita a hipótese $H_0 : P_1 = P_2$ ao nível de 5% de significância.

As inferências para os efeitos fixos do modelo dado em (3.1.1) de um planejamento experimental *crossover* 2 x 2 são apresentadas na Tabela 3.1.5.

Tabela 3.1.5: Inferências Estatísticas dos Efeitos Fixos do modelo em(3.1.1).

Efeito	Estimativa do Efeito	Variância da Estimativa	Intervalo de Confiança de 95%	T	Valor p
<i>Carry-over</i>	-0,085	15,916	(-34,762;34,593)	-0.001	0.9898
Direto Droga	1,5431	2,292	(-3,451;6,537)	1,261	0.2318
Período	-0,371	2,292	(-5,365;4,622)	-0,303	0.7669

B - Análise de Variância

Os resultados obtidos através da análise de variância dos dados da *ASC* em escala original e logarítmica estão apresentados respectivamente nas Tabelas 3.1.6 e Tabela 3.1.7. O método da análise de variância é equivalente ao uso dos testes *t*, portanto as mesmas conclusões são obtidas em ambas as análises.

Tabela 3.1.6: Análise de Variância para *ASC* em escala original da Tabela 3.1.2.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	valor p
Inter-indivíduos					
<i>Carry-over</i>	1	0,0128	0,0128	0,00	0,9727
Resíduos	12	898,557	74,879	7,13	0,0009
Intra-indivíduos					
Formulação	1	16,662	16,662	1,59	0,2318
Período	1	0,966	0,966	0,09	0,7669
Resíduos	12	126,071	10,5059		
Total	27	1042,27			

Tabela 3.1.7: Análise de Variância para *ASC* em escala logarítmica

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	valor p
Inter-indivíduos					
<i>Carry-over</i>	1	0,004526	0,004526	0,22	0,6490
Resíduos	12	2,338421	0,194868	9,38	0,0002
Intra-indivíduos					
Formulação	1	0,038585	0,038585	1,86	0,1979
Período	1	0,013316	0,013316	0,64	0,4389
Resíduos	12	0,24923	0,020769		
Total	27	2,644078			

C - Análise Não-paramétrica

Utilizando-se as somas dos postos da Tabela 3.1.4, pode-se testar os efeitos fixos do modelo dado em (3.1.1) de um experimento *crossover* 2 x 2 através do teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Efeito de *Carry-over*

O teste não-paramétrico das hipóteses em (3.1.3) dos efeitos de *carry-over* é realizado através da soma dos postos R_{ik} das medidas de U_{ik} , para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ dos indivíduos da Sequência 1(RT). O valor da estatística da soma dos postos W para o teste do efeito de *carry-over* é igual a 53. Como o tamanho da amostra é pequeno ($n_1 + n_2 = 14$), deve-se empregar a versão exata do teste não-paramétrico de Wilcoxon. Os valores críticos $w_{(\alpha/2, n_1, n_2)}$ e $w_{(1-\alpha/2, n_1, n_2)}$, sob a hipótese nula, da estatística W podem ser obtidas através de tabelas (Hollander e Wolfe, 1973). Como a distribuição da estatística das somas dos postos W é discreta, alguns níveis de significância desejados podem não ser iguais aos níveis de significância exatos. Por exemplo, considere o nível de 5% de significância para o teste bilateral e os tamanhos amostrais $n_1 = 7$ e $n_2 = 7$, então o nível de significância exato mais próximo de $\alpha/2 = 0,025$ é 0,027. Neste caso, os valores de $w_{(0,027;7;7)}$ e $w_{(0,973;7;7)}$ são iguais a 37 e 68, respectivamente. Portanto, se o valor observado da estatística W da

soma dos postos é menor que 37, ou é maior que 68, a hipótese nula é rejeitada ao nível de 5,4% de significância. Então, como o valor observado da estatística W é 53 para o teste não-paramétrico do efeito de *carry-over*, a hipótese nula $H_0 : C_R = C_T$ não é rejeitada ao nível de 5,4% de significância.

Efeito Direto da Formulação

Para o teste não-paramétrico das hipóteses em (3.1.10) do efeito direto da droga, pode-se obter através da Tabela 3.1.4 a estimativa igual a 59 para a estatística da soma dos postos W de d_{ik} , para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ para os indivíduos da Sequência 1. Neste caso, comparando-se os valores críticos da estatística W , sob a hipótese nula, $w_{(0,027;7;7)} = 37$ e $w_{(0,973;7;7)} = 68$, não se rejeita a hipótese nula $H_0 : F_R = F_T$ ao nível de 5,4% de significância.

Efeito de Período

Baseando-se na Tabela 3.1.4, tem-se que o valor observado da estatística da soma dos postos W de O_{ik} , para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ para o teste não-paramétrico de Wilcoxon das hipóteses em (3.1.14) é igual a 51. A partir dos valores $w_{(0,027;7;7)} = 37$ e $w_{(0,973;7;7)} = 68$, sob a hipótese nula, da estatística de Wilcoxon. Portanto, a hipótese $H_0 : P_1 = P_2$ não é rejeitada ao nível de 5,4% de significância.

3.2 Experimentos *Crossover* de Ordem Superior para Duas Formulações

Nas próximas seções, serão brevemente apresentadas as análises dos efeitos dos modelos de experimento *crossover* de ordem superior, que foram abordados na Seção 2.2.3 do Capítulo 2.

Devido à existência de pelo menos uma replicação de uma das formulações testadas para cada um dos indivíduos, permite estimar a variabilidade intra-indivíduos para as formulações R e T e os efeitos, a partir de contrastes, dentro dos indivíduos.

3.2.1 Experimento *Crossover* 4 x 2

Como este experimento *crossover* possui 8 médias de seqüências por período, então existem 7 graus de liberdade, que podem ser decompostos como apresentado a seguir.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Efeito de Seqüência	3
Efeito de Formulação	1
Efeito de Período	1
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Interação Formulação x <i>Carry-over</i>	1
Total	7

Assumindo-se que não existe interação entre formulação e *carry-over* no modelo em (2.2.3) de um experimento *crossover* de 4 x 2, obtem-se mais um grau de liberdade para os resíduos intra-indivíduos. Conseqüentemente, os graus de liberdade da tabela de análise de variância para um experimento de Balaam estão distribuídos como na Tabela 3.2.8. Baseando-se nos graus de liberdade dessa tabela, pode-se observar que este planejamento permite estimar o efeito direto da formulação na presença do efeito de *carry-over*.

Tabela 3.2.8: Graus de Liberdade da tabela ANOVA para um experimento de Balaam.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Inter-indivíduos	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 1$
Efeito de Seqüência	3
Resíduos	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 4$
Intra-indivíduos	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4$
Efeito de Período	1
Efeito de Formulação	1
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Resíduos	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 3$
Total	$2(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) - 1$

Para a análise deste experimento, considera-se que

$$d_{ik} = \frac{1}{2}(Y_{i2k} - Y_{i1k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k; \quad k = 1, 2, 3, 4.$$

Sob as pressuposições de normalidade e de que $\sigma_T^2 = \sigma_R^2 = \sigma_e^2$, os valores esperados e as variâncias das médias de d_{ik} são

$$E(\bar{d}_{ik}) = \begin{cases} \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + C_T] & , \text{para os indivíduos da Sequência 1} \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + C_R] & , \text{para os indivíduos da Sequência 2} \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + C_R] & , \text{para os indivíduos da Sequência 3} \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_R - F_T) + C_T] & , \text{para os indivíduos da Sequência 4,} \end{cases}$$

$$\text{e } V(\bar{d}_{ik}) = \frac{1}{2n_k}\sigma_e^2.$$

Como $E(\bar{d}_{.3} - \bar{d}_{.4}) = F_T - F_R + 1/2(C_R - C_T)$ e $E(\bar{d}_{.2} - \bar{d}_{.1}) = 1/2(C_R - C_T)$, então tem-se que $E[(\bar{d}_{.3} - \bar{d}_{.4}) - (\bar{d}_{.2} - \bar{d}_{.1})] = F_T - F_R = F$. Logo, tem-se que o melhor estimador não-viciado para F/C para o experimento A é dado por

$$\hat{F}/C = (\bar{d}_{.3} - \bar{d}_{.4}) - (\bar{d}_{.2} - \bar{d}_{.1}).$$

Como $\bar{d}_{.k}, k = 1, 2, 3$ e 4 , são independentes entre si, a variância da estimativa de F/C pode ser calculada como $V(\hat{F}/C) = (1/2)\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right)$.

Como $F = F_T - F_R$ e $F_T + F_R = 0$, tem-se que $F_T = 1/2F$ e $F_R = -1/2F$. Portanto, os estimadores de μ_T e μ_R são, respectivamente, iguais a $\bar{Y}_T = \bar{Y}_{...} + 1/2(\hat{F}/C)$ e $\bar{Y}_R = \bar{Y}_{...} - 1/2(\hat{F}/C)$, onde $\bar{Y}_{...} = (1/8) \sum_{k=1}^4 \sum_{j=1}^2 \bar{Y}_{.jk}$ é o estimador não-viciado para a média geral μ .

A análise do efeito de *carry-over* pode ser realizada através do seguinte estimador:

$$\hat{C}/F = 2(\bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}) = [(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.12})],$$

que possui variância igual a $V(\hat{C}/F) = 2\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right)$.

Portanto, a hipótese nula $H_0 : C_T = C_R$ é rejeitada, ao nível de significância α , quando

$$|T_C| = \left| \frac{\hat{C}/F}{S \sqrt{2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \right| > t_{(\alpha/2, n_1+n_2+n_3+n_4-3)}$$

onde S^2 é o erro quadrático médio intra-indivíduos da tabela de Análise de Variância do modelo do experimento de Balaam.

Se a hipótese nula não for rejeitada, então o estimador não-viciado para F pode ser obtido através das médias das seqüências por período das duas últimas seqüências do experimento. Portanto, $\hat{F} = \bar{d}_{.3} - \bar{d}_{.4}$, cuja variância pode ser calculada por $V(\hat{F}) = (1/2)\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right)$.

Através deste experimento, pode-se calcular as variâncias intra-indivíduos para as formulações T e R , utilizando-se a soma das diferenças das seqüências 1 e 2, como apresentado abaixo:

$$\hat{\sigma}_T^2 = \frac{2 \sum_{i=1}^{n_1} (d_{i1} - \bar{d}_{.1})^2}{n_1 - 1}, \quad \hat{\sigma}_R^2 = \frac{2 \sum_{i=1}^{n_2} (d_{i2} - \bar{d}_{.2})^2}{n_2 - 1}.$$

3.2.2 Experimento *Crossover* 2 x 3

Um experimento *crossover* 2 x 3 possui 6 médias de seqüência por período, portanto existem 5 graus de liberdade, que podem ser decompostos em

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Efeito de Seqüência	1
Efeito de Formulação	1
Efeito de Período	2
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Total	5

A Tabela 3.2.9 apresenta a distribuição dos graus de liberdade na tabela de Análise de Variância para um delineamento *crossover* 2 x 3. Devido aos graus de liberdade que existem para esse experimento, é possível estimar o efeito direto da formulação mesmo na presença do efeito de *carry-over*.

Para analisar este experimento *crossover*, é importante definir as diferenças dos períodos como:

$$d_{ik} = \frac{1}{4}(2Y_{i1k} - Y_{i2k} - Y_{i3k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k, \quad k = 1, 2.$$

Tabela 3.2.9: Graus de Liberdade da tabela ANOVA para um experimento *crossover* 2 x 3.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Inter-indivíduos	$n_1 + n_2 - 1$
Efeito de Seqüência	1
Resíduos	$n_1 + n_2 - 2$
Intra-indivíduos	$2(n_1 + n_2)$
Efeito de Período	2
Efeito de Formulação	1
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Resíduos	$2(n_1 + n_2 - 2)$
Total	$3(n_1 + n_2) - 1$

Sob as pressuposições de normalidade e de $\sigma_T^2 = \sigma_R^2 = \sigma_e^2$, os valores esperados e as variâncias de d_{ik} são

$$E(d_{ik}) = \begin{cases} \frac{1}{2}(F_T - F_R) + \frac{3}{4}P_1, & \text{para os indivíduos da Seqüência 1} \\ \frac{1}{2}(F_R - F_T) + \frac{3}{4}P_1, & \text{para os indivíduos da Seqüência 2} \end{cases}$$

$$\text{e } V(d_{ik}) = \sigma_d^2.$$

Portanto, tem-se que o melhor estimador não-viciado para o efeito direto da formulação F para um experimento *crossover* 2 x 3 é dado por $\hat{F} = (1/4)[(2\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31}) - (2\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32})]$. A esperança e a variância de $\hat{F}$ são, respectivamente, iguais a $E(\hat{F}) = F_T - F_R = F$ e $V(\hat{F}) = (3/8)\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$.

As estimativas não-viciadas para a média geral μ e para σ_d^2 podem ser obtidas através de

$$\bar{Y}_{...} = \frac{1}{6} \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^3 \bar{Y}_{.jk}, \quad \hat{\sigma}_d^2 = \frac{\sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (d_{ik} - \bar{d}_{.k})^2}{n_1 + n_2 - 2}.$$

Como $F = F_T - F_R$ e $F_T + F_R = 0$, tem-se que $F_T = 1/2F$ e $F_R = -1/2F$. Portanto, os estimadores para as médias μ_T e μ_R são, respectivamente, iguais a $\bar{Y}_T = \bar{Y}_{...} + 1/2\hat{F}$ e $\bar{Y}_R = \bar{Y}_{...} - 1/2\hat{F}$.

Sob a pressuposição de normalidade de S_{ik} e e_{ijk} , o melhor estimador não-viciado para o efeito

de *carry-over* $C = C_T - C_R$ pode ser obtido utilizando-se contrastes lineares das médias das seqüências por período, ou seja, $\hat{C} = 1/2[(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32})]$.

É importante lembrar que o produto dos coeficientes dos contrastes lineares de $\hat{F}$ e $\hat{C}$ é nulo, indicando que $\hat{C}$ é independente de $\hat{F}$. A variância de $\hat{C}$ pode ser calculada através de $V(\hat{C}) = (1/2)\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$.

Portanto, o efeito de *carry-over* pode ser testado através da seguinte estatística:

$$T_C = \frac{\hat{C}}{S \sqrt{\frac{1}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}},$$

onde S^2 é a erro quadrático médio intra-indivíduos da tabela de Análise de Variância do modelo do experimento *crossover* 2 x 3. Logo, rejeita-se a hipótese nula $H_0 : C_T = C_R$, ao nível de significância α , quando $|T_C| > t_{(\alpha/2, 2(n_1+n_2-2))}$.

As variâncias intra-indivíduos para as formulações T e R para este experimento são calculadas através dos seguintes contrastes intra-indivíduos:

$$g_{ik} = (Y_{i2k} - Y_{i3k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k \quad e \quad k = 1, 2.$$

Desta forma, estimativas não viciadas para σ_T^2 e σ_R^2 podem ser calculadas a partir de

$$\hat{\sigma}_T^2 = \frac{1}{2(n_1 - 1)} \sum_{i=1}^{n_1} (g_{i1} - \bar{g}_{.1})^2, \quad \hat{\sigma}_R^2 = \frac{1}{2(n_2 - 1)} \sum_{i=1}^{n_2} (g_{i2} - \bar{g}_{.2})^2.$$

3.2.3 Experimento *Crossover* 2 x 4

Existem 6 graus de liberdade que estão associados à análise de um experimento *crossover* 2 x 4. A tabela abaixo mostra como estes graus de liberdade podem ser decompostos:

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Efeito de Seqüência	1
Efeito de Formulação	1
Efeito de Período	3
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Total	6

A Tabela 3.2.10 apresenta a distribuição dos graus de liberdade na tabela de Análise de Variância para um experimento *crossover* 2 x 4. Este experimento permite que o efeito direto da formulação seja estimado mesmo na presença do efeito de *carry-over*.

Tabela 3.2.10: Graus de Liberdade da tabela ANOVA para um experimento *crossover* 2 x 4.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Inter-indivíduos	$n_1 + n_2 - 1$
Efeito de Seqüência	1
Resíduos	$n_1 + n_2 - 2$
Intra-indivíduos	$3(n_1 + n_2)$
Efeito de Período	3
Efeito de Formulação	1
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Resíduos	$3(n_1 + n_2) - 5$
Total	$4(n_1 + n_2) - 1$

Sob a pressuposição de normalidade e independência de e_{jk} e S_{ik} , o melhor estimador não-viciado para F/C é dado por $\hat{F}/C = (1/20)[(6\bar{Y}_{.11} - 3\bar{Y}_{.21} - 7\bar{Y}_{.31} + 4Y_{.41}) - (6\bar{Y}_{.12} - 3\bar{Y}_{.22} - 7\bar{Y}_{.32} + 4Y_{.42})]$, cuja variância é igual a $V(\hat{F}/C) = (11/40)\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$.

Como $F = F_T - F_R$ e $F_T + F_R = 0$, tem-se que $F_T = 1/2F$ e $F_R = -1/2F$. Portanto, os estima-

dores para as médias μ_T e μ_R são, respectivamente, iguais a $\bar{Y}_T = \bar{Y}_{...} + 1/2\hat{F}$ e $\bar{Y}_R = \bar{Y}_{...} - 1/2\hat{F}$.

As diferenças dos períodos são definidas como:

$$d_{ik} = \frac{1}{20}(6Y_{i1k} - 3Y_{i2k} - 7Y_{i3k} + Y_{i4k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k, \quad k = 1, 2.$$

Logo, os estimadores não viciados para F e σ_d^2 podem ser, respectivamente, iguais a

$$\bar{d} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}, \quad \hat{\sigma}_d^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (d_{ik} - \bar{d}_{.k})^2.$$

Utilizando-se contrastes lineares das médias das seqüências por período de um experimento *crossover* 2 x 4, pode-se obter o seguinte estimador não viciado para o efeito de *carry-over*:

$$\hat{C}/F = \frac{1}{5}[(\bar{Y}_{.11} + 2\bar{Y}_{.21} - 2\bar{Y}_{.31} - \bar{Y}_{.41}) - (\bar{Y}_{.12} + 2\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32}) - \bar{Y}_{.41}],$$

que possui variância igual a $V(\hat{C}/F) = 2/5\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$.

Portanto, a hipótese nula $H_0 : C_T = C_R$ pode ser testada através da seguinte estatística:

$$T_C = \frac{\hat{C}/F}{S \sqrt{\frac{2}{5} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}},$$

onde S^2 é o erro quadrático médio intra-indivíduos da tabela de Análise de Variância do modelo do experimento *crossover* 2 x 4. Logo, rejeita-se a hipótese nula, ao nível de significância α , quando $|T_C| > t_{(\alpha/2, 3(n_1+n_2)-5)}$.

Quando os efeitos de *carry-over* não são significativos, então um estimador não-viciado para F pode ser dado por $\hat{F} = (1/4)[(\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31} + \bar{Y}_{.41}) - (\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32} + \bar{Y}_{.42})]$, que tem variância igual a $V(\hat{F}) = (1/4)\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$.

Chow e Liu mostram que as estimativas das variâncias intra-indivíduos para as formulações T e R podem ser calculadas a partir dos seguintes contrastes intra-indivíduos, que são definidos como:

$$D_{1ik} = (Y_{i1k} - Y_{i4k}), \quad D_{2ik} = (Y_{i2k} - Y_{i3k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k; \quad k = 1, 2.$$

Como D_{1ik} e D_{2ik} são independentes, então os estimadores de σ_T^2 e σ_R^2 são, respectivamente, iguais a

$$\hat{\sigma}_T^2 = \frac{1}{2(n_1 + n_2 - 2)} \left(\sum_{i=1}^{n_1} (D_{1i1} - \bar{D}_{1.1})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (D_{2i2} - \bar{D}_{2.2})^2 \right),$$

$$\hat{\sigma}_R^2 = \frac{1}{2(n_1 + n_2 - 2)} \left(\sum_{i=1}^{n_1} (D_{2i1} - \bar{D}_{2,1})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (D_{1i2} - \bar{D}_{1,2})^2 \right),$$

onde

$$\bar{D}_{h,k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} D_{hik}, \quad h = 1, 2, \quad k = 1, 2.$$

3.2.4 Experimento *Crossover* 4 x 4

Um experimento *crossover* 4 x 4 possui 12 graus de liberdade, que podem ser decompostos da seguinte forma:

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Efeito de Seqüência	1
Efeito de Formulação	1
Efeito de Período	3
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Interação Formulação x <i>Carry-over</i>	1
Interação Formulação x Período	3
Contraste Seqüência x Período	2
Total	12

A Tabela 3.2.11 mostra como os graus de liberdade são decompostas na tabela de Análise de Variância para um delineamento *crossover* 4 x 4. O uso deste experimento permite que o efeito direto da formulação possa ser estimado até mesmo na presença do efeito de *carry-over*.

Este experimento possibilita a análise do efeito direto da formulação na presença do efeito de *carry-over*. Utilizando-se contrastes lineares das médias de seqüências por período, obtem-se o melhor estimador não-viciado para o efeito direto da formulação F , dado por

$$\hat{F} = \frac{1}{8} [(\bar{Y}_{.11} + \bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31} + Y_{.41}) - (\bar{Y}_{.12} + \bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32} - Y_{.42}) + (\bar{Y}_{.13} - \bar{Y}_{.23} - \bar{Y}_{.33} + Y_{.43}) - (\bar{Y}_{.14} - \bar{Y}_{.24} - \bar{Y}_{.34} + Y_{.44})],$$

que tem variância dada por $V(\hat{F}) = (1/16)\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right)$.

Tabela 3.2.11: Graus de Liberdade da tabela ANOVA para um experimento *crossover* 4 x 4.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Inter-indivíduos	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 1$
Efeito de Seqüência	3
Resíduos	$n_1 + n_2 n_3 + n_4 - 4$
Intra-indivíduos	$3(n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$
Efeito de Período	3
Efeito de Formulação	1
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Resíduos	$3(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) - 5$
Total	$4(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) - 1$

Para estimativar as variâncias intra-indivíduos para as formulações T e R , é necessário definir os seguintes contrastes intra-indivíduos:

$$\begin{aligned}
 D_{1ik} &= (Y_{i1k} - Y_{i2k}); & k = 1, 2; \\
 D_{2ik} &= (Y_{i3k} - Y_{i4k}); & k = 1, 2; \\
 D_{3ik} &= (Y_{i1k} - Y_{i4k}); & k = 3, 4; \\
 D_{4ik} &= (Y_{i2k} - Y_{i3k}); & k = 3, 4.
 \end{aligned}$$

Desta forma, Chow e Liu (2000) apresentam que os estimadores não-viciados para σ_T^2 e σ_R^2 são iguais a

$$\begin{aligned}
 \hat{\sigma}_T^2 &= \frac{1}{2(N-4)} \left(\sum_{i=1}^{n_1} (D_{1i1} - \bar{D}_{1,1})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (D_{2i2} - \bar{D}_{2,2})^2 + \sum_{i=1}^{n_3} (D_{3i3} - \bar{D}_{3,3})^2 + \sum_{i=1}^{n_4} (D_{4i4} - \bar{D}_{4,4})^2 \right), \\
 \hat{\sigma}_R^2 &= \frac{1}{2(N-4)} \left(\sum_{i=1}^{n_1} (D_{2i1} - \bar{D}_{2,1})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (D_{1i2} - \bar{D}_{1,2})^2 + \sum_{i=1}^{n_3} (D_{4i3} - \bar{D}_{4,3})^2 + \sum_{i=1}^{n_4} (D_{3i4} - \bar{D}_{3,4})^2 \right),
 \end{aligned}$$

onde

$$\begin{aligned}
 N &= n_1 + n_2 + n_3 + n_4 \\
 \bar{D}_{h,k} &= \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} D_{hik}, \quad h = 1, 2, 3 \text{ e } 4; \quad k = 1, 2, 3 \text{ e } 4.
 \end{aligned}$$

3.2.5 Exemplo Ilustrativo

Como exemplo ilustrativo dos métodos apresentados na seção anterior, considere os dados da medida farmacocinética C_{max} de um experimento *crossover* 2 x 3, que estão apresentados na Tabela 3.2.12. Neste experimento, $n_1 = 10$ indivíduos foram alocados aleatoriamente à sequência 1 (TRR) e $n_2 = 10$, à sequência 2 (RTT). Estes dados são referentes a Droga n^o 15, que está disponível na internet no endereço: <http://www.fda.gov/cder/bioequivdata>. As médias de sequência por período estão apresentadas na Tabela 3.2.13.

A estimativa do efeito direto da formulação F pode ser calculada por $\hat{F} = (1/4)[(2\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31}) - (2\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32})] = (1/4) = 16,08 + 2,939 = 3,285$. A estimativa da variância de $\hat{F}$ é dada por $\hat{V}(\hat{F}) = (3/8)S^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) = (3/8)98,758(0,2) = 7,407$. Portanto, os limites do intervalo de confiança de 90% para F são $[-2,158; 8,723]$.

A estimativas para a média geral μ pode ser calculada através de

$$\hat{\mu} = \bar{Y}_{...} = \frac{1}{6} \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^3 \bar{Y}_{.jk} = 39,898.$$

Portanto, as estimativas das médias μ_T e μ_R são, respectivamente, iguais a $\bar{Y}_T = \bar{Y}_{...} + 1/2\hat{F} = 39,898 + 1,644 = 41,54$ e $\bar{Y}_R = \bar{Y}_{...} - 1/2\hat{F} = 39,898 - 1,644 = 38,25$.

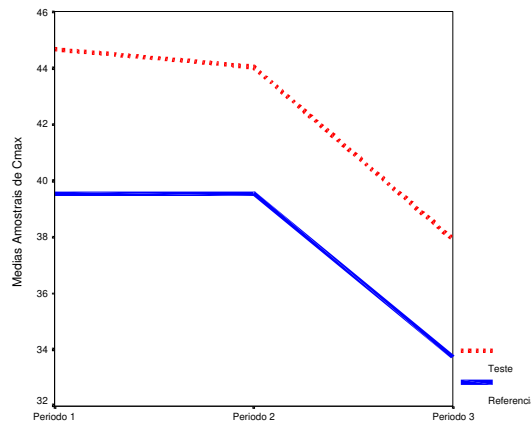


Figura 3.2.7: Médias Amostrais de Sequência por Período das Formulações R e T .

Através da Figura 3.2.7 das médias amostrais de sequência por período de C_{max} , pode-se observar que as retas das formulações T e R não se cruzam, indicando que o efeito de *carry-*

Tabela 3.2.12: Dados de C_{max} e Contrastes Intraindivíduos.

Indivíduo	Seqüência	Período 1	Período 2	Período 3	d_{ik}	g_{ik}
2	1	69,00	49,70	51,50	9,20	-1,80
7	1	32,40	36,30	26,00	0,63	10,30
10	1	34,90	26,30	18,00	6,38	8,30
16	1	63,40	66,00	53,00	1,95	13,00
18	1	30,40	39,50	33,30	-3,00	6,20
24	1	26,20	32,50	22,00	-0,53	10,50
26	1	28,50	36,10	34,10	-3,30	2,00
31	1	27,20	18,00	21,80	3,65	-3,80
34	1	54,40	29,70	42,00	9,28	-12,30
38	1	80,30	61,30	35,50	15,95	25,80
1	2	59,90	47,40	11,90	15,13	35,50
8	2	61,20	50,70	54,30	4,35	-3,60
9	2	20,06	31,66	28,19	-4,93	3,47
15	2	55,00	55,20	76,30	-5,38	-21,10
17	2	21,70	36,20	27,60	-5,10	8,60
23	2	40,80	48,60	42,30	-2,33	6,30
25	2	35,90	29,90	26,80	3,78	3,10
32	2	38,20	37,40	37,00	0,50	0,40
33	2	38,90	71,80	50,40	-11,10	21,40
37	2	23,50	31,40	24,40	-2,20	7,00

Tabela 3.2.13: Médias de Seqüência por Período da Tabela 3.2.12 .

Seqüência	Período 1	Período 2	Período 3	Médias
1	44,670	39,540	33,720	$Y_{..1} = 39,310$
2	39,516	44,026	37,919	$Y_{..2} = 40,487$
Médias	$Y_{.1.} = 42,093$	$Y_{.2.} = 41,783$	$Y_{.3.} = 35,820$	$Y_{...} = 39,899$

over pode não significativo. Utilizando-se contrastes lineares das médias das seqüências por período, pode-se estimar o efeito de *carry-over* $C = C_T - C_R$ por $\hat{C} = 1/2[(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32})] = 1/2(5,82 - 6,101) = -0,1405$. A estimativa de $V(\hat{C})$ pode ser calculada por $\hat{V}(\hat{C}) = (1/2)\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) = (1/2)98,758(0,2) = 9,876$. Logo, sob pressuposição de normalidade,

Tabela 3.2.14: Análise dos Efeitos Fixos do Modelo do Experimento *Crossover* 2 x 3.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Valor do teste F	valor-p do teste
Seqüência	1	0,001	0,9686
Período	2	2,95	0,1412
Formulação	1	2,60	0,1917
<i>Carry-over</i>	1	0,002	0,9531

a hipótese nula $H_0 : C = C_T - C_R = 0$ pode ser testada através da seguinte estatística:

$$T_C = \frac{\hat{C}}{S \sqrt{\frac{1}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} = \frac{-0,1405}{\sqrt{9,876}} = -0,0447,$$

Como $|T_C| < t_{(0,025,36)} = 2,021$, a hipótese nula $H_0 : C_T = C_R$ não é rejeitada ao nível de 5% de significância. Portanto, o efeito de *carry-over* não é significativo.

A análise preliminar dos efeitos fixos do modelo em (2.2.3) podem ser realizada utilizando o *PROC MIXED* do *SAS* e os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 3.2.14. Observe que todos os efeitos fixos do modelo não significativos ao nível de 5% de significância.

A partir dos contrastes intra-indivíduos da Tabela 3.2.12,

$$g_{ik} = (Y_{i2k} - Y_{i3k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k \quad e \quad k = 1, 2,$$

pode-se calcular as estimativas de σ_T^2 e σ_R^2 da seguinte forma:

$$\hat{\sigma}_T^2 = \frac{1}{2(10-1)} \sum_{i=1}^{10} (g_{i1} - \bar{g}_{.1})^2 = 55,142, \quad \hat{\sigma}_R^2 = \frac{1}{2(10-1)} \sum_{i=1}^{10} (g_{i2} - \bar{g}_{.2})^2 = 55,241.$$

3.3 Medida Farmacocinética na Escala Logarítmica

Na Resolução n° . 898, de 29 de maio de 2003, a *ANVISA* recomenda que a análise de bioequivalência das medidas farmacocinética ASC e C_{max} seja realizada com os dados em escala logarítmica. Devido à limitação do tamanho da amostra em estudos de bioequivalência, não é possível realizar uma determinação confiável para a distribuição dos dados. A *ANVISA* apresenta duas justificativas para a utilização da transformação logarítmica:

- (i) Como uma comparação preliminar geralmente é a análise da razão das médias de ASC ou C_{max} , ao invés da diferença, então a análise da diferença das médias em escala logarítmica pode ser retransformada para a razão de médias em escala original;
- (ii) Westlake (1973, 1988) observou que o modelo multiplicativo para o experimento *crossover* pode ser mais adequado para as medidas farmacocinéticas ASC e C_{max} de um estudo de biodisponibilidade, devido à velocidade de absorção e eliminação da formulação.

Considere, por simplicidade, o modelo multiplicativo de um experimento *crossover* 2 x 2:

$$X_{ijk} = \tilde{\mu} \tilde{S}_{ik} \tilde{P}_j \tilde{F}_{(j,k)} \tilde{C}_{(j-1,k)} \tilde{e}_{ijk}, \quad (3.3.27)$$

ou o seguinte modelo com transformação logarítmica:

$$Y_{ijk} = \ln(X_{ijk}) = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk}, \quad (3.3.28)$$

onde Y_{ijk} , μ , S_{ik} , P_j , $F_{(j,k)}$, $C_{(j-1,k)}$ e e_{ijk} são os mesmos apresentados na Seção 3.1. Pode-se notar as seguintes relações entre os dois modelos: $\tilde{\mu} = \exp(\mu)$, $\tilde{S}_{ik} = \exp(S_{ik})$, $\tilde{P}_j = \exp(P_j)$, $\tilde{F}_{(j,k)} = \exp(F_{(j,k)})$, $\tilde{C}_{(j-1,k)} = \exp(C_{(j-1,k)})$ e $\tilde{e}_{ijk} = \exp(e_{ijk})$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $j = k = 1, 2$. Sob as pressuposições que S_{ik} e e_{ijk} são independentes e normalmente distribuídos com médias iguais a zero e variâncias, respectivamente, iguais a σ_s^2 e σ_e^2 , então a medida farmacocinética X_{ijk} na escala original apresenta um modelo linear lognormal, que pode ser escrito como:

$$X_{ijk} = \exp(\mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk}). \quad (3.3.29)$$

O vetor bivariado de observações do i -ésimo indivíduo, na k -ésima seqüência, que é representado por $(X_{i1k}, X_{i2k})'$, apresenta distribuição lognormal bivariada, pois $(Y_{i1k}, Y_{i2k})' = (\ln X_{i1k}, \ln X_{i2k})'$ tem distribuição Normal com vetor de médias μ_k e matriz de variância-covariância Σ_k para $k = 1, 2$ como apresentado na Seção 2.2.2 (Crow e Shimizu, 1988).

A Tabela 3.3.15 apresenta as médias e as medianas de X_{ijk} por seqüência e período, considerando-se que não existe efeito de *carry-over*. Note que as médias de X_{ijk} não contêm apenas os efeitos fixos, mas também as variabilidades inter e intra-indivíduos na escala logarítmica. No entanto, as medianas de X_{ijk} possuem apenas os efeitos fixos.

Tabela 3.3.15: Médias e Medianas de X_{ijk} por seqüência e período.

Seqüência		Período I	Período II
1(RT)	Média	$\exp(\alpha_{11} + (1/2)(\sigma_T^2 + \sigma_s^2))$	$\exp(\alpha_{12} + (1/2)(\sigma_R^2 + \sigma_s^2))$
	Mediana	$\exp(\alpha_{11})$	$\exp(\alpha_{12})$
2(TR)	Média	$\exp(\alpha_{21} + (1/2)(\sigma_R^2 + \sigma_s^2))$	$\exp(\alpha_{22} + (1/2)(\sigma_T^2 + \sigma_s^2))$
	Mediana	$\exp(\alpha_{21})$	$\exp(\alpha_{22})$

onde $\alpha_{11} = \mu + P_1 + F_T, \alpha_{12} = \mu + P_2 + F_R, \alpha_{21} = \mu + P_1 + F_R$ e $\alpha_{22} = \mu + P_2 + F_T$.

3.3.1 Estimador de Máxima Verossimilhança

Em estudos de bioequivalência, a razão de biodisponibilidade média na escala original pode ser utilizada, pois apresenta o efeito da diferença entre as formulações. Logo,

$$\delta = \tilde{F} = \exp(F) = \exp(\mu + F_T - \mu - F_R) = \frac{\mu + \exp(F_T)}{\mu + \exp(F_R)} = \frac{\tilde{\mu} \tilde{F}_T}{\tilde{\mu} \tilde{F}_R} = \frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R},$$

onde $\tilde{F} = \exp(F)$, $F = F_T - F_R$ e $\tilde{\mu}_T$ e $\tilde{\mu}_R$ são as médias geométricas de T e R . A estimativa de $\delta = \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R$, para os dados não-transformados, pode ser obtida através da transformação inversa da estimativa encontrada na escala logarítmica.

Baseando-se na medida farmacocinética em escala logarítmica, considere

$$\hat{F} = \bar{Y}_T - \bar{Y}_R = 1/2[(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.12})] = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2},$$

onde $\bar{d}_{.k}$ são as médias amostrais das diferenças de períodos $d_{ik} = 1/2(Y_{i2k} - Y_{i1k})$. Observe que

$$d_{ik} = \frac{1}{2}(Y_{i2k} - Y_{i1k}) = \frac{1}{2}(\ln X_{i2k} - \ln X_{i1k}) = \frac{1}{2} \ln(r_{ik}),$$

onde $r_{ik} = X_{i2k} / X_{i1k}$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$, são as razões de períodos. A razão de períodos pode remover a variabilidade inter-indivíduos da comparação entre as biodisponibilidades das formulações, considerando-se o modelo multiplicativo. Sob a pressuposição de que os efeitos de *carry-over* não são significativos,

$$r_{ik} = \frac{X_{i2k}}{X_{i1k}} = \begin{cases} \frac{\tilde{P}_2 \tilde{F}_T \tilde{e}_{i2k}}{\tilde{P}_1 \tilde{F}_R \tilde{e}_{i1k}}, & \text{para a seqüência } k=1 \\ \frac{\tilde{P}_2 \tilde{F}_R \tilde{e}_{i2k}}{\tilde{P}_1 \tilde{F}_T \tilde{e}_{i1k}}, & \text{para a seqüência } k=2, \end{cases}$$

onde $i = 1, 2, \dots, n_k$.

Como $\hat{F}$ é o estimador de máxima verossimilhança de $\mu_T - \mu_R$, então o estimador obtido através da transformação inversa é também um estimador de máxima verossimilhança para $\delta = \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R$:

$$\hat{\delta}_{MV} = \exp(\hat{F}) = \exp(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R).$$

A relação que existe entre a diferença das médias de mínimos quadrados na escala logarítmica e as razões de períodos na escala original é apresentada a seguir. Considere

$$R_k = \left(\prod_{i=1}^{n_k} r_{ik} \right)^{1/n_k}, \quad k = 1, 2.$$

Logo, tem-se que $\hat{\delta} = (R_1/R_2)^{1/2}$. Portanto, o melhor estimador não-viciado de $\hat{F}$, na escala logarítmica, é $\hat{F} = \ln(\hat{\delta}_{MV})$. Desta forma, $\hat{\delta}_{MV}$ tem distribuição lognormal com média $\delta \exp(m\sigma_d^2/2)$, onde $m = \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}$. Então, $\hat{\delta}_{MV}$ não é um estimador não-viciado para $\delta = \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R$.

Liu e Weng (1992) apresentaram um estimador não-viciado e de mínima variância ($ENVMV$) para $\delta = \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R$, que é dado por

$$\hat{\delta}_{NVMV} = \hat{\delta}_{MV} \Phi_f(-mSQD),$$

onde $m = \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}$, SQD é a Soma de Quadrados das Diferenças dos períodos para os dados transformados, ou seja, $SQD = (n_1 + n_2 - 2)\hat{\sigma}_d^2$, f representa os graus de liberdade $n_1 + n_2 - 2$ e

$$\Phi_f = (-mSQD) = \sum_{j=0}^{\infty} \frac{\Gamma(f/2)}{\Gamma[(f/2) + j]j!} \left[\left(-\frac{m}{4} \right) SQD \right]^j, \quad (3.3.30)$$

onde $\Gamma(\cdot)$ é a função Gama. A convergência da série infinita em (3.3.30) é mais rápida que das séries exponenciais, pois $\Gamma(f/2)/\Gamma[(f/2) + j] < 1$. A estimativa da variância do estimador $\hat{\delta}_{NVMV}$ é dada por

$$\hat{V}(\hat{\delta}_{NVMV}) = \exp[2(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R)[(\Phi_f(-mSQD))^2 - \Phi_f(-4mSQD)].$$

3.3.2 Estimador de Média das Formulações

Considerando-se o modelo multiplicativo em (3.3.27), pode-se obter um estimador para δ utilizando as médias de mínimos quadrados das formulações T e R , que são dadas, respectivamente, por

$$\bar{X}_T = \frac{(\bar{X}_{.21} + \bar{X}_{.12})}{2}, \quad \bar{X}_R = \frac{(\bar{X}_{.11} + \bar{X}_{.22})}{2}.$$

Portanto, o estimador para a razão de médias é $\hat{\delta}_{RM} = \frac{\bar{X}_T}{\bar{X}_R}$. Como a distribuição exata de $\frac{\bar{X}_T}{\bar{X}_R}$ é muito complicada, o método de *bootstrap* pode ser utilizado para construí-la (Efron e Tibshirani,

1993). Maiores detalhes serão apresentados no Capítulo 4, onde o método *bootstrap* é empregado para a construção do intervalo de confiança não-paramétrico para a razão das médias em escala original. Aqui será apenas examinado o vício assintótico de $\hat{\delta}_{RM}$, considerando-se o modelo multiplicativo em (3.3.27).

Considere o vetor de médias amostrais $\bar{\mathbf{X}} = (\bar{X}_{.11}, \bar{X}_{.21}, \bar{X}_{.12}, \bar{X}_{.22})'$ e $\lambda_k = n_k/n$, onde $n = n_1 + n_2$ para $k = 1, 2$. Utilizando-se o Teorema Central do Limite para vetores, tem-se que

$$\bar{\mathbf{X}} \xrightarrow{D} N(\mu, \Sigma/n)$$

onde $\mu = (\mu_{11}, \mu_{21}, \mu_{12}, \mu_{22})$ e

$$\Sigma' = \begin{pmatrix} \lambda_1 \Sigma_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \Sigma_2 \end{pmatrix};$$

$$\lambda_1 \Sigma_1 = \begin{pmatrix} V_{11} & V_{12} \\ V_{12} & V_{22} \end{pmatrix}; \lambda_2 \Sigma_2 = \begin{pmatrix} V_{33} & V_{34} \\ V_{34} & V_{44} \end{pmatrix};$$

sendo que

$$\begin{aligned} \mu_{11} &= \exp[(\mu + P_1 + F_R) + (\sigma_R^2 + \sigma_s^2)/2]; \\ \mu_{21} &= \exp[(\mu + P_2 + F_T) + (\sigma_T^2 + \sigma_s^2)/2]; \\ \mu_{12} &= \exp[(\mu + P_1 + F_T) + (\sigma_T^2 + \sigma_s^2)/2]; \\ \mu_{22} &= \exp[(\mu + P_2 + F_R) + (\sigma_R^2 + \sigma_s^2)/2]; \\ V_{11} &= \exp[2(\mu + P_1 + F_R) + (\sigma_R^2 + \sigma_s^2)][\exp(\sigma_R^2 + \sigma_s^2) - 1]; \\ V_{22} &= \exp[2(\mu + P_2 + F_T) + (\sigma_T^2 + \sigma_s^2)][\exp(\sigma_T^2 + \sigma_s^2) - 1]; \\ V_{33} &= \exp[2(\mu + P_1 + F_T) + (\sigma_T^2 + \sigma_s^2)][\exp(\sigma_T^2 + \sigma_s^2) - 1]; \\ V_{44} &= \exp[2(\mu + P_2 + F_R) + (\sigma_R^2 + \sigma_s^2)][\exp(\sigma_R^2 + \sigma_s^2) - 1]; \\ V_{12} &= V_{34} = \exp[2\mu + (\sigma_R^2 + \sigma_T^2 + 2\sigma_s^2)/2][\exp(\sigma_s^2) - 1]. \end{aligned}$$

Portanto, o vetor de médias amostrais $(\bar{X}_T, \bar{X}_R)'$ tem distribuição assintoticamente Normal com vetor de médias $\mu^* = (\mu_T^*, \mu_R^*)$ e matriz de variância-covariância

$$\frac{1}{4n} \Sigma = \begin{pmatrix} V_{TT} & V_{TR} \\ V_{TR} & V_{RR} \end{pmatrix},$$

onde $n = n_1 + n_2$ e

$$\begin{aligned} \mu_T^* &= 1/2[\exp((\mu + F_T) + (\sigma_T^2 + \sigma_s^2)/2)][\exp(P_1) + \exp(P_2)]; \\ \mu_R^* &= 1/2[\exp((\mu + F_R) + (\sigma_R^2 + \sigma_s^2)/2)][\exp(P_1) + \exp(P_2)]; \\ V_{TT} &= [\exp(2(\mu + F_T) + (\sigma_T^2 + \sigma_s^2))][\exp(\sigma_T^2 + \sigma_s^2) - 1][\lambda_1 \exp(2P_2) + \lambda_2 \exp(2P_1)]; \\ V_{RR} &= [\exp(2(\mu + F_R) + (\sigma_R^2 + \sigma_s^2))][\exp(\sigma_R^2 + \sigma_s^2) - 1][\lambda_1 \exp(2P_1) + \lambda_2 \exp(2P_2)]; \\ V_{TR} &= [\exp(2\mu + (\sigma_T^2 + \sigma_R^2 + 2\sigma_s^2))][\exp(\sigma_s^2) - 1]. \end{aligned}$$

Supondo-se que não existe efeito de *carry-over*, o vício assintótico de $\hat{\delta}_{RM}$ é dado por:

$$Vicio(\hat{\delta}_{RM}) = E(\hat{\delta}_{RM}) - \delta = \delta \left[\exp \left[\frac{\sigma_T^2 - \sigma_R^2}{2} \right] \left[1 + \frac{1}{na} [b[\exp(\sigma_R^2 + \sigma_s^2) - 1] - [\exp(\sigma_s^2) - 1]] \right] \right] - \delta,$$

onde $a = [\exp(P_1) + \exp(P_2)]^2$ e $b = \lambda_1 \exp(2P_1) + \lambda_2 \exp(2P_2)$.

Quando não existe efeito de período e $\lambda_1 = \lambda_2 = 1/2$, então o vício assintótico de $\hat{\delta}_{RM}$ pode ser escrito como:

$$Vicio(\hat{\delta}_{RM}) = \delta \left[\exp \left[\frac{\sigma_T^2 - \sigma_R^2}{2} \right] \left[1 + \frac{1}{4n} \exp(\sigma_e^2) [\exp(\sigma_R^2) - 1] \right] - 1 \right]. \quad (3.3.31)$$

3.3.3 Exemplo Ilustrativo

Utilizando a medida *ASC* do exemplo da Seção 3.1.6, tem-se as seguintes estimativas em escala logarítmica: $Y_T = 2,9299$, $Y_R = 3,00417$, $\hat{F} = 0,07423$ e $SQD = 0,12462$.

A estimativa de máxima verossimilhança de δ é igual a

$$\delta_{MV} = \exp(\hat{F}) = 1,07706.$$

As estimativas do vício e da variância de $\hat{\delta}_{VM}$ podem ser calculadas, respectivamente, como

$$\begin{aligned} \widehat{Vicio}(\hat{\delta}_{VM}) &= \hat{\delta}_{VM} [\exp(m\hat{\sigma}_d^2) - 1] = 0,001599, \\ \hat{V}(\hat{\delta}_{VM}) &= \hat{\delta}_{VM}^2 (\exp(m\hat{\sigma}_d^2)) [\exp(m\hat{\sigma}_d^2) - 1] = 0,003457. \end{aligned}$$

Portanto, a estimativa do erro quadrático médio (*EQM*) de $\hat{\delta}_{VM}$ é igual a

$$\widehat{EQM}(\hat{\delta}_{VM}) = 0,003457 + (0,001599)^2 = 0,003459.$$

Como $\Phi_f(-mSQD) = 0,99852$, então a estimativa de δ_{NVMV} é

$$\hat{\delta}_{NVMV} = \hat{\delta}_{MV} \Phi_f(-mSQD) = 1,07546.$$

E a estimativa da variância de $\hat{\delta}_{NVMV}$ pode ser calculada por

$$\hat{V}(\hat{\delta}_{NVMV}) = \widehat{EQM}(\hat{\delta}_{NVMV}) = \hat{\delta}_{MV}^2 [(\Phi_f(-mSQD))^2 - \Phi_f(-4mSQD)] = 0,003459.$$

Baseados nas médias amostrais em escala original das formulações *T* e *R* são, respectivamente, iguais a $X_T = 21,124$ e $X_R = 19,578$, tem-se que a estimativa para δ_{RM} é igual a

$$\hat{\delta}_{RM} = \frac{\bar{X}_T}{\bar{X}_R} = 1,0789.$$

Utilizando a expressão (3.3.31), pode-se calcular o vício de $\hat{\delta}_{RM}$, obtendo como resultado $Vício(\hat{\delta}_{RM}) = -0,000337$.

Considerando o modelo multiplicativo em (3.3.27), pode-se notar que as estimativas encontradas para a razão das médias das formulações $\delta = \tilde{\mu}_T/\tilde{\mu}_R$ são bastante próximas e que as variâncias estimadas dos estimadores são também muito pequenas.

No próximo capítulo, serão apresentados os principais métodos estatísticos frequentemente utilizados em estudos de bioequivalência média, considerando a medida farmacocinética nas escalas original e logarítmica.

Capítulo 4

Métodos Estatísticos para Bioequivalência Média

4.1 Introdução

Neste capítulo, são apresentados alguns métodos estatísticos empregados em estudos de bioequivalência média das formulações T e R . Considere μ_R e μ_T como sendo as respectivas médias populacionais das medidas de biodisponibilidade das formulações R e T . Logo, a formulação T é bioequivalente em média à formulação R se a diferença $(\mu_T - \mu_R)$, ou a razão (μ_T/μ_R) , das medidas farmacocinéticas não difere segundo limites clinicamente aceitos, que são os limites de bioequivalência. A bioequivalência média pode ser analisada através de intervalos de confiança, de testes de hipóteses paramétricos, com a medida farmacocinética em escalas original ou logarítmica, e através de métodos não-paramétricos, como será apresentado no decorrer deste capítulo.

4.2 Limites de Bioequivalência Média

São apresentados a seguir os limites de bioequivalência para a diferença e a razão das médias da medida farmacocinética, em escala original e com transformação logarítmica, das formulações R e T .

4.2.1 Medidas Farmacocinéticas em Escala Original

A - Diferença das médias

Neste caso, o intervalo de bioequivalência é definido por $\theta_{inf} < \mu_T - \mu_R < \theta_{sup}$. O emprego da regra $\pm 20\%$ implica que os limites de bioequivalência são $\theta_{inf} = -0,2\mu_R$ e $\theta_{sup} = 0,2\mu_R$. Na

prática, estes limites são geralmente estimados por $\hat{\theta}_{inf} = -0,2\bar{Y}_R$ e $\hat{\theta}_{sup} = 0,2\bar{Y}_R$, onde $\bar{Y}_R$ é a média amostral da formulação R .

B - Razão das médias

O intervalo de bioequivalência para a razão das médias das formulações T e R , μ_T/μ_R , pode ser obtido através da divisão do intervalo da diferença das médias por μ_R . Como resultado, obtem-se $-0,2 < \mu_T/\mu_R - 1 < 0,2$, que pode ser expresso como $0,8 < \mu_T/\mu_R < 1,2$. Portanto, segundo a regra de $\pm 20\%$, tem-se que os limites de bioequivalência são:

$$\delta_{inf} < \mu_T/\mu_R < \delta_{sup},$$

onde $\delta_{inf} = 0,8$ e $\delta_{sup} = 1,2$.

4.2.2 Medida Farmacocinética em Escala Logarítmica

Agora considere $\tilde{\mu}_R$ e $\tilde{\mu}_T$ como sendo as médias geométricas das medidas farmacocinéticas em escala original das formulações R e T , respectivamente. Portanto, as médias aritméticas das medidas farmacocinéticas em escala logarítmica das formulações R e T são representadas por μ_R e μ_T , respectivamente.

A - Razão das médias

Quando as medidas farmacocinéticas estão em escala logarítmica, o intervalo de bioequivalência para a razão das médias das formulações T e R é expresso por

$$\delta_{inf} < \tilde{\mu}_T/\tilde{\mu}_R < \delta_{sup},$$

onde $\delta_{inf} = 0,8$ e $\delta_{sup} = 1,25$. Neste caso, emprega-se a regra de 80/125 para determinar os limites de bioequivalência. A justificativa para a escolha destes limites, ao invés do usual $\pm 20\%$, está relacionada à simetria do intervalo para a diferença das médias em escala logarítmica, como mostrado em seguida.

B - Diferença das médias

Após aplicar a transformação logarítmica no intervalo de bioequivalência para a razão das médias geométricas, obtem-se o seguinte intervalo de bioequivalência: $\ln(0,8) < \ln\tilde{\mu}_T - \ln\tilde{\mu}_R < \ln(1,25)$. Logo, segundo a regra de 80/125, tem-se que os limites de bioequivalência para a diferença das médias são dados por

$$\theta_{inf} < \mu_T - \mu_R < \theta_{sup},$$

onde $\theta_{inf} = -0,2231$ e $\theta_{sup} = 0,2231$.

4.3 Intervalo de Confiança

Uma das formas para se avaliar a bioequivalência é através da construção de intervalo de confiança para a diferença ou a razão das médias das formulações R e T estudadas. A agência reguladora considera que se o intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para a diferença ou para a razão das médias das formulações está dentro dos limites de bioequivalências, então pode-se concluir que a formulação T é bioequivalente a R .

A seguir, são apresentados alguns métodos paramétricos e não-paramétricos que podem ser utilizados para a construção de intervalos de confiança para a diferença ou para a razão das médias das formulações R e T , considerando-se a medida farmacocinética ASC ou C_{max} em escala original ou logarítmica. A aplicação destes métodos pressupõe satisfeitas as seguintes condições:

- (i) as medidas farmacocinéticas da amostra de n voluntários são obtidas segundo um planejamento de experimento *crossover*, em particular de um experimento 2×2 ;
- (ii) normalidade das medidas farmacocinéticas em escala original ou logarítmica, para empregar os métodos paramétricos;
- (iii) não existência de diferença significativa dos efeitos de *carry-over*, para o caso de um experimento *crossover* 2×2 .

4.3.1 Intervalo de Confiança Clássico

4.3.1.1 Medida farmacocinética em escala original

A - Diferença de médias

Considere $\bar{Y}_T$ e $\bar{Y}_R$ como sendo as médias amostrais de mínimos quadrados das formulações T e R , respectivamente. Sob normalidade, o intervalo de confiança clássico para a diferença das médias $\mu_T - \mu_R$ pode ser obtido a partir da seguinte estatística:

$$T_1 = \frac{(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) - (\mu_T - \mu_R)}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N*}}, \quad (4.3.1)$$

onde $\hat{\sigma}_e^2$ é a estimativa do erro quadrático médio intra-indivíduos (σ_e^2) da tabela de Análise de Variância do experimento *crossover* e

$$N^* = \begin{cases} \frac{1}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right), & \text{para o experimento } crossover \text{ } 2 \times 2; \\ \frac{1}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right), & \text{para o } crossover \text{ } 4 \times 2; \\ \frac{3}{8} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right), & \text{para o } crossover \text{ } 2 \times 3; \\ \frac{11}{40} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right), & \text{para o } crossover \text{ } 2 \times 4; \\ \frac{1}{16} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right), & \text{para o } crossover \text{ } 4 \times 4, \end{cases}$$

onde n_i representa o número de voluntários da i -ésima seqüência do experimento *crossover*.

A estatística T_1 apresenta uma distribuição t -Student com gl graus de liberdade, onde o valor de gl varia de acordo com o experimento *crossover* analisado. Considerando-se n como sendo o número total de voluntários do experimento, tem-se que gl é $n - 2$ para o experimento *crossover* 2×2 e, para os experimentos *crossover* de ordem superior, gl é igual a $(p - 1)n - p - 1$, onde p é o número de períodos do experimento *crossover*.

Os limites do intervalo de confiança clássico de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\mu_T - \mu_R$ podem ser obtidos através de

$$(L_{inf1}; L_{sup1}) = (\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) \pm t_{(\alpha, gl)} \hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}, \quad (4.3.2)$$

onde $t_{(\alpha, gl)}$ é o percentil correspondente a $(1 - \alpha)$ da distribuição t com gl graus de liberdade.

Um intervalo de confiança é, na verdade, um intervalo aleatório porque os seus limites $(L_{inf}; L_{sup})$ são variáveis aleatórias. Por exemplo, um intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\mu_T - \mu_R$ indica que se o estudo for realizado n vezes, então $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ dos n intervalos aleatórios construídos para as n amostras cobrirão a diferença $\mu_T - \mu_R$, ou seja, conterão o verdadeiro valor de $\mu_T - \mu_R$. Considerando-se a definição de Intervalo de Confiança dada anteriormente, a probabilidade de cobertura de $\mu_T - \mu_R$ é: $P(\mu_T - \mu_R \in (L_{inf}, L_{sup})) = 1 - 2\alpha$. O limite de bioequivalência em geral é constante, a não ser para a diferença de médias, mas não considera a variabilidade. No entanto, se o coeficiente de variação $CV = (\sigma_e / \mu_R) \times 100\%$ for grande, a probabilidade do intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ estar dentro do intervalo de bioequivalência $P((L_{inf} - L_{sup}) \in (\theta_{inf}, \theta_{sup}))$ não é necessariamente maior ou igual a $1 - 2\alpha$. Com o intuito de ilustrar o impacto do CV na probabilidade de cobertura do intervalo de confiança, considere os resultados da Tabela 4.3.1, que foram realizados através de um estudo de simulação, em que foi gerado 2000 experimentos *crossover* 2×2 com $n_1 = n_2 = 12$ sob a pressuposição de normalidade. Por simplicidade, foram considerados $\mu_R = 100$ e $\mu_T = 102$ e os seguintes coeficientes de variação CV s: 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% e 40%, que correspondem às variabilidades intra-indivíduos σ_e^2 : 100, 225, 400, 625, 900, 1225 e 1600. Adota-se a regra $\pm 20\%$ e $\alpha = 0,05$ para a construção do intervalo de confiança de 90% para $\mu_T - \mu_R$ de cada amostra gerada. A probabilidade do intervalo de confiança para $\mu_T - \mu_R$ estar dentro dos limites de bioequivalência também foi calculado para os

Tabela 4.3.1: Probabilidade de Cobertura do Intervalo de Confiança de 90% para $\mu_T - \mu_R$ com o verdadeiro valor para a diferença de médias e estar dentro dos Limites de Bioequivalência $(-0, 2\mu_R; 0, 2\mu_R)$.

$CV(\%)$	σ_e^2	Probabilidade de Cobertura para $\mu_T - \mu_R$	Probabilidade do IC para $\mu_T - \mu_R$ estar dentro dos Limites de Bioequivalência
10	100	0,9054	0,9999
15	225	0,9111	0,9914
20	400	0,9099	0,9076
25	625	0,9032	0,7302
30	900	0,8999	0,5219
35	1225	0,9001	0,3378
40	1600	0,8978	0,2163

CV e σ_e definidos anteriormente, calculando-se a porcentagem de intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\mu_T - \mu_R$ das 2000 amostras que estão dentro dos limites de bioequivalência, definidos na Seção 4.1. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 4.3.1.

B - Razão de médias

O intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para μ_T/μ_R pode ser contruído através da divisão do intervalo de confiança para $\mu_T - \mu_R$ em (4.3.2) por μ_R , pois $(\mu_T - \mu_R)/\mu_R = \mu_T/\mu_R - 1$. Substituindo-se μ_R pela sua estimativa $\bar{Y}_R$, obtem-se os seguintes limites para o intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para μ_T/μ_R :

$$L_{inf2} = (L_{inf1}/\bar{Y}_R + 1), \quad e \quad L_{sup2} = (L_{sup1}/\bar{Y}_R + 1). \quad (4.3.3)$$

Quando são adotados a regra $\pm 20\%$ e o nível 5% de significância ($\alpha = 0,05$), então se o intervalo de confiança de 90% para a diferença das médias $\mu_T - \mu_R$ em (4.3.2) está dentro dos limites de bioequivalência dados por $(-0, 2\bar{Y}_R; 0, 2\bar{Y}_R)$, pode-se concluir que as formulações R e T são bioequivalentes; caso contrário, não são. Por sua vez, se o intervalo de confiança de 90% para μ_T/μ_R em (4.3.3) está contido no intervalo de bioequivalência (80%; 120%), isto indica que as formulações T e R são bioequivalentes.

4.3.1.2 Medidas farmacocinéticas em escala logarítmica

A - Diferença de médias

O intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\mu_T - \mu_R$ é obtido similarmente ao caso em que a medida farmacocinética estiver na escala original. Assim, é necessário apenas calcular os resultados na escala logarítmica e substituir os resultados encontrados em (4.3.2). Os limites do intervalo de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\mu_T - \mu_R$ são denotados por $(\tilde{L}_{inf1}, \tilde{L}_{sup1})$.

B - Razão de médias

A construção do intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para a razão μ_T/μ_R , denotado por $(\tilde{L}_{inf2}, \tilde{L}_{sup2})$, é baseada nos limites do intervalo de confiança para a diferença de médias da medida farmacocinética em escala logarítmica. Portanto, os limites do intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha \times 100\%)$ para a razão μ_T/μ_R são dados por $(\tilde{L}_{inf2} = \exp\{\tilde{L}_{inf1}\}, \tilde{L}_{sup2} = \exp\{\tilde{L}_{sup1}\})$.

No Apêndice, são apresentados os programas em linguagem *SAS* que podem ser utilizados para a construção dos intervalos de confiança de 90% para a diferença e a razão das médias das formulações *T* e *R*.

Note que o intervalo de confiança clássico de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\mu_T - \mu_R$ em (4.3.2) é simétrico em $\bar{Y}_T - \bar{Y}_R$ e não em 0. Por sua vez, o intervalo de confiança para μ_T/μ_R não é simétrico em 1, mas sim em $\bar{Y}_T/\bar{Y}_R$. Após observar isto, Westlake (1976) sugeriu o seguinte método para a construção de intervalo de confiança simétrico em torno de 0 para a diferença das médias. Por sua vez, Locke (1984) sugeriu um intervalo de confiança simétrico em 1 para a razão das médias.

4.3.2 Intervalo de Confiança Simétrico de Westlake

A - Medida na Escala Original

O intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\mu_T - \mu_R$ pode ser geralmente expresso como

$$k_2 < T_1 < k_1, \quad (4.3.4)$$

onde T_1 é a estatística em (4.3.1), k_1 e k_2 são os valores que podem ser encontrados através de

$$\int_{k_2}^{k_1} T_1 dt = 1 - 2\alpha. \quad (4.3.5)$$

No intervalo de confiança clássico para $\mu_T - \mu_R$ em (4.3.2), $k_2 = -k_1$.

O intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\mu_T - \mu_R$ de Westlake é construído da seguinte forma:

$$-\Delta < \mu_T - \mu_R < \Delta.$$

Usando-se (4.3.1) em (4.3.5) e rearranjando-se os termos, obtém-se

$$\mu_R + k_2 \hat{\sigma}_e \sqrt{N^*} - (\bar{Y}_R - \bar{Y}_T) < \mu_T < \mu_R + k_1 \hat{\sigma}_e \sqrt{N^*} - (\bar{Y}_R - \bar{Y}_T).$$

Logo,

$$\Delta = k_1 \hat{\sigma}_e \sqrt{N^*} - (\bar{Y}_R - \bar{Y}_T) = -k_2 \hat{\sigma}_e \sqrt{N^*} - (\bar{Y}_R - \bar{Y}_T) \quad (4.3.6)$$

e

$$2(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) = (k_1 + k_2) \hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}.$$

Para encontrar os limites do intervalo simétrico de Westlake, é necessário encontrar Δ em (4.3.6). No Apêndice, é apresentado um programa em *SAS*, que pode ser utilizado para esta finalidade.

Utilizando-se a regra $\pm 20\%$, pode-se concluir que a formulação *T* é bioequivalente a *R* se $|\Delta| < 0,2\mu_R$, quando a medida farmacocinética em estudo está em escala original.

B - Medida na Escala Logarítmica

Utilizando-se a medida farmacocinética com transformação logarítmica, estima-se as médias aritméticas $\bar{Y}_R$ e $\bar{Y}_T$ e a variabilidade intra-indivíduos $\hat{\sigma}_e^2$, para encontrar os valores de k_1 e k_2 através da resolução da integral em (4.3.5), por algum método numérico. Desta forma, calcula-se Δ em (4.3.6). Se $|\Delta| < 0,2231$, conclui-se que as formulações são bioequivalentes.

4.3.3 Intervalo de Confiança de Locke

A - Medida Farmacocinética em Escala Original

Os intervalos de confiança apresentados anteriormente para μ_T/μ_R não consideram a variabilidade de $\bar{Y}_R$ e a correlação entre $\bar{Y}_R$ e $\bar{Y}_T - \bar{Y}_R$. No entanto, Locke(1984) propôs um método para a construção do intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para μ_T/μ_R baseado no teorema de Fieller(1954).

Como apresentado no Capítulo 2, tem-se que cada um dos $n_1 + n_2$ voluntários do experimento *crossover* 2 x 2, onde n_1 é o tamanho da Sequência 1 e n_2 é o tamanho da Sequência 2, possui um par de observações (Período 1, Período 2), que é representado pelo vetor normal bivariado

$$Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k})' \quad i = 1, 2, \dots, n_k \quad e \quad k = 1, 2.$$

Os vetores aleatórios bivariados da Seqüência 1(RT) são independentes e possuem distribuição Normal com vetor de médias e matriz de variâncias-covariâncias iguais a

$$\mu_1 = \begin{pmatrix} \mu + P_1 + F_R \\ \mu + P_2 + F_T + C_R \end{pmatrix}$$

$$\Sigma_1 = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_T^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix}$$

Os vetores aleatórios da Seqüência 2(TR) são independentes e normalmente distribuídos com vetor de médias e matriz de variâncias-covariâncias dados por

$$\mu_2 = \begin{pmatrix} \mu + P_1 + F_T \\ \mu + P_2 + F_R + C_T \end{pmatrix}$$

$$\Sigma_2 = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_R^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix}$$

Considere a razão das médias como $\delta = \mu_T/\mu_R$ e

$$U_{ik}^* = \begin{cases} 1/2(Y_{i21} - \delta Y_{i11}), & \text{para a seqüência k=1} \\ 1/2(Y_{i12} - \delta Y_{i22}), & \text{para a seqüência k=2,} \end{cases}$$

onde $i = 1, 2, \dots, n_k$.

Portanto, U_{ik}^* são variáveis aleatórias normais independentes com média e variância iguais a

$$E(U_{ik}^*) = \begin{cases} (P_2 - \delta P_1)/2, & \text{para k = 1} \\ (P_1 - \delta P_2)/2, & \text{para k = 2,} \end{cases}$$

e $V(U_{ik}^*) = \sigma_\delta^2/4 = \frac{1}{4}[\sigma_T^2 + \sigma_s^2 - 2\delta\sigma_s^2 + \delta^2(\sigma_R^2 + \sigma_s^2)]$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$.

As estimativas da média e da variância de U_{ik}^* podem ser calculadas por

$$\bar{U}_{.k}^* = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} U_{ik}^*, \quad k = 1, 2;$$

$$S_u^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (U_{ik}^* - \bar{U}_{.k}^*)^2.$$

Como a soma $(U_{.1}^* + U_{.2}^*)$ é normalmente distribuída com média igual a zero e variância $w\sigma_\delta^2$, em que $w = \frac{1}{4}(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2})$, então pode-se obter a estatística T_2 abaixo:

$$T_2 = \frac{\bar{U}_{.1}^* + \bar{U}_{.2}^*}{\sqrt{wS_u^2}}, \quad (4.3.7)$$

que tem distribuição t com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade. Utilizando-se as seguintes medidas:

$$\begin{aligned} \bar{U}_{.1}^* + \bar{U}_{.2}^* &= \frac{1}{2}(\bar{Y}_{.21} - \delta\bar{Y}_{.11}) + \frac{1}{2}(\bar{Y}_{.12} - \delta\bar{Y}_{.22}) = \bar{Y}_T - \delta\bar{Y}_R; \\ S_u^2 &= \delta^2 S_{RR}^2 + S_{TT}^2 - 2\delta S_{TR}; \\ S_{RR}^2 &= \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \left[\sum_{i=1}^{n_1} (Y_{i11} - \bar{Y}_{.11})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (Y_{i22} - \bar{Y}_{.22})^2 \right], \\ S_{TT}^2 &= \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \left[\sum_{i=1}^{n_1} (Y_{i21} - \bar{Y}_{.21})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (Y_{i12} - \bar{Y}_{.12})^2 \right], \\ S_{TR} &= \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \left[\sum_{i=1}^{n_1} (Y_{i11} - \bar{Y}_{.11})(Y_{i21} - \bar{Y}_{.21}) + \sum_{i=1}^{n_2} (Y_{i12} - \bar{Y}_{.12})(Y_{i22} - \bar{Y}_{.22}) \right]. \end{aligned}$$

pode-se escrever a estatística T_2 como:

$$T_2^* = \frac{\bar{Y}_T + \delta\bar{Y}_R}{\sqrt{w(S_{TT}^2 - 2\delta S_{TR} + \delta^2 S_{RR}^2)}}. \quad (4.3.8)$$

Um intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para δ pode ser obtido através da solução da inequação dada por $\{\delta | T_2^{*2} \leq t_{(\alpha, n_1+n_2-2)}^2\}$. Se as raízes da seguinte equação quadrática existirem, então tem-se que

$$\begin{aligned} &(\bar{Y}_T - \delta\bar{Y}_R)^2 - t^2 w (S_{TT}^2 - 2\delta S_{TR} + \delta^2 S_{RR}^2) = \\ &= \delta^2 (\bar{Y}_R^2 - t^2 w S_{RR}^2) + \delta (2t^2 w S_{TR} - 2\bar{Y}_T \bar{Y}_R) + (\bar{Y}_T^2 - t^2 w S_{TT}^2) \leq 0, \end{aligned} \quad (4.3.9)$$

onde $t^2 = t_{(\alpha, n_1+n_2-2)}^2$. Portanto, os valores encontrados para as duas raízes são os limites do intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\delta = \mu_T / \mu_R$. Calculando-se as raízes da inequação dada em (4.3.9), tem-se que

$$\delta = \frac{-(2t^2 w S_{TR} - 2\bar{Y}_T \bar{Y}_R) \pm \sqrt{\Delta}}{2(\bar{Y}_R^2 - t^2 w S_{RR}^2)}, \quad (4.3.10)$$

onde

$$\begin{aligned} \Delta &= 4(t^2 w S_{TR} - \bar{Y}_T \bar{Y}_R)^2 - 4(\bar{Y}_R^2 - t^2 w S_{RR}^2)(\bar{Y}_T^2 - t^2 w S_{TT}^2), \\ &= 4(t^2 w S_{RR}^2 \bar{Y}_T^2 + \bar{Y}_R^2 t^2 w S_{TT}^2 - t^4 w^2 S_{RR}^2 S_{TT}^2 + t^4 w^2 S_{tr}^2 - 2^2 w S_{tr} \bar{Y}_T \bar{Y}_R). \end{aligned}$$

Se as raízes da inequação existem, então os limites do intervalo de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ de confiança para δ são obtidos através de

$$(L_{inf3}; L_{sup3}) = \frac{1}{1 - A} \left[\left(\frac{\bar{Y}_T}{\bar{Y}_R} - A \frac{S_{TR}}{S_{RR}^2} \right) \pm \left(t \frac{\sqrt{w S_{RR}^2}}{\bar{Y}_R} B \right) \right]. \quad (4.3.11)$$

onde

$$\begin{aligned} A &= t^2 \left(\frac{w S_{RR}^2}{\bar{Y}_R^2} \right); \\ B &= \left(\frac{\bar{Y}_T}{\bar{Y}_R} \right)^2 + \frac{S_{TT}^2}{S_{RR}^2} (1 - A) + \frac{S_{TR}}{S_{RR}^2} \left(A \frac{S_{TR}}{S_{RR}^2} - 2 \frac{\bar{Y}_T}{\bar{Y}_R} \right) \quad e \quad t = t_{(\alpha, n_1 + n_2 - 2)} \end{aligned}$$

Locke(1984) indicou também que as raízes da equação quadrática em (4.3.10) podem não fornecer um intervalo de confiança quando estas raízes não forem números reais. Para verificar a existência dos limites do intervalo de confiança, é necessário verificar as seguintes condições:

$$\begin{aligned} (a) \quad & \frac{\bar{Y}_R}{\sqrt{w S_{RR}^2}} > t(\alpha, n_1 + n_2 - 2), \\ (b) \quad & \frac{\bar{Y}_T}{\sqrt{w S_{TT}^2}} > t(\alpha, n_1 + n_2 - 2). \end{aligned}$$

Logo, pode-se concluir que as formulações T e R são bioequivalentes se as condições (a) e (b) são satisfeitas e se o intervalo de 90% de confiança para δ em (4.3.11) está contido no intervalo de bioequivalência $(\delta_{inf}; \delta_{sup})$.

B - Medida Farmacocinética em Escala Logarítmica

Para construir um intervalo de confiança de 90% para μ_T/μ_R para os dados com transformação logarítmica, é necessário calcular as médias aritméticas $\bar{Y}_T$ e $\bar{Y}_R$, os valores de A e B e verificar a existência dos limites do intervalo de confiança. Se os limites existirem, eles podem ser encontrados através de (4.3.11). Portanto, a formulação T é bioequivalente à R , se os limites do intervalo de confiança de 90% para μ_T/μ_R estiverem dentro dos limites de bioequivalência $(0, 8; 1, 25)$.

As fórmulas para encontrar os limites do intervalo de confiança de 90% para a μ_T/μ_R foram impletamentadas em linguagem *SAS* e o programa está apresentado no Apêndice.

4.4 Testes de Hipóteses Intervalares

Para avaliar a bioequivalência de duas formulações, uma Teste T e uma Referência R através do teste de hipóteses, é necessário formular uma hipótese nula, H_0 , e uma alternativa, H_1 . As hipóteses a serem testadas em estudos de bioequivalência são:

$$H_0 : \text{Não Bioequivalência versus } H_1 : \text{Bioequivalência.} \quad (4.4.12)$$

A probabilidade de concluir que a formulação T é bioequivalente à R quando, na verdade, as formulações não são bioequivalentes define o erro do Tipo I , denotado por α . Por sua vez, o erro do Tipo II , denotado por β , é dado pela probabilidade de concluir que a formulação T é não bioequivalente à R quando estas formulações são realmente bioequivalentes. Logo, o poder do teste, $1 - \beta$, é definido como a probabilidade de concluir que a formulação T é bioequivalente à R quando estas são bioequivalentes. A Tabela 4.4.2 apresenta a relação entre os erros do Tipo I e II para as hipóteses de bioequivalência dada em (4.4.12).

Tabela 4.4.2: Relação entre os Erros de Tipo I e II em Estudos de Bioequivalência.

Decisão	H_0 Verdadeira	
	Não Bioequivalência	Bioequivalência
Não Bioequivalência (Não Rejeita H_0)	Decisão Correta	Erro Tipo II
Bioequivalência (Rejeita H_0)	Erro Tipo I	Decisão Correta

As hipóteses em (4.4.12) podem ser formuladas em termos dos intervalos de bioequivalência para a diferença ou razão das médias da medida farmacocinética, em escala original ou logarítmica, das formulações R e T . Por esse motivo, estas hipóteses são também denominadas hipóteses intervalares. Schuirmann (1981) foi o primeiro a apresentar as hipóteses intervalares:

$$H_0 : \mu_T - \mu_R \leq \theta_{inf} \text{ ou } \mu_T - \mu_R \geq \theta_{sup} \text{ versus } H_1 : \theta_{inf} < \mu_T - \mu_R < \theta_{sup}. \quad (4.4.13)$$

As hipóteses intervalares em (4.4.13) podem ser decompostas em dois conjuntos de hipóteses unilaterais iguais a

$$\begin{aligned} H_{01} : \mu_T - \mu_R \leq \theta_{inf} \text{ versus } H_{11} : \mu_T - \mu_R > \theta_{inf} \text{ e} \\ H_{02} : \mu_T - \mu_R \geq \theta_{sup} \text{ versus } H_{12} : \mu_T - \mu_R < \theta_{sup}. \end{aligned} \quad (4.4.14)$$

onde $\theta_{inf} = -0, 2\mu_R$ e $\theta_{sup} = 0, 2\mu_R$ são os limites de bioequivalência para a medida farmacocinética em escala original, segundo a regra $\pm 20\%$.

Os dois conjuntos de hipóteses unilaterais para a razão das médias μ_T/μ_R das medidas farmacocinética em escala original são definidos como

$$\begin{aligned} H_{01} : \frac{\mu_T}{\mu_R} \leq \delta_{inf} \quad \text{versus} \quad H_{11} : \frac{\mu_T}{\mu_R} > \delta_{inf} \quad e \\ H_{02} : \frac{\mu_T}{\mu_R} \geq \delta_{sup} \quad \text{versus} \quad H_{12} : \frac{\mu_T}{\mu_R} < \delta_{sup}, \end{aligned} \quad (4.4.15)$$

onde $\delta_{inf} = 0,8$ e $\delta_{sup} = 1,20$ são os limites de bioequivalência, segundo o regra de $\pm 20\%$ de μ_R .

Porém, quando utiliza-se a transformação logarítmica nas medidas farmacocinéticas, os limites de bioequivalência dos dois conjuntos de hipóteses unilaterais em (4.4.15) são definidos como $\delta_{inf} = 0,80$ e $\delta_{sup} = 1,25$ (segundo a regra 80/125). No entanto, os limites de bioequivalência das hipóteses intervalares em (4.4.14), para o teste estatístico da diferença das médias, são $\theta_{inf} = -0,2231$ e $\theta_{sup} = 0,2231$.

4.4.1 Os Dois Testes t Unilaterais de Schuirmann

Schuirmann (1987) propôs um método paramétrico baseado em dois testes t unicaudais assumindo-se que a medida farmacocinética de interesse, em escala original ou logarítmica, de um experimento *crossover* satisfaz as seguintes pressuposições:

- (i) normalidade dos dados na escala original ou logarítmica;
- (ii) não existência de diferença significativa para os efeito de *carry-over* para o caso particular de um experimento *crossover* 2 x 2.

A - Medida Farmacocinética em Escala Original

Conclui-se que a formulação T é bioequivalente à R se ambas as hipóteses nulas dos dois conjuntos de hipóteses unilaterais H_{01} e H_{02} em (4.4.14) são rejeitadas a um nível α de significância através dos seguintes testes estatísticos:

$$T_{inf} = \frac{F^* - \theta_{inf}}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} > t_{(\alpha; gl)}, \quad T_{sup} = \frac{F^* - \theta_{sup}}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} < -t_{(\alpha; gl)} \quad (4.4.16)$$

onde θ_{inf} e θ_{sup} são os limites de bioequivalência adotados;
 $\hat{\sigma}_e^2$ é a estimativa do erro quadrático médio intra-indivíduos da tabela de Análise de Variância;
 N^* e gl estão definido na Seção 4.3.1;

$$F^* = \begin{cases} \bar{Y}_T - \bar{Y}_R & , \text{para um experimento } crossover \ 2 \times 2; \\ \hat{F}/C & , \text{na presença de efeito de } carry-over \text{ para um } crossover \ 4 \times 2 \\ \hat{F} & , \text{na ausência de efeito de } carry-over \text{ para um } crossover \ 4 \times 2; \\ \hat{F} & , \text{para um experimento } crossover \ 2 \times 3; \\ \hat{F}/C & , \text{na presença de efeito de } carry-over \text{ de um } crossover \ 2 \times 4 \\ \hat{F} & , \text{na ausência de efeito de } carry-over \text{ de um } crossover \ 4 \times 2 \\ \hat{F} & , \text{para um } crossover \ 4 \times 4. \end{cases}$$

O intervalo de confiança clássico de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\mu_T - \mu_R$ equivale aos dois testes t unilaterais de Schuirman, pois se $(L_{inf}; L_{sup}) \subset (\theta_{inf}; \theta_{sup})$, então as hipóteses H_{01} e H_{02} são rejeitadas ao nível de significância α pelos dois testes unilaterais de Schuirman.

B - Medida Farmacocinética em Escala Logarítmica

Considere $\tilde{\mu}_R$ e $\tilde{\mu}_T$ como sendo as médias geométricas das formulações R e T em escala original e as seguintes hipóteses intervalares para a razão das médias:

$$\begin{aligned} H_{01} : \frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R} &\leq 0,8 \quad \text{versus} \quad H_{11} : \frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R} > 0,8 \quad e \\ H_{02} : \frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R} &\geq 1,25 \quad \text{versus} \quad H_{12} : \frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R} < 1,25, \end{aligned} \quad (4.4.17)$$

Portanto, as hipóteses intervalares para a análise da medida farmacocinética na escala logarítmica pode ser encontrada aplicando a transformação logarítmica nas hipóteses em (4.4.17), como apresentado a seguir:

$$\begin{aligned} H_{01} : \ln\left(\frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R}\right) &\leq \ln(0,8) \quad \text{versus} \quad H_{11} : \ln\left(\frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R}\right) > \ln(0,8) \quad e \\ H_{02} : \ln\left(\frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R}\right) &\geq \ln(1,25) \quad \text{versus} \quad H_{12} : \ln\left(\frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R}\right) < \ln(1,25), \end{aligned}$$

que resulta nas seguintes hipóteses intervalares para o teste de Schuirman:

$$\begin{aligned} H_{01} : \mu_T - \mu_R &\leq -0,2231 \quad \text{versus} \quad H_{11} : \mu_T - \mu_R > -0,2231 \quad e \\ H_{02} : \mu_T - \mu_R &\geq 0,2231 \quad \text{versus} \quad H_{12} : \mu_T - \mu_R < 0,2231. \end{aligned} \quad (4.4.18)$$

Aplicando-se os dois testes t unilaterais de Schuirman para as hipóteses intervalares em (4.4.18), tem-se que as duas formulações R e T são bioequivalentes se

$$T_{inf} = \frac{F^* - \theta_{inf}}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} > t_{(\alpha; gl)} \quad e \quad T_{sup} = \frac{F^* - \theta_{sup}}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} < -t_{(\alpha; gl)}, \quad (4.4.19)$$

onde os limites de bioequivalência são $\theta_{sup} = -\theta_{inf} = 0,2231$;

$\hat{\sigma}_e^2$ é a estimativa do erro quadrático médio intra-indivíduos da tabela de Análise de Variância;

N^* e gl estão definidos na Seção 4.3.1;

$$F^* = \begin{cases} \bar{Y}_T - \bar{Y}_R & , \text{para um experimento } crossover \ 2 \times 2; \\ \hat{F}/C & , \text{na presença de efeito de } carry-over \text{ para um } crossover \ 4 \times 2 \\ \hat{F} & , \text{na ausência de efeito de } carry-over \text{ para um } crossover \ 4 \times 2; \\ \hat{F} & , \text{para um experimento } crossover \ 2 \times 3; \\ \hat{F}/C & , \text{na presença de efeito de } carry-over \text{ de um } crossover \ 2 \times 4 \\ \hat{F} & , \text{na ausência de efeito de } carry-over \text{ de um } crossover \ 4 \times 2 \\ \hat{F} & , \text{para um } crossover \ 4 \times 4. \end{cases}$$

O programa em linguagem *SAS* é apresentado no Apêndice para a realização o teste de bio-equivalência proposto por Schuirmann. Na Seção 4.5, um exemplo numérico é apresentado para ilustrar o emprego deste teste na prática.

4.4.2 Teste Paramétrico de Anderson e Hauck

A - Medida na Escala Original

Considerando-se satisfeitas as pressuposições de normalidade e de igualdade dos efeitos de *carry-over* (no caso particular do experimento 2 x 2) , Anderson e Hauck(1983) propuseram o seguinte teste estatístico para as hipóteses intervalares dadas em (4.4.13):

$$T_3 = \frac{F^* - (\theta_{inf} + \theta_{sup})/2}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}}, \quad (4.4.20)$$

onde a estatística T_3 tem distribuição t não-central com gl graus de liberdade e parâmetro de não-centralidade dado por

$$\delta = \frac{\mu_T - \mu_R - (\theta_{inf} + \theta_{sup})/2}{\sigma_e \sqrt{N^*}}, \quad (4.4.21)$$

onde θ_{inf} e θ_{sup} são limites de bioequivalência adotados;
 $\hat{\sigma}_e^2$, F^* e N^* estão definidos na Seção 4.3.1.

Portanto, rejeita-se a hipótese nula H_0 em (4.4.13) se

$$P(C_1 < T_3 < C_2 | \mu_T - \mu_R = \theta_{inf}, \sigma_e) = P(C_1 < T_3 < C_2 | \mu_T - \mu_R = \theta_{sup}, \sigma_e) = \alpha.$$

Quando $C_1 = C_2 = C$, então a hipótese nula H_0 é rejeitada ao nível de significância α para o valor de C tal que

$$P(|T_2| < C | \mu_T - \mu_R = \theta_{inf}, \sigma_e) = P(|T_2| < C | \mu_T - \mu_R = \theta_{sup}, \sigma_e) = \alpha$$

Uma das dificuldades encontradas na aplicação deste teste está relacionada ao parâmetro de não-centralidade δ em (4.4.21), pois este parâmetro é geralmente desconhecido.

1 - Parâmetro de não-centralidade conhecido

Quando δ é conhecido, o valor p do teste pode ser obtido por

$$p = P(|T_3| < |t_3| | \mu_T - \mu_R = \theta_{inf}, \sigma_e), \quad (4.4.22)$$

onde t_3 é o valor observado da estatística T_3 em (4.4.20). Logo, rejeita-se a hipótese nula H_0 quando $p < \alpha$, concluindo-se que as formulações T e R são bioequivalentes.

2 - Parâmetro de não-centralidade desconhecido

Nos casos em que o parâmetro de não-centralidade é desconhecido, então deve ser usada uma aproximação para encontrar o valor p do teste. Anderson e Hauck (1983) sugeriram uma aproximação que utiliza a distribuição t central. Portanto, o parâmetro δ pode ser estimado por

$$\hat{\delta} = \frac{(\theta_{sup} - \theta_{inf})/2}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}}.$$

Então, o valor p do teste pode ser obtido por

$$\begin{aligned} p &= P(|T_3| < |t_3| | \mu_T - \mu_R = \theta_{inf}, \sigma_e) = P(-|t_3| < T_3 < |t_3| | \mu_T - \mu_R = \theta_{inf}, \sigma_e) \\ &= P(-|t_3| - \hat{\delta} < T_3 - \hat{\delta} < |t_3| - \hat{\delta}) = F_t(|t_3| - \hat{\delta}) - F_t(-|t_3| - \hat{\delta}), \end{aligned} \quad (4.4.23)$$

onde F_t é a Função Distribuição Acumulada de uma distribuição t com gl graus de liberdade.

É importante lembrar que a aproximação apresentada em (4.4.23) também pode ser obtida utilizando-se as estatísticas T_{inf} e T_{sup} do teste de Schuirmann.

Se $t_3 > 0$, tem-se

$$\begin{aligned} |t_3| - \hat{\delta} &= \frac{F^* - (\theta_{sup} + \theta_{inf})/2 - (\theta_{sup} - \theta_{inf})/2}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} = \\ &= \frac{F^* - \theta_{sup}}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} = T_{sup}. \end{aligned}$$

Para $-|t_3| - \hat{\delta}$, tem-se que

$$\begin{aligned} -|t_3| - \hat{\delta} &= \frac{-F^* + (\theta_{sup} + \theta_{inf})/2 - (\theta_{sup} - \theta_{inf})/2}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} = \\ &= -\frac{F^* - \theta_{inf}}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} = -T_{inf}. \end{aligned}$$

Logo, o valor- p do teste para avaliar a bioequivalência das formulações pode ser obtido como

$$p = F_t(|t_3| - \hat{\delta}) - F_t(-|t_3| - \hat{\delta}) = F_t(T_{sup}) - F_t(-T_{inf}).$$

Se $t_3 < 0$, tem-se que

$$\begin{aligned} |t_3| - \hat{\delta} &= \frac{-F^* + (\theta_{sup} + \theta_{inf})/2 - (\theta_{sup} - \theta_{inf})/2}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} = \\ &= -\frac{F^* - \theta_{inf}}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} = -T_{inf}. \end{aligned}$$

Para $-|t_3| - \hat{\delta}$, tem-se que

$$\begin{aligned} -|t_3| - \hat{\delta} &= \frac{F^* - (\theta_{sup} + \theta_{inf})/2 - (\theta_{sup} - \theta_{inf})/2}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} = \\ &= \frac{(F^* - \theta_{sup})}{\hat{\sigma}_e \sqrt{N^*}} = T_{sup}. \end{aligned}$$

Portanto, o valor- p do teste de Anderson e Hauck para $t_3 < 0$ pode ser calculado como

$$p = F_t(|t_3| - \hat{\delta}) - F_t(-|t_3| - \hat{\delta}) = F_t(-T_{inf}) - F_t(T_{sup}).$$

No Apêndice, é apresentado um programa em *SAS* que pode ser utilizado para testar a bioequivalência média das formulações T e R segundo o método proposto por Anderson-Hauck.

B - Medida na Escala Logarítmica

Após calcular a estimativa do efeito direto da formulação F^* para o experimento *crossover*, utilizando-se a medida farmacocinética com transformação logarítmica, aplica-se o teste de Anderson-Hauck para as hipóteses intervalares definidas em (4.4.18). Se o valor- p do teste de Anderson-Hauck for inferior a 5%, então as hipóteses nulas são rejeitadas, concluindo que a formulação T é bioequivalente à R .

Um programa em *SAS* para a aplicação do teste de Anderson-Hauck nos dados com transformação logarítmica é apresentado no Apêndice.

4.5 Aplicação dos Métodos Paramétricos

Como motivação do emprego dos métodos estatísticos paramétricos para a análise de bioequivalência média, considere os dados da medida farmacocinética ASC do exemplo abordado no Capítulo 3. As médias de mínimos quadrados da ASC , em escala original e logarítmica, das formulações T e R estão apresentadas na Tabela 4.5.3.

Tabela 4.5.3: Médias de ASC das Formulações Teste T e Referência R da Tabela 3.1.2.

Escala	Teste T	Referência R	$\hat{\sigma}_e$
Original	21,124	19,578	3,2413
Logarítmica	2,930	3,004	0,1439

Utilizando-se o programa em *SAS*, pode-se obter os limites do intervalo de confiança clássico de 90% para $\mu_T - \mu_R$ e μ_T/μ_R da medida farmacocinética ASC , em escala original e logarítmica, como apresentados na Tabela 4.5.4.

Tabela 4.5.4: Intervalos de Confiança de 90% para $\mu_T - \mu_R$ e μ_T/μ_R de ASC_t das formulações R e T .

Escala	IC de 90%	Limites do IC	Probabilidade do IC $\subset LB^*$	Limites de Bioequivalência	Conclusão
Original	$\mu_T - \mu_R$	Clássico (-0,641;3,726)	0,589	(-3,916;3,916)	<i>BEM**</i>
		Westlake (-3,213;3,213)	0,609	(-3,916;3,916)	BEM
	μ_T/μ_R	Clássico (0,967;1,190)	0,591	(0,8;1,2)	BEM
		Locke (0,968;1,198)	0,582	(0,8;1,2)	BEM
Logarítmica	$\mu_T - \mu_R$	Clássico (-0,023;0,171)	0,828	(-0,2231;0,2231)	BEM
		Westlake (-0,1483;0,1483)	0,963	(-0,2231;0,2231)	BEM
	μ_T/μ_R	Clássico (0,977;1,187)	0,812	(0,8;1,25)	BEM
		Locke (0,9923;1,059)	0,861	(0,8;1,25)	BEM

LB^* : Limites de Bioequivalência e BEM^{**} : Bioequivalência Média.

Para comparar as amplitudes dos intervalos de confiança construídos para cada um dos métodos, foi realizado um estudo comparativo dos intervalos de confiança clássico e de Westlake para a diferença e dos intervalos de confiança clássico e de Locke para a razão das médias, através da simulação de 3000 amostras utilizando-se o método *bootstrap*. A partir do estudo destas simulações, observou-se que em 98,6% das 3000 amostras geradas, a amplitude do intervalo de confiança clássico, para a diferença de médias, foi menor que o de Westlake, da medida farmacocinética ASC em escala original. No entanto, quando a ASC está na escala logarítmica, em 99,1% das 3000 amostras a amplitude do intervalo de confiança clássico, para a diferença de médias, foi menor que a do intervalo

de Westlake. Para as amplitudes dos intervalos de confiança para a razão das médias, verificou-se que em 52,1% das amostras geradas, na escala original, o intervalo de confiança clássico apresentou amplitude maior que a do intervalo de Locke. Na escala logarítmica, foi obtido que em 35,8% das amostras geradas a amplitude do intervalo de confiança clássico foi maior que a do intervalo de confiança de Locke.

Como ilustração numérica da aplicação do teste de Schuirmann para avaliar a bioequivalência das formulações T e R , considere os dados de ASC da Tabela 3.1.2. Os dois conjuntos de hipóteses a serem testadas segundo a regra $\pm 20\%$ pelos dois testes unilaterais estão apresentados na Tabela 4.5.5.

Tabela 4.5.5: Hipóteses de Bioequivalência para a Medida Farmacocinética nas Escalas Original e Logarítmica.

Escala	Hipóteses
Original	$H_{01} : \mu_T - \mu_R \leq -3,916$ versus $H_{11} : \mu_T - \mu_R > -3,916$
	e
	$H_{02} : \mu_T - \mu_R \geq 3,916$ versus $H_{12} : \mu_T - \mu_R < 3,916$
Logarítmica	$H_{01} : \mu_T - \mu_R \leq -0,2231$ versus $H_{11} : \mu_T - \mu_R > -0,2231$
	e
	$H_{02} : \mu_T - \mu_R \geq 0,2231$ versus $H_{12} : \mu_T - \mu_R < 0,2231$

Tabela 4.5.6: Resultados do Teste de Schuirmann para a ASC da Tabela 3.1.2.

Escala	T_{inf}	$Valor - p$	T_{sup}	$Valor - p$	Conclusão
Original	4,455	0,0004	-1,937	0,0387	BEM
Logarítmica	5,488	< 0,0001	-2,733	0,0091	BEM

Tabela 4.5.7: Resultados do Teste de Anderson-Hauck para a ASC da Tabela 3.1.2.

Escala	T_3	$\hat{\delta}$	$Valor - p$	Conclusão
Original	1,259	3,196	0,0379	BEM
Logarítmica	1,363	4,095	0,0091	BEM

Utilizando-se o programa apresentado no Apêndice, foram obtidos os resultados da Tabela 4.5.6, considerando-se a regra $\pm 20\%$ e o nível de 5% de significância. Portanto, conclui-se que a formulação T é bioequivalente à formulação R , segundo a medida farmacocinética ASC analisada.

Aplicando-se o teste paramétrico de Anderson-Hauck nos dados da Tabela 3.1.2, pode-se avaliar a bioequivalência média de T e R através das hipóteses da Tabela 4.5.5. Os resultados encontrados através do programa do Apêndice estão apresentados na Tabela 4.5.7. Considerando-se a regra $\pm 20\%$ e o nível de 5% de significância ($\alpha = 0,05$), pode-se concluir que as formulações T e R são bioequivalentes.

4.6 Métodos Não-Paramétricos

Na prática, observa-se algumas vezes que a distribuição da medida farmacocinética pode não apresentar normalidade. Neste caso, recomenda-se a aplicação de alguns métodos não-paramétricos na análise de bioequivalência. A seguir, será apresentado o teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney e, para a construção de intervalos de confiança, serão apresentados dois métodos não-paramétricos: o baseado no estimador de Hodges e Lehmann (1963) e o de reamostragem *Bootstrap*.

4.6.1 Teste de Hipóteses de Wilcoxon-Mann-Whitney

Os métodos estatísticos paramétricos para a avaliação da bioequivalência pressupõem que S_{ik} e e_{ijk} do modelo em (3.1.1) são independentes e distribuídos segundo uma Normal com médias iguais a zero e variâncias σ_s^2 e σ_e^2 , respectivamente. Sob esta pressuposição, os testes de hipóteses e os intervalos de confiança podem ser realizados através dos testes t (estatísticas T) ou dos testes F (resultantes na *ANOVA*). No entanto, a medida de biodisponibilidade ASC ou C_{max} pode não apresentar distribuição Normal em escala original ou logarítmica, por exemplo. Para avaliar a bioequivalência nesta situação, é necessário empregar o método não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney, que é composto basicamente por dois testes não-paramétricos unilaterais. Este teste pressupõe apenas que a medida farmacocinética em estudo, obtida segundo um experimento *crossover*, não apresenta efeito de *carry-over* significativo ($C_R = C_T$). Este teste pode ser aplicado para os experimentos *crossover* 2 x 2, 2 x 3 e 2 x 4.

O teste não-paramétrico de bioequivalência é composto por dois testes não-paramétricos unilaterais, que são utilizados para testar as hipóteses de bioequivalência dadas em (4.4.14). As etapas para a execução do teste não-paramétrico são:

- (i) Obtenha as diferenças dos períodos d_{ik} , de acordo com o experimento *crossover* utilizado;
- (ii) Adotando-se a regra $\pm 20\%$, encontre as estimativas dos limites de bioequivalência através de $\hat{\theta}_{inf} = -0,2\bar{Y}_R$ e $\hat{\theta}_{sup} = 0,2\bar{Y}_R$, onde $\bar{Y}_R$ é a média amostral de mínimos quadrados da formulação R ;

(iii) Calcule as estimativas de

$$b_{h,ik} = \begin{cases} d_{ik} - \theta_h & , h = \inf, \sup, \text{ para a Seqüência 1;} \\ d_{ik} & , \text{ para a Seqüência 2,} \end{cases}$$

para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$; que é o estimador de $\theta_h^* = (\mu_T - \mu_R) - \theta_h = \theta - \theta_h$, $h = \inf, \sup$;

- (iv) Ordene as estimativas de $b_{h,ik}$, $h = \inf, \sup$; $i = 1, 2, \dots, n_k$ para $k = 1, 2$, atribuindo-lhes postos $R(b_{h,ik})$;
- (v) Some apenas os postos $R(b_{\inf,ik})$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ dos indivíduos da Seqüência 1(RT) e obtenha a estimativa de $R_{\inf}$;
- (vi) Repita novamente o passo (v) para os postos $R(b_{\sup,ik})$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ e obtenha a estimativa da soma dos postos $R_{\sup}$ das observações da Seqüência 2(RT);
- (vii) A bioequivalência média da formulação T em relação à formulação R é concluída se ambas as hipóteses nulas, H_{01} e H_{02} , em (4.4.14) forem rejeitadas ao nível de significância α , ou seja, se

$$W_{\inf} = R_{\inf} - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} > w_{(1-\alpha)} \quad e \quad W_{\sup} = R_{\sup} - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} < w_{(\alpha)}. \quad (4.6.24)$$

onde $w_{(\alpha)}$ e $w_{(1-\alpha)} = n_1 n_2 - w_{(\alpha)}$ são os percentis da distribuição da estatística de Wilcoxon-Mann-Whitney da Tabela 4.6.8.

Sob as hipóteses nulas, H_{01} e H_{02} , os valores esperados e as variâncias das estatísticas das somas dos postos $W_{\inf}$ e $W_{\sup}$ são iguais a

$$\begin{aligned} E(W_{\inf}) &= E(W_{\sup}) = \frac{n_1 n_2}{2} \quad e \\ V(W_{\inf}) = V(W_{\sup}) &= \frac{1}{12} n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1 - Q), \\ Q &= \frac{1}{(n_1 + n_2)(n_1 + n_2 - 1)} \sum_{v=1}^q (r_v^3 - r_v), \end{aligned} \quad (4.6.25)$$

onde q representa o número de grupos com observações de mesmo valor, ou seja, com empates; r_v representa o tamanho do grupo v com observações empatadas. Se não existirem empates, então $q = n_1 + n_2$ e $r_v = 1$, para $v = 1, 2, \dots, n_1 + n_2$; portanto, neste caso, $Q = 0$.

Quando o número total de indivíduos $n_1 + n_2$ do experimento *crossover* for superior a 40 e a razão n_1/n_2 for próxima de 1/2, a distribuição Normal pode ser utilizada como uma aproximação

para (4.6.24). Logo, a bioequivalência média pode ser concluída se

$$\begin{aligned} Z_{inf} &= \frac{W_{inf} - E(W_{inf})}{\sqrt{V(W_{inf})}} = \frac{R_{inf} - \left[\frac{n_1(n_1+n_2+1)}{2} \right]}{\sqrt{\frac{1}{12}n_1n_2[n_1+n_2+1-Q]}} > z_{(\alpha)}, \\ Z_{sup} &= \frac{W_{sup} - E(W_{sup})}{\sqrt{V(W_{sup})}} = \frac{R_{sup} - \left[\frac{n_1(n_1+n_2+1)}{2} \right]}{\sqrt{\frac{1}{12}n_1n_2[n_1+n_2+1-Q]}} < -z_{(\alpha)}, \end{aligned}$$

onde $z_{(\alpha)}$ é o α -ésimo percentil da distribuição Normal padrão.

É apresentado no Apêndice um programa em *SAS* para a aplicação do teste de hipóteses não-paramétrico na medida farmacocinética em estudo.

4.6.2 Intervalo de Confiança Não-Paramétrico

Um intervalo de confiança de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para a diferença das médias $\theta = \mu_T - \mu_R$ pode ser construído baseado no estimador proposto por Hodge e Lehmann (1963). Este método pode ser aplicado para os experimentos *crossover* 2 x 2; 2 x 3 e 2 x 4. O intervalo de confiança pode ser construído a partir do seguinte procedimento:

- (i) A partir das diferenças dos períodos d_{ik} , para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$, calcule todas as diferenças das seqüências 1 e 2, isto é, $D_{i,k} = d_{i1} - d_{k2}$, para $i = 1, 2, \dots, n_1$ e $k = 1, 2, \dots, n_2$;
- (ii) Ordene em ordem crescente todas as n_1n_2 diferenças $D_{i,k}$ encontradas, denotando-as por $D(i)$, $i = 1, 2, \dots, n_1n_2$;
- (iii) Encontre a mediana das diferenças $D(i)$, $i = 1, 2, \dots, n_1n_2$, que é o estimador não-paramétrico de Hodges-Lehmann para $\theta = \mu_t - \mu_R$. Logo, o estimador de θ é

$$\hat{\theta} = \begin{cases} \frac{1}{2}(D(\frac{n_1n_2}{2}) - D(\frac{n_1n_2}{2} + 1)), & \text{se } n_1n_2 \text{ par;} \\ D(\frac{n_1n_2-1}{2} + 1), & \text{se } n_1n_2 \text{ ímpar.} \end{cases}$$

- (iii) Os limites do intervalo de confiança não-paramétrico de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para $\mu_T - \mu_R$ são dados por

$$L_{inf} = D(w_{(\alpha)}) \quad e \quad L_{sup} = D(w_{(1-\alpha)} + 1), \quad (4.6.26)$$

onde $w_{(\alpha)}$ e $w_{(1-\alpha)}$ são os valores críticos da distribuição discreta da estatística da soma dos postos.

Para duas amostras de tamanhos n_1 e n_2 , pode-se gerar a distribuição discreta da soma dos postos W para encontrar os valores de $w_{(\alpha)}$ e $w_{(1-\alpha)}$, que são utilizados na construção do intervalo de confiança exato.

Considere w_i como sendo o valor da soma dos postos dos indivíduos da Sequência 1 da amostra combinada pelas duas sequências do experimento *crossover* 2 x 2. Portanto, a distribuição da soma dos postos W para duas amostras de tamanhos n_1 e n_2 apresenta os seguintes valores de soma dos postos $w_i = n_1(n_1 + 1)/2, n_1(n_1 + 1)/2 + 1, \dots, n_1(n_1 + 1)/2 + n_1n_2$, para $i = 1, 2, \dots, n_1n_2 + 1$, respectivamente. Para construir a distribuição de W , é necessário calcular as probabilidades p_i associadas a cada $w_i, i = 1, 2, \dots, n_1 + n_2 + 1$. Para tanto, é importante obter todas as possíveis combinações C_{comb} dos postos da amostra combinada formada por $n_1 + n_2$, para os n_1 indivíduos da Sequência 1(RT). Portanto, tem-se um total de

$$C_{comb} = \frac{(n_1 + n_2)!}{n_1!n_2!},$$

possíveis combinações de postos, cujos postos são somados para cada combinação a fim de que possam ser utilizados no cálculo das frequências f_i dos valores da soma dos postos w_i .

Após construir a distribuição da soma dos postos, pode-se calcular as probabilidades $\sum_i p_i \leq 0,05$ e $\sum_i p_i \geq 0,95$, e encontrar as somas dos postos $R_{0,05}$ e $R_{0,95}$ correspondente aos valores críticos $w(0,05)$ e $w(0,95)$ utilizados na construção do intervalo de confiança exato para $\mu_T - \mu_R$.

Existe a seguinte relação entre os valores críticos e as somas dos postos:

$$\begin{aligned} w(0,05) &= R_{0,05} - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} + 1, \\ w(0,95) &= n_1n_2 + 1 - w(0,05). \end{aligned}$$

É importante ressaltar que o intervalo de confiança não-paramétrico não é exatamente de 90%, pois a distribuição da soma dos postos é uma variável aleatória discreta. Portanto, o coeficiente de confiança deste intervalos é geralmente superior a 90%. A Tabela 4.6.8 apresenta os valores de $w(0,05)$ e os coeficientes de confiança do intervalo não-paramétrico construídos para os tamanhos amostrais $n_1 + n_2$, que variam de 6 a 24.

Algumas vezes, pode-se observar que os limites do intervalo de confiança para a medida farmacocinética podem apresentar empates, ou seja, podem existir algumas diferenças D_{ik} que possuem o mesmo valor em um dos limites do intervalo de confiança ou até mesmo nos dois. Como solução para este caso, pode-se aumentar a amplitude do intervalo de confiança e recalculer o coeficiente do intervalo de confiança encontrado.

Tabela 4.6.8: Valores de $w_{(0,05)}$ para a Construção de Intervalos de Confiança Não-paramétricos de 90% para $\mu_T - \mu_R$ e Coeficiente de Confiança do Intervalo Não-paramétrico para tamanhos amostrais $n_1 + n_2$, que variam de 6 a 24.

n_1/n_2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	1	1	2	3	3	4	5	5	6	6
	0,900	0,942	0,928	0,904	0,934	0,916	0,900	0,924	0,912	0,930
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0,942	0,943	0,936	0,933	0,927	0,927	0,924	0,924	0,922	0,922
5	2	3	5	6	7	9	10	12	13	14
	0,928	0,936	0,905	0,917	0,927	0,907	0,9171	0,901	0,91	0,918
6	3	4	6	8	9	11	13	15	17	18
	0,904	0,933	0,917	0,907	0,926	0,919	0,912	0,906	0,902	0,917
7	3	5	7	9	12	14	16	18	20	22
	0,934	0,927	0,927	0,926	0,903	0,906	0,909	0,9122	0,915	0,917
8	4	6	9	11	14	16	19	21	24	27
	0,916	0,927	0,907	0,919	0,906	0,917	0,907	0,907	0,917	0,909
9	5	7	10	13	16	19	22	25	28	31
	0,900	0,924	0,917	0,912	0,909	0,907	0,906	0,905	0,905	0,904
10	5	8	12	15	18	21	25	28	32	35
	0,924	0,924	0,901	0,906	0,912	0,907	0,905	0,911	0,901	0,907
11	6	9	13	17	20	24	28	32	35	39
	0,912	0,922	0,910	0,902	0,915	0,917	0,905	0,901	0,9121	0,909
12	6	10	14	18	22	27	31	35	39	43
	0,930	0,922	0,918	0,917	0,917	0,909	0,904	0,907	0,909	0,911

4.6.3 Intervalo de Confiança Bootstrap

Chow e Liu (2000) sugerem a construção de um intervalo de confiança não-paramétrico de $(1 - 2\alpha) \times 100\%$, para $\delta = \mu_T / \mu_R$, utilizando-se o método de reamostragem *Bootstrap* proposto por Efron(1982).

Utilizando-se notação matricial, considere $\mathbf{Y}_{ik} = (Y_{i1k} Y_{i2k})'$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$. Sob a pressuposição de normalidade, $\mathbf{Y}_{ik}$ tem distribuição $N(\mu_k, \Sigma)$, onde μ_k e Σ são definidos na Seção 2.2.2. Portanto, o vetor de médias pode ser definido por $\bar{\mathbf{Y}}_{.k} = (1/n_k)(\sum_{i=1}^{n_k} Y_{i1k}, \sum_{i=1}^{n_k} Y_{i2k})'$ para a k -ésima seqüência do experimento *crossover* 2 x 2. Aplicando-se o Teorema Central do

Limite para vetores, tem-se que

$$\sqrt{n_1 + n_2} \left[\begin{pmatrix} \bar{Y}_{.1} \\ \bar{Y}_{.2} \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \end{pmatrix} \right] \xrightarrow{D} N(\mathbf{0}, \Sigma')$$

onde

$$\Sigma' = \begin{pmatrix} \lambda_1 \Sigma_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \Sigma_2 \end{pmatrix};$$

$$\lambda_k = \frac{n_k}{n_1 + n_2};$$

$\mu_k = E(\mathbf{Y}_{ik})$ e Σ_k é a matriz de variância-covariância do vetor $\mathbf{Y}_{ik}$.

A razão de médias das formulações T e R pode ser estimada através de $\hat{\delta} = \bar{Y}_T / \bar{Y}_R$. Aplicando-se o método Delta, obtém-se que a variância de $\hat{\delta}$ pode ser estimada por

$$\hat{V}(\hat{\delta}) = \frac{(C_{22} - 2C_{12}\hat{\delta} + C_{11}\hat{\delta}^2)}{(2\bar{Y}_R)^2},$$

onde C_{ij} é o elemento da i -ésima linha e da j -ésima coluna da matriz estimada $\lambda_1 \hat{\Sigma}_1 + \lambda_2 \hat{\Sigma}_2$, cujas componentes são obtidas por $\hat{\Sigma}_k = (\mathbf{Y}_{ik} - \bar{\mathbf{Y}}_{.k})(\mathbf{Y}_{ik} - \bar{\mathbf{Y}}_{.k})', k = 1, 2$.

O intervalo de confiança não-paramétrico *Bootstrap* de 90%, para $\delta = \mu_T / \mu_R$, pode ser construído através dos seguintes passos:

- (i) Calcule os valores de $\hat{\delta}$ e $\hat{V}(\delta)$ da amostra observada $\{\mathbf{Y}_{ik}, i = 1, 2, \dots, n_k, k = 1, 2\}$;
- (ii) A partir das observações $\mathbf{Y}_{ik}$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ do experimento *crossover* 2 x 2, retire duas amostras aleatórias com reposição dos dados observados, sendo a primeira amostra $\{A_{i1}^b, i = 1, 2, \dots, n_1\}$ de $\{\mathbf{Y}_{i1}, i = 1, 2, \dots, n_1\}$ e a segunda $\{A_{i2}^b, i = 1, 2, \dots, n_2\}$ de $\{\mathbf{Y}_{i2}, i = 1, 2, \dots, n_2\}$;
- (iii) Baseando-se na amostra replicada $\{A_{ik}^b, i = 1, 2, \dots, n_k, k = 1, 2\}$, obtenha os valores de $\hat{\delta}_b$, $\hat{V}(\delta_b)$ e

$$T_b = \frac{\sqrt{n_1 + n_2}(\hat{\delta}_b - \hat{\delta})}{\sqrt{\hat{V}(\hat{\delta}_b)}};$$

- (iv) Repita os passos (i) e (ii) um número b de vezes, recomenda-se que b seja superior a 1000.

- (v) Construa o intervalo de confiança para δ da amostra replicada

$$(\hat{\delta}_b - t_b \sqrt{\hat{V}(\delta_b)/(n_1 + n_2)}; \hat{\delta}_b + t_b \sqrt{\hat{V}(\delta_b)/(n_1 + n_2)})$$

e verifique se o intervalo construído esta dentro dos limites de bioequivalência (0, 8; 1, 20);

(vi) Os limites do intervalo de confiança de 90% para μ_T/μ_R são construídos através de

$$(\hat{\delta} - w(0, 05)\sqrt{\hat{V}(\delta)/(n_1 + n_2)}; \hat{\delta} + w(0, 95)\sqrt{\hat{V}(\delta)/(n_1 + n_2)})$$

onde $w(\alpha)$ é o valor correspondente ao percentil α da distribuição da estatística T_b utilizando o método de *Bootstrap*.

4.7 Aplicação dos Métodos não-paramétricos

A Tabela 4.7.9 apresenta as estimativas de $b_{h,ik}$, $h = inf, sup$ e seus respectivos postos $R(b_{h,ik})$ para a análise não-paramétrica da *ASC* da Tabela 3.1.2. Considerando-se a regra $\pm 20\%$ e nível de 5% de significância ($\alpha = 0,05$), a bioequivalência das formulações *T* e *R* pode ser testada através dos seguintes conjuntos de hipóteses:

$$\begin{aligned} H_{01} : \mu_T - \mu_R + 3,916 \leq 0 \quad vs \quad H_{11} : \mu_T - \mu_R + 3,916 > 0 \quad e \\ H_{02} : \mu_T - \mu_R - 3,916 \geq 0 \quad vs \quad H_{12} : \mu_T - \mu_R - 3,916 < 0. \end{aligned}$$

Tabela 4.7.9: Valores e Postos das estimativas de $b_{inf,ik}$ e $b_{sup,ik}$, para os Dados de *ASC* da Tabela 3.1.2.

Seqüência	Voluntário	Período 1	Período 2	d_{ik}	$b_{inf,ik}$	$R(b_{inf,ik})$	$b_{sup,ik}$	$R(b_{sup,ik})$
1(RT)	1	24,2	35,0	5,40	9,316	14,0	1,484	13,0
	3	25,8	25,3	-0,25	3,666	11,0	-4,166	5,0
	6	20,8	18,5	-1,15	2,766	8,0	-5,066	11,0
	7	19,0	20,6	0,80	4,716	12,0	-3,116	6,0
	9	19,3	17,4	-0,95	2,966	9,5	-4,866	2,5
	12	15,1	17,5	1,20	5,116	13,0	-2,716	7,0
	14	14,3	12,4	-0,95	2,966	9,5	-4,866	2,5
Soma	dos	postos	da	seqüência	1(RT)	77		37
2(TR)	2	25,7	29,1	1,70	1,70	7	1,70	14,0
	4	29,8	21,1	-4,35	-4,35	1	-4,35	4,0
	5	25,9	28,6	1,35	1,35	6	1,35	12,0
	8	24,0	18,6	-2,70	-2,70	2	-2,70	8,0
	10	13,9	9,3	-2,30	-2,30	3	-2,30	9,0
	11	16,2	14,3	-0,95	-0,95	4	-0,95	10,0
	13	13,5	14,6	0,55	0,55	5	0,55	11,0

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.7.9, tem-se que as estimativas para a somas dos postos R_{inf} e R_{sup} são iguais a 77 e 37, respectivamente. Portanto, os valores das estatísticas W_{inf} e W_{sup} do teste não-paramétrico são

$$W_{inf} = 77 - \frac{(7)(7+1)}{2} = 49 \quad e \quad W_{sup} = 37 - \frac{(7)(7+1)}{2} = 9.$$

A partir dos valores de $w_{(0,05)}$, apresentados na Tabela 4.6.8, tem-se que $w_{(0,05)} = 12$ é o 0,05-ésimo percentil da distribuição da soma dos postos para uma amostra de tamanhos $n_1 = n_2 = 7$. Logo, obtem-se também que $w_{(0,95)} = 7(7) - 12 = 37$.

Como $W_{inf} = 49 > w_{(0,95)} = 12$ e $W_{sup} = 9 < w_{(0,05)} = 37$, então ambas as hipóteses nulas H_{01} e H_{02} são rejeitadas ao nível de 5% de significância. Portanto, as formulações T e R são bioequivalentes, segundo a medida farmacocinética ASC da Tabela 3.1.2.

Para calcular o intervalo de confiança não-paramétrico de 90% para $\mu_T - \mu_R$, é necessário calcular as diferenças dos períodos d_{ik} , para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$, que estão apresentadas na Tabela 4.7.10.

Tabela 4.7.10: Diferenças dos períodos d_{ik} para os dados da Tabela 3.1.2.

Seqüência	Voluntário	Período 1	Período 2	d_{ik}
1 (RT)	1	24,2	35	5,40
	3	25,8	25,3	-0,25
	6	20,8	18,5	-1,15
	7	19,0	20,6	0,80
	9	19,3	17,4	-0,95
	12	15,1	17,5	1,20
	14	14,3	12,4	-0,95
2(TR)	2	25,7	29,1	1,70
	4	29,8	21,1	-4,35
	5	25,9	28,6	1,35
	8	24,0	18,6	-2,70
	10	13,9	9,3	-2,30
	11	16,2	14,3	-0,95
	13	13,5	14,6	0,55

A partir das diferenças dos períodos d_{ik} , o intervalo de confiança não-paramétrico de 90% para $\mu_T - \mu_R$ pode ser construído. Baseando-se na distribuição discreta da soma dos postos, os limites do intervalo de confiança não-paramétrico são calculados utilizando-se as diferenças das diferenças de períodos entre as seqüências 1(RT) e 2(TR), ou seja, através dos $n_1 * n_2 = 49$ valores ordenados das diferenças $D(i), i = 1, 2, \dots, 49$, como definidas na Seção 4.6.2.

A estimativa não-paramétrica de $\theta = \mu_T - \mu_R$ é dada pela mediana de $D(i), i = 1, 2, \dots, 49$, ou seja, $Med(D(i))$. Portanto, como $n_1 * n_2 = 49$ é ímpar, tem-se que o valor da mediana é dado por

$$\text{mediana de } D(i) = Med(D(i)) = D\left(\frac{n_1 n_2 - 1}{2} + 1\right) = D(25) = 1,35.$$

Através da construção da distribuição da soma dos postos para duas amostras de tamanhos $n_1 = n_2 = 7$, obtem-se os seguintes percentis $w_{(0,05)} = 12$ e $w_{(0,95)} = 38$, como apresentado na Tabela 4.6.8. Portanto, os limites do intervalo de confiança não-paramétrico exato para $\mu_T - \mu_R$ são iguais a $(D(w_{(0,05)}) = D(12); D(w_{(0,95)} + 1) = D(39)) = (-0,9; 3,5)$. Como a distribuição da soma dos postos é discreta, o coeficiente de confiança deste intervalo de confiança não-paramétrico é de 90,27%, sendo superior ao usual 90%. Como os limites do intervalo não-paramétrico $(-0,9; 3,5)$ estão contidos nos limites de bioequivalência $(-3,916; 3,916)$, então as formulações T e R são bioequivalentes, segundo a regra $\pm 20\%$. Através de um estudo de simulação de 3000 amostras geradas, sob a pressuposição de normalidade, verificou-se que a amplitude do intervalo de confiança clássico para a diferença das médias é menor que a do intervalo não-paramétrico em 67,9% das amostras geradas. Cerca de 90,2% dos intervalos construídos cobriam o verdadeiro valor de $\mu_T - \mu_R$ e apenas 58,6% destes intervalos estavam dentro dos limites de bioequivalência.

Construindo um intervalo de confiança *Bootstrap* de 90% para $\delta = \mu_T / \mu_R$ a partir dos dados da Tabela 3.1.2, obtem-se que $\hat{\delta} = 1,079$, $\hat{V}(\hat{\delta}) = 0,0861$. Baseando-se nas $b = 3000$ amostras de *bootstrap*, construiu-se o intervalo de confiança de 90% para μ_T / μ_R igual a $(0,94; 1,18)$ e observou-se uma probabilidade de cobertura igual a 84,1%. Como os limites do intervalo de confiança estão dentro dos limites de bioequivalência $(0,8; 1,20)$, pode-se concluir que a formulação T é bioequivalente a R . Utilizando-se um estudo de simulação de 3000 amostras geradas, observou-se que 69,6% das amostras apresentam um intervalo de confiança para a razão de médias de menor amplitude que o intervalo de confiança *bootstrap*. Cerca de 90,63% dos intervalos de *bootstrap* construídos para as amostras simuladas cobriam o verdadeiro valor de μ_T / μ_R , mas somente 58,2% dos intervalos estavam dentro dos limites de bioequivalência.

4.8 Poder do Teste

O poder de um teste estatístico é dado pela probabilidade de rejeitar a hipótese nula, H_0 , quando a hipótese alternativa, H_1 , é verdadeira. Assim, considerando-se as hipóteses de bioequivalência em (4.4.12), o poder do teste é dado pela probabilidade de concluir que a formulação T é bioequivalente à R , quando estas são realmente bioequivalentes. Existem duas formas de calcular o poder do teste de Schuirmann, utilizando-se a integração numérica da distribuição bivariada de (T_{inf}, T_{sup}) e o poder empírico, que consiste no estudo de amostras simuladas. O poder dos testes de bioequivalência pode ser calculado, para a medida farmacocinética na escala original ou logarítmica, como apresentado a seguir.

4.8.1 Método da Integração Numérica

Considere um experimento *crossover* balanceado 2 x 2 composto por n indivíduos, isto é, com $n_1 = n/2$ e $n_2 = n/2$ indivíduos alocados aleatoriamente às Sequências 1 (RT) e 2 (TR), respectivamente. Adotando-se um nível de significância α e um limite de bioequivalência $(\theta_{inf}, \theta_{sup})$ para os dois testes unilaterais de Schuirmann em (4.4.19), pode-se concluir a bioequivalência de T e R se $T_{inf} > t(\alpha, n_1 + n_2 - 2)$ e $T_{sup} < -t(\alpha, n_1 + n_2 - 2)$. Desta forma, o poder deste teste paramétrico pode ser obtido através do cálculo da seguinte probabilidade

$$P(T_{inf} > t(\alpha, n - 2) \text{ e } T_{sup} < -t(\alpha, n - 2) | \theta_{inf} < \mu_T - \mu_R < \theta_{sup}, \sigma_d), \quad (4.8.27)$$

onde o vetor aleatório bivariado (T_{inf}, T_{sup}) dado em (4.4.19) tem distribuição bivariada t de Student não-central com $n - 2$ graus de liberdade, correlação igual a 1 e parâmetros de não-centralidade iguais a

$$\delta_{inf} = \frac{(\mu_T - \mu_R) - \theta_{inf}}{\sigma_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \text{ e } \delta_{sup} = \frac{(\mu_T - \mu_R) - \theta_{sup}}{\sigma_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}, \quad (4.8.28)$$

onde μ_R e μ_T são respectivamente as médias das formulações R e T ;

θ_{inf} e θ_{sup} representam os respectivos limites de bioequivalência inferior e superior;

$\sigma_d^2 = \sigma_e^2/2$, σ_e^2 é a variabilidade intra-indivíduos do experimento *crossover* 2 x 2.

Phillips (1990) sugeriu que o poder dos dois testes unilaterais de Schuirmann (4.8.27) pode ser calculado através de um método de integração numérica da distribuição bivariada t de Student não-central determinada pelo vetor bivariado (T_{inf}, T_{sup}) . Como esta distribuição bivariada t tem correlação igual a 1, pode ser utilizado o método de integração apresentado por Owen (1965), que consiste em calcular a integral da distribuição bivariada t não-central através da diferença das integrais de duas distribuições univariadas t não-centrais. Então, utilizando-se este método, o

poder do teste paramétrico de Schuirmann em (4.8.27) pode ser escrito como

$$\begin{aligned} P(T_{inf} > t(\alpha, n-2) \text{ e } T_{sup} < -t(\alpha, n-2) | \theta_{inf} < \mu_T - \mu_R < \theta_{sup}, \sigma_d) = \\ = Q[-t(\alpha, f), \delta_{sup}, 0, \psi] - Q[t(\alpha, f), \delta_{inf}, 0, \psi], \end{aligned} \quad (4.8.29)$$

com

$$\begin{aligned} \delta_{inf} &= \frac{(\mu_T - \mu_R) - \theta_{inf}}{\sigma_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad \text{e} \quad \delta_{sup} = \frac{(\mu_T - \mu_R) - \theta_{sup}}{\sigma_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}; \\ Q[t, \delta, 0, \psi] &= [\sqrt{2\pi}/(\Gamma(f/2)2^{f/2-1})] \int_0^\psi \Phi\left(\frac{ty}{\sqrt{f}} - \delta\right) y^{f-1} \Phi'(y) dy, \end{aligned}$$

$$\Phi'(y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-y^2/2), \quad f = n - 2, \quad \psi = \frac{\delta_{inf} - \delta_{sup}}{A_1 - A_2}, \quad A_i = \frac{t_i}{\sqrt{f}} \quad \text{para } i = 1, 2; \quad t_2 = -t_1 = -t(\alpha, f).$$

O cálculo do poder dos dois testes t unilaterais de Schuirmann, para a medida farmacocinética sem e com transformação logarítmica, é apresentado abaixo:

A - Medida Farmacocinética na Escala Original

Por simplicidade, pressupõe-se que não existe efeito significativo de *carry-over* e que a medida farmacocinética na escala original apresente distribuição Normal. Portanto, o cálculo do poder do teste de Schuirmann, para a medida farmacocinética sem transformação, pode ser obtido considerando-se as estimativas amostrais das médias das formulações R e T , e da variabilidade intra-indivíduos σ_e^2 como valores populacionais. No cálculo do poder, é necessário adotar um nível de significância α para o teste e a regra de $\pm 20\%$, que determina os limites de bioequivalência $(-0, 2\mu_R; 0, 2\mu_R)$. Desta forma, o poder do teste de Schuirmann é obtido aplicando-se estes resultados na expressão (4.8.29).

B - Medida Farmacocinética na Escala Logarítmica

Neste caso, pressupõe-se que a medida farmacocinética com transformação logarítmica apresenta distribuição Normal e que não existe efeito significativo de *carry-over* no experimento *crossover* 2 x 2. Assumindo-se que as estimativas amostrais das médias e de σ_e^2 como valores populacionais, o poder dos dois testes t unilaterais de Schuirmann pode ser calculado através de (4.8.29), adotando-se nível de significância α e limites de bioequivalência $(-0, 2231; 0, 2231)$.

4.8.2 Método do Poder Empírico

Uma alternativa proposta por Chow e Liu (2000), para calcular o poder dos dois testes t unilaterais de Schuirmann, é o uso do método empírico, que consiste no estudo de simulação paramétrica, onde amostras de uma medida farmacocinética de interesse são geradas segundo um experimento *crossover* 2 x 2. Sob a pressuposição de normalidade da medida farmacocinética em escala original, o poder empírico pode ser utilizado para calcular o poder dos testes paramétricos de Schuirmann e de Anderson-Hauck, e do teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Sob a pressuposição de normalidade da medida farmacocinética na escala logarítmica, pode-se também calcular o poder empírico dos testes paramétricos de Schuirmann e de Anderson-Hauck. A seguir, são apresentados os passos para o cálculo do poder empírico dos testes, sob a pressuposição de normalidade da medida farmacocinética nas escalas original e logarítmica.

A - Medida Farmacocinética na Escala Original

Sob a pressuposição de normalidade da medida farmacocinética sem transformação logarítmica, tem-se que o vetor bivariado (Y_{i1k}, Y_{i2k}) apresenta distribuição Normal bivariada com vetor de médias μ_k e matriz de variância-covariância Σ_k , para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$, como apresentado na Seção 2.2.2. Portanto, para calcular o poder empírico dos testes de Schuirmann, de Anderson-Hauck e do não-paramétrico, é necessário seguir os passos do procedimento descrito abaixo:

- (1) Considerando-se os valores estimados de μ_R, μ_T, σ_e^2 e σ_s^2 como populacionais; gere $n_1 + n_2$ vetores bivariados normais $(Y_{i11}, Y_{i21})'$, que correspondem a alguma medida farmacocinética de interesse, segundo um experimento *crossover* 2 x 2 através dos seguintes passos:
 - (i) utilizando-se a função *VNORMAL* do Módulo *IML* do *SAS*, gere n_1 vetores normais bivariados $(Y_{i11}, Y_{i21})'$, $i = 1, 2, \dots, n_1$, correspondentes às respostas observadas na Sequência 1 (*RT*); sendo que a primeira componente deste vetor representa a resposta observada no Período 1 e a segunda, a resposta no Período 2. Estes vetores bivariados normais são gerados com o vetor bivariado das médias das formulações *R* e *T*,

$$\mu_{RT} = \begin{pmatrix} \mu_R \\ \mu_T \end{pmatrix},$$

e com matriz de variância-covariância

$$\Sigma = \begin{pmatrix} \sigma_e^2 + \sigma_s^2 & \sigma_s^2 \\ \sigma_s^2 & \sigma_e^2 + \sigma_s^2 \end{pmatrix};$$

- (ii) Repetindo-se o passo (i) acima, porém trocando o vetor bivariado das médias das formulações por

$$\mu_{TR} = \begin{pmatrix} \mu_T \\ \mu_R \end{pmatrix},$$

pode-se gerar n_2 vetores normais bivariados, (Y_{i12}, Y_{i22}) , $i = 1, 2, \dots, n_2$, referente às respostas observadas na Sequência 2 (TR);

- (2) Dada a amostra gerada, calcule as médias amostrais das formulações T e R representadas, respectivamente, por $\bar{Y}_T$ e $\bar{Y}_R$; por exemplo, utilizando-se a regra $\pm 20\%$, estime os limites de bioequivalência através de $\hat{\theta}_{inf} = -0,2\bar{Y}_R$ e $\hat{\theta}_{sup} = 0,2\bar{Y}_R$; adote um determinado nível de significância $\alpha = 0,05$ para avaliar a bioequivalência da amostra gerada através dos testes paramétricos e não-paramétrico. Para calcular o poder empírico dos testes paramétricos de Schuirmann e de Anderson-Hauck, encontre:

- (i) a estimativa da variância da variabilidade intra-indivíduos σ_e^2 ;
- (ii) os valores de T_{inf} e T_{sup} em (4.4.19) e avalie a bioequivalência da amostra aleatória gerada, utilizando-se o teste de Schuirmann.
- (iii) os valores de T_3 , δ e o valor-p, da Seção 4.3.2, e verifique se a amostra gerada é bioequivalente, segundo o teste de Anderson-Hauck;

O poder empírico do teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney pode ser encontrado seguindo os passos:

- (i) obtenha as diferenças dos períodos d_{ik} , para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$;
 - (ii) calcule as estimativas de $b_{inf,ik}$ e $b_{sup,ik}$ para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$;
 - (iii) ordene as estimativas obtidas para $b_{inf,ik}$, $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$, atribuindo-lhes postos $R(b_{inf,ik})$;
 - (iv) some apenas os postos $R(b_{inf,ik})$ dos indivíduos da Sequência 1 (RT), obtendo-se R_{inf} ;
 - (v) ordene as estimativas obtidas para $b_{sup,ik}$, $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$, atribuindo-lhes postos $R(b_{sup,ik})$;
 - (vi) some apenas os postos $R(b_{sup,ik})$ dos indivíduos da primeira sequência TR , obtendo R_{sup} ;
 - (vii) avalie também a bioequivalência da amostra gerada através de (4.6.24);
- (3) os passos em (1) e (2) são repetidos um número b de vezes; recomenda-se a realização de, no mínimo, 1.000 repetições;
- (4) o poder empírico de cada um dos testes é dado pela proporção de vezes em que se concluiu a bioequivalência das b amostras aleatórias geradas para cada um dos testes aplicados.

B - Medida Farmacocinética na Escala Logarítmica

Em algumas situações práticas a suposição de normalidade para os dados sem transformação pode não ser adequada, pois a distribuição da medida farmacocinética apresenta certa assimetria. Nestes estudos de bioequivalência, pressupõe-se que o vetor de observações individuais com transformação logarítmica $(Y_{i1k}, Y_{i2k})' = (\ln(X_{i1k}), \ln(X_{i2k}))'$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ apresenta distribuição Normal bivariada com vetor de médias μ_k e matriz de variância-covariância Σ_k , como apresentado na Seção 2.2.2. Portanto, o vetor bivariado $(X_{i1k}, X_{i2k})'$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ na escala original apresenta distribuição log-Normal com vetor de médias μ_k e matriz de variância-covariância Σ_k . Logo, o poder empírico dos testes de Schuirmann e de Anderson-Hauck pode ser calculado seguindo os passos do procedimento descrito a seguir :

- (1) Baseado nos dados com transformação logarítmica, calcule as estimativas amostrais das médias das formulações: μ_R e μ_T , e a da matriz de variância-covariância do vetor bivariado (Y_{i1k}, Y_{i2k}) , cuja estimativa pode ser obtida como

$$\hat{\Sigma} = \begin{pmatrix} \hat{\sigma}_e^2 + \hat{\sigma}_s^2 & \hat{\sigma}_s^2 \\ \hat{\sigma}_s^2 & \hat{\sigma}_e^2 + \hat{\sigma}_s^2 \end{pmatrix},$$

onde $\hat{\sigma}_e^2$ e $\hat{\sigma}_s^2$ são as estimativas das variabilidades intra e inter-indivíduos obtidas na tabela da Análise de Variância da medida farmacocinética com transformação logarítmica. Considerando-se as estimativas amostrais de μ_R , μ_T e Σ como valores populacionais para a medida em escala logarítmica, pode-se gerar $n_1 + n_2$ vetores bivariados normais $(Y_{i1k}, Y_{i2k})'$, segundo um experimento *crossover* 2 x 2, para a k -ésima seqüência, utilizando-se os seguintes passos:

- (i) usando-se a função *VNORMAL* do Módulo *IML* do *SAS*, gere n_1 vetores de normais bivariadas $(Y_{i11}, Y_{i21})'$, $i = 1, 2, \dots, n_1$, correspondentes às respostas observadas na Seqüência 1 (*RT*); sendo que a primeira componente deste vetor representa a resposta observada no Período 1 e a segunda, a resposta no Período 2. Estes vetores bivariados normais são gerados com o vetor bivariado das médias das formulações R e T ,

$$\mu_{RT} = \begin{pmatrix} \mu_R \\ \mu_T \end{pmatrix},$$

e com matriz de variância-covariância $\hat{\Sigma}$;

- (ii) Repetindo-se o passo (i) acima, porém trocando o vetor bivariado das médias das formulações por

$$\mu_{TR} = \begin{pmatrix} \mu_T \\ \mu_R \end{pmatrix},$$

gera-se n_2 vetores de normais bivariadas, (Y_{i12}, Y_{i22}) , $i = 1, 2, \dots, n_2$, referentes às respostas observadas na Sequência 2 (TR);

- (2) Dada a amostra gerada em escala logarítmica, calcule as médias amostrais das formulações T e R representadas, respectivamente, por $\bar{Y}_T$ e $\bar{Y}_R$; por exemplo, utilizando-se a regra $\pm 20\%$, tem-se que os limites de bioequivalência são $\hat{\theta}_{sup} = -\hat{\theta}_{inf} = 0,2231$. Adote um nível de significância para o teste, por exemplo, de $\alpha = 0,05$ para avaliar a bioequivalência da amostra gerada. O poder empírico dos testes paramétricos de Schuirmann e de Anderson-Hauck pode ser calculado através do procedimento abaixo:
 - (i) calcule a estimativa da variância da variabilidade intra-indivíduos σ_e^2 ;
 - (ii) obtenha os valores de T_{inf} e T_{sup} em (4.4.19) e avalie a bioequivalência da amostra aleatória gerada, utilizando-se os dois testes t de Schuirmann.
 - (iii) calcule os valores de T_3 , δ e o valor-p da Seção 4.3.2, e verifique se a amostra gerada é bioequivalente, segundo o teste de Anderson-Hauck;
- (3) repita os passos em (1) e (2) um número b de vezes; recomenda-se a realização de, no mínimo, 1.000 repetições;
- (4) o poder empírico de cada um dos testes é dado pela proporção de vezes em que se concluiu a bioequivalência das b amostras aleatórias geradas.

4.8.3 Exemplo Ilustrativo

Como motivação, considere os dados da medida ASC , do exemplo apresentado no Capítulo 3, para ilustrar o cálculo do poder empírico dos métodos paramétricos de Schuirmann e de Anderson-Hauck e do não-paramétrico, calculando-se o poder do teste de Schuirmann através do método da integração numérica da distribuição t bivariada. Um estudo de simulação paramétrica foi realizado para a medida farmacocinética ASC sem e com transformação logarítmica. Este estudo consistiu em gerar amostras da medida farmacocinética de um experimento *crossover* 2 x 2, seguindo os passos dos procedimentos apresentados anteriormente.

Baseando-se nos dados em escala original, foram obtidas as seguintes estimativas da ASC : $\bar{Y}_R = 19,57$, $\bar{Y}_T = 21,124$, $\hat{\sigma}_e^2 = 10,501$ e $\hat{\sigma}_s^2 = 32,187$. Por sua vez, tem-se que $\bar{Y}_R = 3,004$; $\bar{Y}_T = 2,93$ são as estimativas amostrais para as médias de R e T . Adotando-se um nível de significância de 5% e a regra de $\pm 20\%$, gerou-se um total de 3000 amostras de um experimento *crossover* 2 x 2 balanceado com tamanho $n = 14$ ($n_1 = 7$ para a Sequência 1(RT) e $n_2 = 7$ para a Sequência 2(TR)), considerando a medida em escalas original e logarítmica. As amostras sem transformação logarítmica foram geradas considerando-se o vetor bivariado de médias das formulações Referência R e Teste T igual a

$$\mu' = (19, 57; 21, 124)$$

e com matriz de variância-covariância

$$\Sigma = \begin{pmatrix} \sigma_e^2 + 32,187 & 32,187 \\ 32,187 & \sigma_e^2 + 32,187 \end{pmatrix}.$$

Com o intuito de estudar a importância da variabilidade intra-indivíduos σ_e^2 do experimento *crossover* nos poderes dos testes paramétricos e não-paramétrico, realizou-se algumas simulações paramétricas para alguns coeficientes de variação CV , onde $CV = \sigma_e/\mu_R$. Em cada uma das simulações, foi utilizado um dos seguintes valores de σ_e^2 : 0,957; 3,830; 8,617; 10,501; 15,319; 23,936 e 34,469 na matriz de variância-covariância, que correspondem aos seguintes valores de CV : 5%, 10%, 15%, 16,5%, 20%, 25% e 30%.

Para a medida ASC com transformação, foi realizado um estudo baseado em 3000 que foram geradas com vetor de média

$$\mu' = (3,004; 2,93)$$

e com matriz de variância-covariância

$$\Sigma = \begin{pmatrix} \sigma_e^2 + 0,08705 & 0,08705 \\ 0,08705 & \sigma_e^2 + 0,08705 \end{pmatrix}.$$

Como o coeficiente de variação $CV = \sqrt{\exp(\sigma_e^2) - 1}$, para os dados na escala logarítmica, foi realizado um estudo de simulação com os seguintes valores de CV : 5%, 10%, 14,47%, 15%, 20%, 25,4% e 30%, que correspondem, respectivamente, às variabilidades intra-indivíduos σ_e^2 : 0,00249, 0,00995, 0,0020769, 0,02225, 0,03922, 0,06062 e 0,08617.

Através do método de integração numérica em (4.8.27), o poder do teste de Schuirmann também foi calculado para a medida farmacocinética sem e com transformação, considerando-se os mesmos CV empregados na simulação das amostras do cálculo do poder empírico. A Tabela 4.8.11 apresenta o poder dos testes paramétricos de Schuirmann e de Anderson-Hauck e do teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney, considerando-se a medida farmacocinética ASC nas escalas original e logarítmica.

Baseados nos resultados apresentados na Tabela 4.8.11, observa-se que os poderes para os dois testes t unilaterais de Schuirmann obtidos utilizando-se o poder empírico e a integração numérica não apresentam muita diferença para valores de CV inferiores a 20%. No entanto, para CV superiores, o poder empírico apresenta um menor valor que o encontrado através da integração

Tabela 4.8.11: Poder dos Testes Paramétricos de Schuirmann e de Anderson-Hauck e do teste Não-Paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney para alguns valores de CV .

Escala	CV(%)	Integração Numérica	Poder Empírico	Poder Empírico	Poder Empírico
		Schuirmann	Schuirmann	Anderson-Hauck	Não-paramétrico
Original	5	0,999	0,993	0,993	0,999
	10	0,918	0,902	0,903	0,901
	15	0,671	0,657	0,664	0,701
	16,5*	0,599	0,575	0,582	0,554
	20	0,452	0,436	0,514	0,456
	25	0,262	0,2389	0,3066	0,248
	30	0,140	0,129	0,181	0,139
Logarítmica	5	0,812	0,767	0,778	-
	10	0,227	0,205	0,285	-
	15	0,068	0,038	0,071	-
	16,5*	0,061	0,032	0,069	-
	20	0,044	0,014	0,051	-
	25	0,030	0,010	0,046	-
	30	0,020	0,000	0,011	-

*Representa o coeficiente de variação CV amostral da medida farmacocinética ASC do exemplo do Cap. 3.

numérica. Pode-se observar também que a variabilidade intra-indivíduos do experimento *crossover* 2 x 2 é muito importante no cálculo do poder do teste, pois sob a pressuposição de normalidade o poder empírico do teste paramétrico apresenta uma diferença menor que 4% em relação ao poder do teste não-paramétrico.

4.9 Tamanho de Amostra de um Experimento *Crossover*

O tamanho de amostra adequado para obter um poder desejado (por exemplo, igual ou superior a 80% no teste da bioequivalência de duas formulações) depende do planejamento de experimento *crossover* utilizado, das médias das formulações e da estimativa do coeficiente de variação CV , que podem ser obtidas através de literatura da formulação referência ou de um estudo piloto.

Chow e Liu(2000) apresentam uma fórmula para calcular um tamanho aproximado de uma amostra para um experimento *crossover*, utilizando-se os dois testes t unilaterais de Schuirmann. A seguir, serão apresentadas as fórmulas utilizadas para o cálculo do tamanho de amostra, considerando-se a medida farmacocinética em escala original e logarítmica.

A - Medida Farmacocinética na Escala Original

Como o poder para o teste de Schuirmann é simétrico em relação a zero, considera-se apenas o caso em que $\theta = \mu_T - \mu_R \geq 0$. Considere que o número de voluntários na i -ésima sequência n_i seja igual a n , para um planejamento de experimento *crossover*. Portanto, considerando-se um nível de significância α , um poder igual a $1 - \beta$ e utilizando-se a regra $\pm 20\%$, a função poder do teste de Schuirmann para um experimento *crossover* J com $\theta_0 = 0$ pode ser escrita como:

$$\begin{aligned} \phi(0) &= P \left(\frac{-\Delta}{\hat{\sigma}_e \sqrt{\frac{b_J}{n}}} + t_{(\alpha, \nu_J)} < \frac{\hat{F}^*}{\hat{\sigma}_e \sqrt{\frac{b_J}{n}}} < \frac{\Delta}{\hat{\sigma}_e \sqrt{\frac{b_J}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} \right) \\ &= P \left(\frac{-\Delta}{CV \sqrt{\frac{b_J}{n}}} + t_{(\alpha, \nu_J)} < \frac{\hat{F}^*}{CV \sqrt{\frac{b_J}{n}}} < \frac{\Delta}{CV \sqrt{\frac{b_J}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} \right), \end{aligned} \quad (4.9.30)$$

onde $\hat{F}^*$ é o efeito da formulação do experimento *crossover* J ;

$$J = \begin{cases} 1, & \text{para experimento } crossover \text{ } 2 \times 2 \text{ com } \nu_1 = 2n - 2 \text{ e } b_1 = 1; \\ 2, & \text{para o } crossover \text{ } 4 \times 2 \text{ com } \nu_2 = 4n - 3 \text{ e } b_2 = 2; \\ 3, & \text{para o } crossover \text{ } 2 \times 3 \text{ com } \nu_3 = 4n - 4 \text{ e } b_3 = 3/4; \\ 4, & \text{para o } crossover \text{ } 2 \times 4 \text{ com } \nu_4 = 6n - 5 \text{ e } b_4 = 11/20; \\ 5, & \text{para o } crossover \text{ } 4 \times 4 \text{ com } \nu_5 = 12n - 5 \text{ e } b_5 = 1/4. \end{cases}$$

A distribuição t é simétrica em 0, logo os limites, inferior e superior, de (4.9.30) também são simétricos em 0. Então,

$$\frac{\Delta}{CV \sqrt{\frac{b_J}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} = - \left(\frac{-\Delta}{CV \sqrt{\frac{b_J}{n}}} + t_{(\alpha, \nu_J)} \right).$$

Para obter um poder de $\phi(0) \geq 1 - \beta$, tem-se que

$$\left| \frac{\Delta}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} \right| \geq t_{(\beta/2, \nu_J)},$$

que resulta em

$$n(0) \geq b_J [t_{(\alpha, \nu_J)} + t_{(\beta/2, \nu_J)}]^2 [CV/\Delta]^2, \quad \text{para } J = 1, 2, 3, 4, 5$$

Como o poder do teste de Schuirmann é simétrico em 0, sem perda de generalidade, considere o cálculo do tamanho amostral para o caso em que $\theta > 0$. Quando $0 < \theta = \theta_0 < \Delta = 0, 2\mu_R$, a função do poder dos dois testes de Schuirmann em θ_0 é

$$\phi(\theta_0) = P \left(\frac{-\Delta - \theta_0}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} + t_{(\alpha, \nu_J)} < \frac{\hat{F}^* - \theta_0}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} < \frac{\Delta - \theta_0}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} \right). \quad (4.9.31)$$

Quando $\theta_0 = 0$, os limites, inferior e superior, de (4.9.30) são simétricos em 0. Porém, quando $\theta > 0$, os limites, inferior e superior, em (4.9.31) não são simétricos em 0, pois

$$- \left[\frac{\Delta - \theta_0}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} \right] = \frac{-\Delta + \theta_0}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} + t_{(\alpha, \nu_J)} > \frac{-\Delta - \theta_0}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} + t_{(\alpha, \nu_J)}.$$

Portanto, se for escolhido

$$\frac{\Delta - \theta_0}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} = t_{(\beta/2, \nu_J)},$$

então o tamanho da amostra resultante pode ser maior que o de interesse. Um tamanho de amostra aproximado pode ser obtido por

$$\phi(\theta_0) \leq P \left(\frac{\hat{F}^* - \theta_0}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} < \frac{\Delta - \theta_0}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} \right).$$

Considerando-se $\phi(\theta_0) \geq 1 - \beta$, tem-se que

$$\frac{\Delta - \theta_0}{CV\sqrt{\frac{b_I}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} = t_{(\beta, \nu_J)}.$$

Após rearranjar os termos, obtem-se que um tamanho amostral aproximado pode ser calculado através de

$$n(\theta_0) \geq b_J[t_{(\alpha, \nu_J)} + t_{(\beta, \nu_J)}]^2 [CV/(\Delta - \theta_0)]^2, \quad \text{para } J = 1, 2, 3, 4, 5.$$

B - Medida Farmacocinética na Escala Logarítmica

Considerando-se o modelo multiplicativo para a medida farmacocinética, $\delta = \mu_T/\mu_R$ e os limites de bioequivalência $(0, 8; 1, 25)$, um tamanho amostral aproximado também pode ser encontrado através do teste de Schuirmann para as medidas farmacocinéticas com transformação logarítmica. Portanto, o tamanho de amostra necessário para um experimento *crossover* J com $\delta = 1$, para conseguir um poder de $1 - \beta$ ao nível de significância α , pode ser encontrado utilizando-se a seguinte função poder:

$$\begin{aligned} \phi(1) &= P \left(\frac{-\ln(1, 25) - \ln(1)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} + t_{(\alpha, \nu_J)} < \frac{\hat{F}^* - \ln(1)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} < \frac{\ln(1, 25) - \ln(1)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} \right) \\ &= P \left(\frac{-\ln(1, 25)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} + t_{(\alpha, \nu_J)} < \frac{\hat{F}^*}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} < \frac{\ln(1, 25)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} \right), \end{aligned} \quad (4.9.32)$$

onde $CV_{ln} = \sqrt{\exp(\sigma_e^2) - 1}$ e σ_e^2 é a variabilidade intra-indivíduos da tabela da Análise de Variância da medida farmacocinética com transformação logarítmica. Portanto, um tamanho amostral aproximado para um experimento *crossover* J com $\delta_0 = 1$ é

$$n(1) \geq b_J[t_{(\alpha, \nu_J)} + t_{(\beta/2, \nu_J)}]^2 [CV_{ln}/\ln(1, 25)]^2, \quad \text{para } J = 1, 2, 3, 4, 5.$$

Para $0, 8 < \delta_0 < 1$, tem-se que a função do poder do teste de Schuirmann é igual a

$$\phi(\delta_0) = P \left(\frac{-\ln(0, 8) - \ln(\delta_0)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} + t_{(\alpha, \nu_J)} < \frac{\hat{F}^* - \ln(\delta_0)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} < \frac{\ln(0, 8) - \ln(\delta_0)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} \right),$$

então, para obter um poder desejado $\phi(\delta_0) \geq 1 - \beta$, o tamanho amostral é encontrado através de

$$n(\delta_0) \geq b_J[t_{(\alpha, \nu_J)} + t_{(\beta, \nu_J)}]^2 \left[\frac{CV_{ln}}{\ln(0, 8) - \ln(\delta_0)} \right]^2, \quad \text{para } J = 1, 2, 3, 4, 5.$$

Agora considere o último caso em que $1 < \delta_0 < 1, 25$, então a função dos dois testes unilaterais de Schuirmann é expressa como

$$\phi(\delta_0) = P \left(\frac{-\ln(1, 25) - \ln(\delta_0)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} + t_{(\alpha, \nu_J)} < \frac{\hat{F}^* - \ln(\delta_0)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} < \frac{\ln(1, 25) - \ln(\delta_0)}{CV_{ln} \sqrt{\frac{b_I}{n}}} - t_{(\alpha, \nu_J)} \right).$$

Logo, o cálculo do tamanho amostral para este caso é dado por

$$n(\delta_0) \geq b_J [t_{(\alpha, \nu_J)} + t_{(\beta, \nu_J)}]^2 \left[\frac{CV_{ln}}{\ln(1, 25) - \ln(\delta_0)} \right]^2, \quad \text{para } J = 1, 2, 3, 4, 5.$$

Chow e Liu (2000) apresentam tamanho de amostras tabelados para experimentos *crossover* para obter poder de 80% ou 90% e valores de *CV* de 10 a 40%, considerando-se as medidas com ou sem transformação logarítmica.

Por exemplo, suponha que se deseja calcular o tamanho de uma amostra para o experimento *crossover* 2 x 3, considerando-se um poder igual ou superior a 80%, um nível de significância de 5% e a regra $\pm 20\%$. Utilizando-se os dados da *ASC* do exemplo, obtem-se que $CV = 16,5\%$ e $\theta = 7,94\%$. Considere inicialmente que $n = 10$, logo

$$n(7, 94\%) \geq 3/4 [t_{(0,05;4(8)-4)} + t_{(0,2;4(8)-4)}]^2 [16,5/20 - 7,94]^2 = 9,1702.$$

Portanto, repetindo-se novamente para $n = 10$, tem-se

$$n(7, 94\%) \geq 3/4 [t_{(0,05;4(10)-4)} + t_{(0,2;4(10)-4)}]^2 [16,5/20 - 7,94]^2 = 9,056.$$

Como o valor de $n = 10$ é o mesmo após repetir os cálculos, tem-se que são necessários 20 voluntários para a realização de um experimento *crossover* 2 x 3 para obter um poder de 80%, onde 10 voluntários são alocados aleatoriamente para cada seqüência: *TRR* e *RTT*. Convém ressaltar que deve ser considerado um número suficiente de voluntários prevendo possíveis desistências durante a realização do experimento.

Capítulo 5

Aplicação dos Métodos Estatísticos na Análise de Bioequivalência Média

5.1 Apresentação dos Dados e Análise da Medida C_{max}

Para ilustrar a aplicação dos métodos paramétricos e não-paramétricos para a análise de bioequivalência média entre as formulações R e T , considere os dados apresentados nas Tabelas 5.1.1 e 5.1.2. Estes conjuntos de dados correspondem às concentrações plasmáticas de 28 voluntários, que receberam duas formulações R e T de Furosemida, segundo um planejamento experimental *crossover* 2 x 2. Após a administração de cada uma das formulação aos voluntários segundo a sequência em que foram alocados (RT ou TR), as amostras sanguíneas de cada um dos voluntários foram coletadas em 16 tempos diferentes: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8 e 9 horas. As Tabelas 5.1.3 e 5.1.4 apresentam as análises descritivas das concentrações de R e T ao longo do tempo, para os 28 voluntários do experimento *crossover* 2 x 2. Uma visualização gráfica dos valores das médias das concentrações dos 28 voluntários para R e T , ao longo do tempo em horas, é dada pela Figura 5.1.1.

Com os programas em *SAS* apresentados no Apêndice, calculou-se a estimativa da ASC empregando-se o método da regra trapezoidal e as estimativas de C_{max} e t_{max} , utilizando-se os dados das concentrações observadas. Os resultados encontrados para as principais medidas farmacocinéticas para as formulações R e T do experimento *crossover* 2 x 2 estão apresentados na Tabela 5.1.5. A Tabela 5.1.6 apresenta as estatísticas básicas das medidas farmacocinéticas: ASC , C_{max} , t_{max} , k_{el} e $t_{1/2}$ das formulações R e T . No entanto, como ilustração dos métodos paramétricos e não paramétricos, apenas será realizada a análise de bioequivalência média da medida farmacocinética C_{max} .

Tabela 5.1.1: Concentrações Plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (horas) correspondentes à formulação Referência R .

		Tempo (hs)														
Ind	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	2	2,5	3	4	5	6	7	8	9
1	0	295,3	109,4	689,0	717,9	564,3	502,7	736,7	1488,2	1198,7	557,9	354,7	179,3	95,1	54,1	36,0
2	0	468,6	1532,1	1499,1	1662,0	1133,1	693,0	443,3	310,9	201,3	123,3	66,7	37,9	28,6	20,0	58,5
3	0	39,8	142,0	194,8	208,3	274,4	349,0	1737,3	1386,1	903,3	412,4	339,9	115,0	93,3	72,6	17,3
4	0	41,5	149,5	196,7	205,8	193,4	178,0	160,6	93,7	88,7	586,8	158,0	84,1	39,0	26,6	21,8
5	0	18,4	103,6	350,9	407,3	391,2	356,6	281,7	144,4	224,5	1361,7	397,7	158,2	72,1	49,3	37,6
6	0	205,1	526,2	566,8	847,4	906,2	1350,5	585,8	310,4	252,2	105,9	61,9	37,4	31,6	38,6	25,9
7	0	21,0	21,2	273,1	335,4	230,9	347,1	1465,5	869,1	457,0	207,4	82,7	58,7	28,1	19,1	16,7
8	0	61,6	124,3	256,4	293,3	276,3	621,5	1509,0	896,0	529,6	282,8	145,7	77,2	57,1	30,8	45,7
9	0	504,2	442,6	381,2	356,4	559,0	1805,7	852,3	830,7	569,6	139,9	141,9	77,3	60,7	40,7	31,8
10	0	235,7	509,5	449,6	415,8	273,7	252,6	233,4	539,8	600,5	527,1	578,7	211,4	112,2	72,6	69,9
11	0	25,3	240,3	438,8	392,7	312,6	177,3	186,0	186,9	734,6	545,0	357,1	156,6	67,6	37,5	24,1
12	0	203,1	442,6	381,2	356,4	559,0	1805,7	1123,4	830,7	569,6	139,9	141,9	77,3	60,7	40,7	31,8
13	0	53,1	406,5	776,1	917,7	1198,1	1082,0	615,1	411,0	277,6	562,2	299,4	129,6	77,5	52,6	45,3
14	0	280,2	684,6	655,8	678,1	801,0	909,0	2628,1	1112,3	1058,0	363,9	182,1	72,6	44,5	31,4	21,9
15	0	,	27,0	77,7	129,3	231,6	423,9	522,2	553,6	460,7	761,6	390,3	191,4	70,2	50,3	43,3
16	0	20,7	566,0	606,3	561,8	470,2	411,5	212,9	108,4	68,9	40,2	32,6	20,9	23,1	20,4	21,6
17	0	15,1	129,3	256,5	348,2	356,0	696,1	337,5	384,7	307,8	193,4	143,6	102,3	51,6	32,2	26,7
18	0	15,5	23,7	35,8	64,6	190,5	286,8	,	335,6	204,3	98,5	60,1	45,4	29,0	29,8	23,9
19	0	,	22,6	341,5	1637,2	1676,2	1916,3	1907,6	1293,4	731,4	341,8	206,2	114,3	75,1	63,0	,
20	0	15,9	173,3	269,3	234,5	738,4	687,4	348,6	167,4	122,9	107,8	79,2	45,7	44,2	34,4	30,3
21	0	22,1	252,5	214,9	301,6	201,8	172,2	780,7	936,2	406,8	272,3	102,8	91,3	40,1	24,4	17,7
22	0	,	11,0	86,2	147,8	146,5	145,5	132,2	139,4	167,6	96,9	198,0	119,7	48,1	28,8	34,4
23	0	68,5	690,8	783,3	496,9	359,9	396,5	1220,9	375,3	288,9	118,6	65,7	44,2	31,3	22,2	18,4
24	0	512,3	429,7	291,0	109,3	192,1	121,9	102,2	66,3	42,8	28,6	20,7	23,2	24,8	13,7	,
25	0	450,4	681,7	617,1	500,2	411,1	388,9	233,0	180,7	132,6	124,0	69,6	61,8	44,7	40,8	26,7
26	0	14,4	114,5	432,4	1776,7	2145,3	759,4	732,0	664,1	503,5	231,5	211,1	112,7	88,4	56,1	30,3
27	0	14,7	48,5	314,3	421,2	577,0	1167,0	1034,8	514,8	382,6	188,7	79,4	58,8	41,8	28,4	,
28	0	23,9	186,8	340,4	321,9	289,0	264,0	384,8	510,7	308,3	131,9	69,4	35,9	23,9	18,3	20,8

Tabela 5.1.2: Concentrações Plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (horas) correspondentes à formulação Teste T .

		Tempo (hs)														
Ind	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	2	2,5	3	4	5	6	7	8	9
1	0	65,1	241,5	407,2	341,6	372,6	553,5	975,8	987,2	627,3	720,1	456,2	194,6	180,0	57,4	31,6
2	0	375,8	1029,5	967,9	876,2	655,8	850,0	684,0	413,2	260,1	119,6	64,0	46,7	33,4	24,1	22,0
3	0	133,3	1122,8	1159,5	1599,2	1581,2	1150,4	744,9	433,1	372,9	200,8	122,0	79,4	65,4	52,2	48,4
4	0	16,6	108,3	422,4	634,6	265,7	181,2	146,5	97,6	84,3	48,2	30,7	24,4	15,2	13,7	17,6
5	0	48,1	218,3	787,4	2595,4	3013,6	2508,3	1322,3	991,1	448,0	177,5	85,3	47,3	29,5	23,5	18,5
6	0	22,9	297,7	466,0	582,4	1546,6	1169,6	633,4	412,4	296,1	146,9	48,7	43,0	30,0	23,2	19,9
7	0	34,4	177,5	761,0	651,5	1122,5	1430,7	919,9	507,6	333,1	156,3	60,8	32,0	24,7	15,6	16,6
8	0	25,5	231,0	1614,6	1445,7	1028,4	679,0	477,7	346,3	288,7	214,4	138,2	89,8	54,9	39,9	35,6
9	0	504,2	458,0	745,8	615,3	465,5	359,3	852,3	434,9	264,8	138,9	105,8	59,0	51,0	41,5	29,5
10	0	15,3	43,2	106,3	363,0	553,1	428,4	360,5	197,7	476,0	797,8	440,3	153,6	115,1	46,4	49,6
11	0	51,8	172,7	310,0	351,2	285,9	303,1	424,2	371,6	480,8	405,5	569,0	329,8	135,5	65,0	38,7
12	0	172,0	351,7	327,9	360,5	365,8	432,6	1850,2	1472,1	642,4	236,8	118,1	55,9	37,3	29,9	22,4
13	0	73,0	242,1	379,2	510,7	366,4	312,7	211,4	254,0	927,0	514,4	238,9	127,7	74,6	58,8	34,7
14	0	174,7	597,3	1770,2	1580,8	1279,1	861,8	548,7	372,3	233,5	120,5	72,1	47,7	30,5	22,6	22,1
15	0	13,1	131,1	182,6	351,7	423,2	408,3	544,3	1098,3	465,3	218,6	111,5	66,7	49,3	29,9	45,8
16	0	31,6	59,1	189,1	638,6	1045,9	1666,3	568,2	950,8	401,3	195,1	134,9	57,3	41,7	26,8	28,0
17	0	17,3	135,7	236,3	230,6	246,7	279,2	442,2	455,2	361,3	228,4	134,5	89,7	49,5	37,9	28,7
18	0	175,8	769,4	756,5	567,8	466,3	347,2	251,8	158,1	109,5	79,6	55,6	39,1	28,6	30,7	19,9
19	0	25,1	270,0	1137,4	1030,3	774,1	748,6	651,6	494,7	309,4	227,3	151,0	93,3	72,6	65,1	62,7
20	0	,	25,5	93,3	236,3	239,9	166,8	120,5	362,2	1032,0	415,2	207,0	114,0	65,0	34,1	27,6
21	0	126,5	600,6	392,3	534,5	609,0	1481,6	636,0	369,1	238,7	106,6	57,5	40,4	18,3	28,3	23,9
22	0	,	95,9	272,0	479,3	755,6	641,4	456,7	275,7	323,4	337,7	175,3	57,5	32,8	32,0	26,9
23	0	23,0	267,2	305,1	197,7	337,8	146,8	243,8	774,9	386,8	125,3	112,4	158,2	35,1	19,8	12,3
24	0	12,6	44,7	101,4	131,1	126,6	130,2	109,2	341,5	443,0	414,5	154,3	75,8	48,6	32,6	21,0
25	0	136,6	789,5	1276,9	1116,1	699,2	499,8	186,7	197,1	142,7	94,7	66,2	55,8	46,6	42,0	30,2
26	0	13,6	162,5	276,7	246,9	443,9	1256,6	750,1	480,3	366,2	169,1	162,4	139,7	100,1	62,8	45,3
27	0	,	36,3	97,8	130,7	160,4	210,3	210,3	176,0	1735,8	903,1	311,1	205,0	114,4	58,2	32,7
28	0	17,0	183,9	502,9	595,8	612,5	469,4	304,6	241,5	205,2	91,7	56,1	39,6	24,9	20,0	23,3

Tabela 5.1.3: Estatísticas Sumárias das Concentrações Plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (hs) da Formulação Referência.

Tempo (hs)	Média	Mediana	Des.Pad.	Min.	Max.	CV(%)
0,00	0	0	0	0	0	*
0,25	145,05	41,54	175,17	14,41	512,27	120,76
0,50	313,98	180,02	327,59	10,96	1532,12	104,34
0,75	420,57	346,2	292,65	35,81	1499,08	69,58
1,00	530,21	374,55	459,88	64,64	1776,68	86,74
1,25	559,24	375,53	477,08	146,45	2145,29	85,31
1,50	652,42	417,68	526,4	121,92	1916,25	80,68
2,00	759,54	585,75	636,89	102,22	2628,1	83,85
2,50	558,6	460,85	413,35	66,29	1488,2	74,0
3,00	421,22	345,42	296,72	42,82	1198,74	70,44
4,00	309	200,43	285,17	28,64	1361,65	92,29
5,00	179,9	142,78	138,99	20,69	578,72	77,26
6,00	90,7	77,26	52,23	20,85	211,4	57,59
7,00	53,73	46,4	24,51	23,12	112,19	45,62
8,00	37,48	33,3	16,14	13,68	72,62	43,08
9,00	31,13	26,68	13,18	16,69	69,88	42,33

Tabela 5.1.4: Estatísticas Sumárias das Concentrações Plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (hs) da Formulação Teste.

Tempo (hs)	Média	Mediana	Des.Pad.	Min.	Max.	CV(%)
0,00	0	0	0	0	0	*
0,25	83,92	34,42	95,28	12,59	375,8	113,54
0,50	337,44	229,3	327,77	25,48	1122,83	97,13
0,75	535,88	399,74	419,95	93,3	1770,23	78,37
1,00	648,21	522,63	538,51	130,67	2595,36	83,08
1,25	699,82	509,71	602,07	126,57	3013,58	86,03
1,50	699,98	484,6	570,75	130,17	2508,33	81,54
2,00	526,78	449,46	391,77	109,15	1850,28	74,37
2,50	475,93	371,94	336,83	97,63	1472,06	70,77
3,00	450,88	369,56	337,28	84,32	1735,78	74,81
4,00	281,69	197,94	228,97	48,23	903,1	81,29
5,00	165,08	120,08	139,19	30,67	568,95	84,31
6,00	93,21	62,1	69,33	24,38	329,77	74,38
7,00	57,12	44,12	39,46	15,15	179,99	69,07
8,00	36,26	31,32	15,8	13,71	65,1	43,58
9,00	29,0	25,51	12,0	12,31	62,69	41,39

Tabela 5.1.5: Medidas Farmacocinéticas dos 28 Voluntários para as Formulações *R* e *T*.

Voluntário	Seqüência	Período	Formulação	ASC_t	ASC_∞	C_{max}	t_{max}	K_{el}	$t_{1/2}$
1	2	2	R	4053,0400	4119,9000	1488,2000	2,5000	0,5381	1,2880
2	1	1	R	2667,5500	3287,9000	1661,9600	1,0000	0,0943	7,3500
3	1	1	R	3626,8500	3656,1000	1737,3000	2,0000	0,5926	1,1700
4	1	1	R	1362,4400	1411,6000	586,7600	4,0000	0,4431	1,5640
5	2	2	R	2890,7400	2971,0000	1361,6500	4,0000	0,4689	1,4780
6	1	1	R	2194,7200	2481,6000	1350,4700	1,5000	0,0903	7,6790
7	2	2	R	2264,8500	2304,9000	1465,5400	2,0000	0,4161	1,6660
8	1	1	R	2702,1700	2910,6000	1509,0400	2,0000	0,2193	3,1610
9	2	2	R	2983,0900	3086,7000	1805,6500	1,5000	0,3066	2,2610
10	1	1	R	2939,6900	3125,7000	600,5000	3,0000	0,3756	1,8450
11	2	2	R	2332,0700	2371,0000	734,6300	3,0000	0,6199	1,1180
12	2	2	R	3043,3500	3146,9000	1805,6500	1,5000	0,3066	2,2610
13	1	1	R	3108,7900	3236,5000	1198,1000	1,2500	0,3543	1,9560
14	1	1	R	4484,9700	4540,6000	2628,1000	2,0000	0,3941	1,7590
15	1	1	R	2647,5200	2737,8000	761,5800	4,0000	0,4793	1,4460
16	2	2	R	1070,9800	11543,3400	606,3000	0,7500	0,2591	2,6750
17	1	1	R	1665,6400	1724,9000	696,1200	1,5000	0,4505	1,5390
18	1	1	R	941,4600	1068,0000	335,6300	2,5000	0,1892	3,6630
19	2	2	R	4558,7800	4717,1000	1916,2500	1,5000	0,3978	1,7420
20	2	2	R	1292,2200	1496,2000	738,3900	1,2500	0,1485	4,6670
21	1	1	R	2016,1400	2048,8000	936,2200	2,5000	0,5423	1,2780
22	2	2	R	923,8800	1004,8000	198,0000	5,0000	0,4252	1,6300
23	2	2	R	2054,3900	2116,2000	1220,8800	2,0000	0,2976	2,3300
24	2	2	R	649,9100	766,4000	512,2700	0,2500	0,1175	5,9010
25	1	1	R	1471,4800	1573,6000	681,6900	0,5000	0,2611	2,6540
26	1	1	R	3196,2700	3265,3000	2145,2900	1,2500	0,4394	1,5770
27	2	2	R	2226,1300	2309,0000	1167,0100	1,5000	0,3426	2,0230
28	1	1	R	1358,1700	1467,9000	510,6600	2,5000	0,1897	3,6550
1	2	1	T	3640,6700	3688,5000	987,1800	2,5000	0,6602	1,0500
2	1	2	T	2337,5200	2422,2000	1029,5100	0,5000	0,2593	2,6730
3	1	2	T	3243,0400	3525,8000	1599,1500	1,0000	0,1711	4,0500
4	1	2	T	756,0700	918,7000	634,6100	1,0000	0,1081	6,4130
5	2	1	T	4471,3500	4532,0000	3013,5800	1,2500	0,3045	2,2770
6	1	2	T	2214,2600	2292,0000	1546,5700	1,2500	0,2564	2,7040
7	2	1	T	2484,5500	2553,1000	1430,7400	1,5000	0,2425	2,8580
8	1	2	T	2524,3300	2639,3000	1614,5900	0,7500	0,3094	2,2400
9	2	1	T	2085,0900	2214,4000	852,3200	2,0000	0,2283	3,0360
10	1	2	T	2645,0100	2760,2000	797,8100	4,0000	0,4303	1,6110
11	2	1	T	2689,1800	2743,3000	568,9500	5,0000	0,7159	0,9680
12	2	1	T	3188,8300	3264,7000	1850,2000	2,0000	0,2956	2,3450
13	1	2	T	2469,7100	2553,4000	926,9600	3,0000	0,4147	1,6720
14	1	2	T	2613,7300	2698,4000	1770,2300	0,7500	0,2607	2,6590
15	1	2	T	2097,7200	2379,0000	1098,2700	2,5000	0,1629	4,2560
16	2	1	T	2646,2800	2754,3000	1666,3400	1,5000	0,2591	2,6750
17	1	2	T	1595,2900	1673,2000	455,2000	2,5000	0,3685	1,8810
18	1	2	T	1344,7400	1445,7000	769,3900	0,5000	0,1966	3,5250
19	2	1	T	2535,8500	3016,7000	1137,3900	0,7500	0,1304	5,3170
20	2	1	T	2078,9600	2135,1000	1032,0400	3,0000	0,4905	1,4130
21	1	2	T	2065,9100	2274,2000	1481,5900	1,5000	0,1146	6,0510
22	2	1	T	1910,7600	2027,4000	755,5600	1,2500	0,2305	3,0070
23	2	1	T	1594,2000	1609,2000	774,8600	2,5000	0,8232	0,8420
24	2	1	T	1446,7700	1496,2000	442,9500	3,0000	0,4250	1,6310
25	1	2	T	1811,2700	1965,7000	1276,9300	0,7500	0,1953	3,5490
26	1	2	T	2303,5500	2421,3000	1256,5700	1,5000	0,3845	1,8030
27	2	1	T	3292,7400	3345,6000	1735,7800	3,0000	0,6183	1,1210
28	1	2	T	1324,9500	1454,3000	612,5000	1,2500	0,1803	3,8440

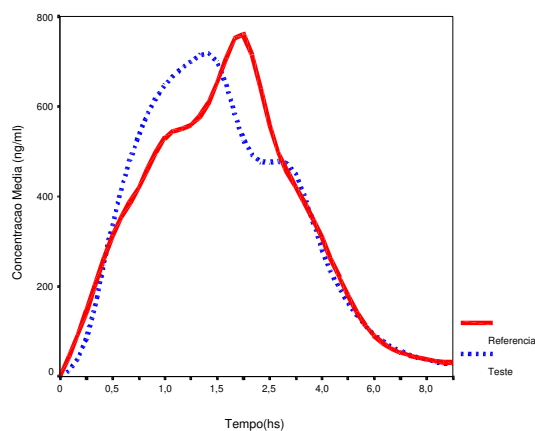


Figura 5.1.1: Curva de Concentração Plasmática Média das Formulações R e T dos 28 Voluntários.

Como análise preliminar, considere as médias da medida C_{max} apresentadas na Tabela 5.1.7 e a Figura 5.1.2 das médias amostrais das formulações T e R de sequência por período. A Figura 5.1.2 das médias amostrais das formulações por período sugere que a interação entre formulação e período pode ser significativa, o que indica que o efeito de *carry-over* pode ser significativo. No entanto, isto será verificado através de testes estatísticos apropriados como apresentados a seguir.

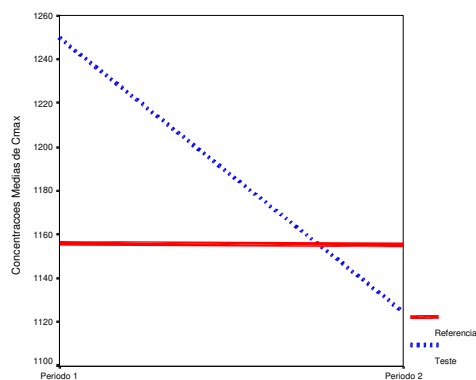


Figura 5.1.2: Médias Amostrais de C_{max} de R e T nos Períodos 1 e 2.

Tabela 5.1.6: Estatísticas Básicas das Medidas Farmacocinéticas das Formulações R e T.

Formulação	Medida	Média	Mediana	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo
Referência	$ASCt$	2383,12	2298,46	1057,10	649,90	4558,78
	ASC_{∞}	3018,88	2609,69	2669,72	766,38	15582,98
	C_{max}	1155,71	1182,59	606,37	198,00	2628,10
	t_{max}	2,08	2,00	1,14	0,25	5,00
	k_{el}	0,3395	0,3649	0,1616	0,001	0,61
	$t_{1/2}$	19,14	1,90	87,44	1,12	465,20
Teste	$ASCt$	2336,15	2320,54	778,36	756,07	4471,35
	ASC_{∞}	2457,29	2421,77	779,38	918,72	4532,02
	C_{max}	1182,78	1065,16	536,27	442,95	3013,58
	t_{max}	1,86	1,50	1,11	0,50	5,00
	k_{el}	0,3298	0,2599	0,1864	0,1081	0,8231
	$t_{1/2}$	2,77	2,66	1,46	0,84	6,41

Tabela 5.1.7: Médias Amostrais da C_{max} para as Formulações Teste e Referência nas Sequências 1 e 2 e nos Períodos 1 e 2.

Sequência	Período 1	Período 2	Média da Sequência
1(RT)	$\bar{Y}_{11} = 1155,96$	$\bar{Y}_{21} = 1124,66$	$\bar{Y}_{.1} = 1140,31$
2(TR)	$\bar{Y}_{12} = 1249,84$	$\bar{Y}_{22} = 1155,42$	$\bar{Y}_{.2} = 1202,63$
Média do Período	$\bar{Y}_{.1} = 1199,54$	$\bar{Y}_{.2} = 1138,93$	$\bar{Y}_{...} = 1169,24$

As Tabelas 5.1.8 e 5.1.9 apresentam a análise de variância da medida farmacocinética C_{max} , em escala original e logarítmica, do experimento *crossover* 2 x 2. A análise não-paramétrica dos efeitos fixos do modelo *crossover* 2 x 2 é apresentada na Tabela 5.1.10.

Tabela 5.1.8: Análise de Variância para C_{max} em Escala Original.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	valor p
Inter-indivíduos					
<i>Carry-over</i>	1	54090,87	54090,87	0,11	0,748
Resíduos	26	133386005,29	514846,36	2,8	0,005
Intra-indivíduos					
Formulação	1	13872,49	13872,49	0,08	0,786
Período	1	51425,77	51425,77	0,28	0,602
Resíduos	26	4787133,86	184120,53		
Total	55	18292528,28			

Tabela 5.1.9: Análise de Variância para C_{max} em Escala Logarítmica.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	valor p
Inter-indivíduos					
<i>Carry-over</i>	1	0,010244	0,010244	0,02	0,883
Resíduos	26	12,092557	0,4651	3,3	0,0017
Intra-indivíduos					
Formulação	1	0,089216	0,089216	0,63	0,433
Período	1	0,0042	0,0042	0,03	0,0865
Resíduos	26	3,66135	0,14082		
Total	55	15,8575			

Tabela 5.1.10: Análise Não-paramétrica dos Efeitos Fixos do modelo em (3.1.1).

Efeito	Soma dos Postos	Valor-p
<i>Carry-over</i>	193	0,854
Formulação	184	0,854
Período	191	0,927

Tabela 5.1.11: Médias de C_{max} das Formulações Teste T e Referência R .

Escala	Teste T	Referência R	$\hat{\sigma}_e$	CV(%)
Original	1181,02	1153,46	429,09	37,2
Logarítmica	6,975	6,895	0,3753	38,9

Baseando-se nos testes paramétricos e não-paramétricos dos efeitos fixos do modelo do experimento *crossover* 2 x 2, pode-se concluir que os efeitos de *carry-over*, de formulação e de período não são significativos ao nível de 5% de significância.

As médias de mínimos quadrados da C_{max} nas escalas original e logarítmica das formulações T e R estão apresentadas na Tabela 5.1.11.

A Tabela 5.1.12 apresenta os limites de bioequivalência média, que são utilizados para o estudo de bioequivalência da medida farmacocinética C_{max} , em escala original e logarítmica. A Tabela 5.1.13 apresenta os dois conjuntos de hipóteses, segundo a regra $\pm 20\%$.

Tabela 5.1.12: Intervalos de Confiança de 90% para $\mu_T - \mu_R$ e μ_T/μ_R de C_{max} das formulações R e T .

Escala	IC de 90(%)		Limites do IC	Probabilidade do IC $\subset LB^*$	Limites de Bioequivalência	Conclusão
Original	$\mu_T - \mu_R$	Clássico	(-164,5;227,7)	0,549	(-230,7;230,7)	BEM^{**}
		Westlake	(-202,9;202,9)	0,932	(-230,7;230,7)	BEM
		Não-paramétrico	(-170,23;209,7)	0,839	(-230,7;230,7)	BEM
	μ_T/μ_R	Clássico	(0,857;1,197)	0,549	(0,8;1,2)	BEM
		Locke	(0,9879;0,1037)	0,552	(0,8;1,2)	BEM
		Bootstrap	(0,857;1,165)	0,483	(0,8;1,2)	BEM
Logarítmica	$\mu_T - \mu_R$	Clássico	(-0,0915;0,2515)	0,871	(-0,2231;0,2231)	$NBEM^{***}$
		Westlake	(-0,214;0,214)	0,92	(-0,2231;0,2231)	BEM
	μ_T/μ_R	Clássico	(0,912;1,286)	0,841	(0,8;1,25)	NBEM
		Locke	(0,9905;1,021)	0,864	(0,8;1,25)	BEM

LB^* : Limite de Bioequivalência, BEM^{**} : Bioequivalência Média e $NBEM^{***}$: Não Bioequivalência Média

Tabela 5.1.13: Hipóteses de Bioequivalência para a Medida Farmacocinética nas Escalas Original e Logarítmica.

Escala	Hipóteses
Original	$H_{01} : \mu_T - \mu_R \leq -230,7$ versus $H_{11} : \mu_T - \mu_R > -230,7$
	e $H_{02} : \mu_T - \mu_R \geq 230,7$ versus $H_{12} : \mu_T - \mu_R < 230,7$
Logarítmica	$H_{01} : \mu_T - \mu_R \leq -0,2231$ versus $H_{11} : \mu_T - \mu_R > -0,2231$
	e $H_{02} : \mu_T - \mu_R \geq 0,2231$ versus $H_{12} : \mu_T - \mu_R < 0,2231$

Utilizando os dados de C_{max} da Tabela 5.1.5, calculou-se as estimativas de δ_{MV} , δ_{NVMV} e δ_{RM} e os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 5.1.14.

Tabela 5.1.14: Estimativas da Variância e do Vício dos Estimadores $\hat{\delta}_{NVMV}$, $\hat{\delta}_{MV}$ e $\hat{\delta}_{RM}$.

Estimador	Estimativa	Vício Estimado	Variância Estimada
δ_{NVMV}	1,0779	-	0,01151
δ_{MV}	1,0833	0,0055	0,01205
δ_{RM}	1,0239	-0,07925*	-

* Vício Assintótico do Estimador

Aplicando-se o teste de Schuirmann nos dados da C_{max} em escala original e logarítmica, pode-se obter os resultados, que estão apresentados na Tabela 5.1.15. Após testar as hipóteses intervalares utilizando-se o método paramétrico de Anderson-Hauck, obtem-se os resultados apresentados na Tabela 5.1.16. A Tabela 5.1.17 apresenta o teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney para os dados da C_{max} . Baseando-se nos resultados encontrados, pode-se concluir que as formulações T e R não são bioequivalentes para a medida C_{max} , segundo a regra $\pm 20\%$.

Tabela 5.1.15: Resultados do Teste de Schuirmann para a C_{max} .

Escala	T_{inf}	$Valor - p$	T_{sup}	$Valor - p$	Conclusão	Poder
Original	2,281	0,0154	-1,732	0,0427	BEM^*	0,398
Logarítmica	3,0147	0,0028	-1,422	0,0833	$NBEM^{**}$	0,477

BEM^* : Bioequivalência Média e $NBEM^{**}$: Não Bioequivalência Média.

Tabela 5.1.16: Resultados do Teste de Anderson-Hauck para a C_{max} .

Escala	T_3	$\hat{\delta}$	$valor - p$	Conclusão	Poder
Original	0,2745	2,006	0,032	BEM	0,541
Logarítmica	0,796	2,219	0,08	NBEM	0,477

Tabela 5.1.17: Resultados do Teste de Não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney para a C_{max} .

Medida	Soma dos postos	$valor - p$	Conclusão	Poder
b_{inf}	141	0,0304	NBEM	0,336
b_{sup}	228	0,0724		

6. Conclusão

A realização deste trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão de alguns métodos paramétricos e não-paramétricos, que são freqüentemente utilizados na análise de bioequivalência média de experimentos *crossover* para duas formulações R e T . Abordou-se os principais aspectos desde a escolha e a execução de um planejamento de experimento *crossover* até a estimação e a análise de bioequivalência média da medida farmacocinética. Como motivação dos métodos estatísticos abordados, alguns exemplos são utilizados para facilitar o entendimento da teoria no decorrer dos capítulos. Uma aplicação com dados reais também é apresentada no último capítulo para ilustrar a estimação das principais medidas farmacocinéticas e a análise de bioequivalência média da medida C_{max} .

Apêndice de Programas

```

/*****
Os programas apresentados a seguir foram utilizados para estimar a
ASCt dos exemplos do Capitulo 1
*****/

/*Entrada dos dados das concentracoes observadas ao longo do
tempo*/

data bioeq;
input t c; cards;
0.5  0
1    2.8
1.5  4.4
2    4.4
3    4.7
4    4.1
6    4
8    .
12   3
16   2.5
24   2
32   1.6
;

/** Este procedimento grafica o conjunto de dados bioeq***/
symbol1 i=j v=dot c=blue;
proc gplot data=bioeq;
  title 'Grafico dos Dados ';
  plot c*t;
run;

/* Calculo da ASC pelo Proc Expand utilizando o metodo
trapezoidal*/

proc expand data=bioeq out=saida method=join ;
  convert c=total/observed=(beginning,total) transformout=(sum);

```

```

id t;
run;

proc print data=saida; title ' Estimativas acumuladas da ASC(0-ti)
utilizando o Metodo Trapezoidal'; run;

proc sort data=saida;
by descending total;

/* o programa macro corrige o erro que ocorre no proc Expand*/
/*
Lendo a ultima observacao do conjunto de dados bioeq*/

data _nul_; set bioeq; call symput ('vv',c); run;

%macro areat;
%if &vv = 0 %then %do;
data a ; set saida ;
options obs=1 firstobs=1 ;
proc print;
var total;
title 'Estimativa da ASC atraves do Metodo da Regra Trapezoidal';
run ;
options obs=MAX firstobs=1 ;
run;
%end;

%else
%if &vv = . %then %do;
data a ; set saida ;
options obs=3 firstobs=3;
proc print;
var total;
title 'Estimativa da ASC atraves do Metodo da Regra Trapezoidal';
run ;
options obs=MAX firstobs=1 ;
run;
%end;

```

```

%else
%if &vv ne 0 %then %do;
  data a ; set saida ;
  options obs=2 firstobs=2;
  proc print;
  var total;
  title 'Estimativa da ASC atraves do Metodo da Regra Trapezoidal';
  run ;
  options obs=MAX firstobs=1 ;
  run;
%end;
%mend;
%areat;

/* Calculo da ASC pelo Proc Expand utilizando o metodo da
suavizacao por Splines cubicas*/

proc expand data=bioeq out=saida method=spline; convert
c=total/observed=(beginning,total) transformout=(sum);
  id t;
run;

proc print data=saida; title 'Estimativas acumuladas da ASC(ti)
utilizando o M\{e}todo das Splines Cubicas'; run;

proc sort data=saida;
  by descending total;

/* o programa macro corrige o erro que ocorre no proc Expand*/

%macro areasp;
%if &vv = 0 %then %do;
  data a ; set saida ;
  options obs=1 firstobs=1 ;
  proc print;
  var total;
  title 'Estimativa da ASC atraves do Metodo da Suavizacao por Splines Cubicas';
  run ;
  options obs=MAX firstobs=1 ;
  run;

```

```

%end;

%else
%if &vv = . %then %do;
  data a ; set saida ;
  options obs=3 firstobs=3;
  proc print;
  var total;
  title 'Estimativa da ASC atrav\'{e}s do Metodo da Suavizacao por Splines Cubicas';
  run ;
  options obs=MAX firstobs=1 ;
  run;
%end;

%else
%if &vv ne 0 %then %do;
  data a ; set saida ;
  options obs=2 firstobs=2;
  proc print;
  var total;
  title 'Estimativa da ASC atraves do Metodo da Suavizacao por Splines Cubicas';
  run ;
  options obs=MAX firstobs=1 ;
  run;
%end;
%mend;
%areasp;

/*Fazendo a interpolacao trapezoidal para os dados missing do
conjunto de dados*/

proc expand data=bioeq out=trap; id t; convert c/method=join; run;

proc print data=trap; title 'Interpolac{c}ao trapezoidal para o valor
faltante'; run;

/*como nao e possivel interpolar a ultima concentracao, ent{a}o e
necessario tira-la do conjunto de dados*/

data trap; set trap; if c=. then delete; run;

```

```

/*Se existirem algum valor faltante no conjunto de dados Bioeq, o
proc expand realiza a interpolacao por splines */

proc expand data=bioeq out=spline; id t; convert c/method=spline;
run;

proc print data=spline; title 'Interpola\c{c}ao por spline cubica para
o valor faltante'; run;

/*como nao e possivel interpolar a ultima concentracao, ent\~{a}o e
necessario tira-la do conjunto de dados*/

data spline; set spline; if c=. then delete; run;

/* Inicio do programa em IML*/

proc iml;

/* carregando a matriz X dos dados de bioequivalencia*/

/* matriz X e a matriz de dados das concentracoes e tempos*/

use bioeq; read all into X; nobs=nrow(X);

print ' Matriz X dos dados bioequivalencia e o numero de obs';
print X,nobs;

/* Inicio do programa para calcular a ASC atraves do metodo
trapezoidal*/

s_trap=0; do i=2 to nobs;
  if X[i,2]=. then X[i,]=X[i+1,];
  trapez=0.5*(X[i,1]-X[i-1,1])*(X[i,2]+X[i-1,2]);
  s_trap=s_trap+trapez;
  print ' Area do intervalo do ' i'-esimo tempo';
  print trapez;
end;

```

```

print 'Estimativa da ASC utilizando a regra trapezoidal no IML';
print s_trap;

/* Inicio do programa para calcular a ASC atraves do metodo da
suavizacao por splines cubicas*/

use spline; read all into X;

/* carregando os valores na matriz A do sistema de equacoes das k
equacoes das funcoes splines Ay=B */

A=j(nobs, nobs,0);

A[1,1]=1/(X[2,1]-X[1,1]);
A[1,2]=(-1)*(1/(X[2,1]-X[1,1])+1/(X[3,1]-X[2,1]));
A[1,3]=1/(X[3,1]-X[2,1]);

A[nobs,nobs]=1/(X[nobs,1]-X[nobs-1,1]);
A[nobs,nobs-1]=(-1)*(1/(X[nobs-1,1]-X[nobs-2,1])+1/(X[nobs,1]-X[nobs-1,1]));
A[nobs,nobs-2]=1/(X[nobs-1,1]-X[nobs-2,1]);

do i=3 to nobs;
  A[i-1,i-2]=(X[i-1,1]-X[i-2,1])/6;
  A[i-1,i-1]=(X[i,1]-X[i-1,1]+X[i-1,1]-X[i-2,1])/3;
  A[i-1,i]=(X[i,1]-X[i-1,1])/6;
end;

/*print A;*/

B=j(nobs,1,0);

do i=3 to nobs; B[i-1]= ((X[i,2]-X[i-1,2])/(X[i,1]-X[i-1,1])) -
((X[i-1,2]-X[i-2,2])/(X[i-1,1]-X[i-2,1])); end;

/*print B;*/

A1=inv(A);

y=j(nobs,1,0);

```

```

/* resolvendo as k equacoes para os valores de yi, i=1, 2, ..., k
para o calculo das funcoes splines* /

y=A1*B;

s_spl=0; do i=2 to nobs;
s1=(1/(X[i,1]-X[i-1,1]))*(X[i,2]-X[i-1,2])-((X[i,1]-X[i-1,1])/6)*(y[i]-y[i-1]);

s2=(1/(X[i,1]-X[i-1,1]))*(X[i,1]*X[i-1,2]-X[i,2]*X[i-1,1])-((X[i,1]-X[i-1,1])/6)*
(X[i,1]*y[i-1]-y[i]*X[i-1,1]);

spline=(1/24)*(X[i,1]-X[i-1,1])*(X[i,1]-X[i-1,1])*(X[i,1]-X[i-1,1])*(y[i]+y[i-1])+
(X[i,1]-X[i-1,1])*(0.5*s1*(X[i,1]+X[i-1,1])+s2);

s_spl=s_spl+spline; print ' area do intervalo do ' i'-esimo
tempo'; print spline; end;

print ' Estimativa da ASC utilizando o metodo da suavizacao por
Splines cubicas'; print s_spl;

quit;/* Fechando o Proc IML*/

```

```
/******  
Programas utilizados na estimacao das medidas farmacocineticas e  
analise de bioequivalencia media do Capitulo 5  
******/
```

```
/* Entrada dos dados de bioequivalencia no programa SAS individuo  
(ind) indica a identificacao do individuo; sequencia (seq) = 1(RT)  
e 2(TR); periodo (per) = 1 e 2; trat (formulacao) = 1 para  
Referencia (R) e 2 para Teste (T); asc e a medida farmacocinetica  
analizada em escala original */
```

```
data plan;  
input ind seq;  
cards;  
1 2  
2 1  
3 1  
4 1  
5 2  
6 1  
7 2  
8 1  
9 2  
10 1  
11 2  
12 2  
13 1  
14 1  
15 1  
16 2  
17 1  
18 1  
19 2  
20 2  
21 1  
22 2  
23 2  
24 2
```

```

25 1
26 1
27 2
28 1 ;

```

```

proc print data=plan;
run;

```

```

/*dados da concentracao ao longo do tempo da formulacao
referencia*/

```

```

data refer;
input t c1 c2 c3 c4 c5 c6 c7 c8 c9 c10 c11 c12 c13 c14
c15 c16 c17 c18 c19 c20 c21 c22 c23 c24 c25 c26 c27 c28;
cards;
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.25 295.25 468.62 39.76 41.54 18.44 205.10 20.99
61.61 504.24 235.72 25.25 203.11 53.12 280.24 . 20.67 15.14 15.46
. 15.90 22.06 . 68.46 512.27 450.40 14.41 14.67 23.85 0.50 109.41
1532.12 142.00 149.52 103.61 526.16 21.19 124.33 442.56 509.54
240.27 442.56 406.50 684.55 27.04 566.03 129.26 23.65 22.56 173.30
252.48 10.96 690.77 429.68 681.69 114.49 48.47 186.75 0.75 689.02
1499.08 194.82 196.65 350.86 566.80 273.10 256.44 381.17 449.61
438.77 381.17 776.09 655.81 77.66 606.30 256.45 35.81 341.54
269.28 214.88 86.17 783.27 291.01 617.05 432.37 314.33 340.42 1.00
717.88 1661.96 208.31 205.79 407.34 847.43 335.44 293.34 356.42
415.80 392.68 356.42 917.69 678.10 129.32 561.82 348.23 64.64
1637.22 234.54 301.64 147.83 496.90 109.25 500.21 1776.68 421.16
321.87 1.25 564.26 1133.11 274.42 193.36 391.20 906.20 230.87
276.33 559.01 273.69 312.57 559.01 1198.10 801.03 231.55 470.22
356.00 190.52 1676.15 738.39 201.83 146.45 359.87 192.13 411.13
2145.29 576.96 288.98 1.50 502.73 692.98 349.03 178.04 356.59
1350.47 347.05 621.51 1805.65 252.56 177.31 1805.65 1081.98 908.95
423.87 411.49 696.12 286.79 1916.25 687.40 172.21 145.46 396.48
121.92 388.86 759.40 1167.01 263.95 2.00 736.70 443.31 1737.30
160.60 281.70 585.75 1465.54 1509.04 852.32 233.37 185.99 1123.39
615.12 2628.10 522.18 212.92 337.46 . 1907.60 348.57 780.74 132.19
1220.88 102.22 233.01 731.99 1034.77 384.81 2.50 1488.20 310.92
1386.13 93.71 144.36 310.37 869.06 895.99 830.72 539.75 186.85

```

```

830.72 411.04 1112.34 553.63 108.39 384.65 335.63 1293.43 167.37
936.22 139.42 375.27 66.29 180.66 664.14 514.79 510.66 3.00
1198.73 201.28 903.33 88.66 224.51 252.18 457.03 529.58 569.58
600.50 734.63 569.58 277.64 1058.03 460.68 68.90 307.75 204.29
731.44 122.87 406.82 167.64 288.88 42.82 132.55 503.54 382.58
308.26 4.00 557.94 123.34 412.42 586.76 1361.65 105.85 207.42
282.76 139.88 527.12 545.00 139.88 562.17 363.88 761.58 40.23
193.43 98.54 341.79 107.80 272.33 96.86 118.56 28.64 124.03 231.53
188.72 131.92 5.00 354.65 66.70 339.92 158.02 397.70 61.86 82.65
145.74 141.94 578.72 357.07 141.94 299.39 182.08 390.25 32.64
143.62 60.12 206.24 79.15 102.79 198.00 65.72 20.69 69.62 211.10
79.38 69.39 6.00 179.28 37.92 114.98 84.08 158.17 37.39 58.65
77.20 77.26 211.40 156.55 77.26 129.55 72.58 191.43 20.85 102.32
45.36 114.25 45.73 91.33 119.65 44.23 23.23 61.76 112.67 58.78
35.86 7.00 95.08 28.64 93.31 38.95 72.13 31.57 28.12 57.10 60.72
112.19 67.59 60.72 77.52 44.51 70.19 23.12 51.58 29.02 75.14 44.22
40.10 48.09 31.26 24.83 44.72 88.42 41.82 23.89 8.00 54.12 20.03
72.62 26.60 49.28 38.56 19.06 30.75 40.74 72.58 37.53 40.74 52.61
31.43 50.29 20.43 32.17 29.75 62.97 34.42 24.35 28.77 22.19 13.68
40.83 56.09 28.38 18.32 9.00 35.99 58.50 17.34 21.80 37.63 25.89
16.68 45.69 31.76 69.88 24.12 31.76 45.25 21.91 43.29 21.62 26.68
23.94 . 30.30 17.69 34.41 18.39 . 26.66 30.31 . 20.82 ;

```

```
data teste;
```

```
input t c1 c2 c3 c4 c5 c6 c7 c8 c9 c10 c11 c12 c13 c14
c15 c16 c17 c18 c19 c20 c21 c22 c23 c24 c25 c26 c27 c28;
```

```
cards;
```

```

0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
0.00 0.00 0.00 0.25 65.13 375.80 133.27 16.59 48.07 22.91 34.42
25.47 504.24 15.33 51.77 172.04 72.97 174.70 13.07 31.58 17.28
175.84 25.14 . 126.45 . 22.97 12.59 136.56 13.57 . 16.98 0.50
241.53 1029.51 1122.83 108.31 218.33 297.65 177.51 231.04 458.01
43.24 172.73 351.70 242.06 597.30 131.12 59.09 135.67 769.39
270.02 25.48 600.57 95.93 267.18 44.66 789.51 162.53 36.31 183.93
0.75 407.18 967.89 1159.51 422.36 787.43 465.99 761.01 1614.59
745.84 106.29 310.02 327.93 379.23 1770.23 182.61 189.14 236.28
756.50 1137.39 93.30 392.31 271.97 305.09 101.43 1276.93 276.69
97.78 502.92 1.00 341.64 876.16 1599.15 634.61 2595.36 582.36
651.45 1445.67 615.28 363.03 351.16 360.50 510.73 1580.84 351.72

```

```

638.61 230.61 567.75 1030.33 236.32 534.53 479.27 197.73 131.12
1116.14 246.91 130.67 595.82 1.25 372.55 655.78 1581.23 265.72
3013.58 1546.57 1122.49 1028.42 465.48 553.10 285.91 365.82 366.39
1279.10 423.22 1045.90 246.71 466.31 774.06 239.90 609.00 755.56
337.84 126.57 699.22 443.90 160.42 612.50 1.50 553.52 850.01
1150.41 181.16 2508.33 1169.64 1430.74 678.95 359.33 428.38 303.12
432.63 312.66 861.76 408.33 1666.34 279.20 347.20 748.62 166.84
1481.59 641.39 146.82 130.17 499.80 1256.57 210.32 469.40 2.00
975.81 684.04 744.93 146.51 1322.33 633.35 919.93 477.69 852.32
360.54 424.18 1850.20 211.40 548.73 544.32 568.23 442.23 251.82
651.59 120.49 635.99 456.69 243.77 109.15 186.70 750.13 210.27
304.55 2.50 987.18 413.21 433.05 97.63 991.14 412.44 507.59 346.26
434.87 197.69 371.63 1472.06 254.04 372.25 1098.27 950.82 455.20
158.10 494.68 362.20 369.08 275.65 774.86 341.48 197.10 480.32
175.98 241.45 3.00 627.28 260.06 372.92 84.32 448.01 296.12 333.09
288.65 264.77 475.96 480.84 642.35 926.96 233.45 465.31 401.26
361.33 109.49 309.37 1032.04 238.73 323.44 386.78 442.95 142.71
366.20 1735.78 205.18 4.00 720.14 119.64 200.77 48.23 177.50
146.92 156.26 214.41 138.86 797.81 405.53 236.81 514.39 120.53
218.57 195.11 228.35 79.62 227.29 415.20 106.56 337.69 125.33
414.54 94.65 169.06 903.10 91.74 5.00 456.21 63.95 122.02 30.67
85.26 48.74 60.83 138.20 105.83 440.28 568.95 118.13 238.93 72.11
111.54 134.92 134.54 55.56 151.00 206.96 57.50 175.34 112.41
154.31 66.21 162.40 311.06 56.10 6.00 194.63 46.72 79.39 24.38
47.27 42.96 32.00 89.76 59.00 153.62 329.77 55.85 127.67 47.70
66.69 57.34 89.66 39.11 93.34 114.00 40.40 57.51 158.18 75.78
55.83 139.65 204.95 39.56 7.00 179.99 33.42 65.41 15.15 29.49
30.03 24.73 54.90 51.00 115.12 135.48 37.27 74.56 30.45 49.32
41.66 49.47 28.64 72.64 65.04 18.33 32.83 35.13 48.61 46.59 100.06
114.40 24.92 8.00 57.39 24.11 52.17 13.71 23.54 23.17 15.59 39.90
41.51 46.43 64.98 29.93 58.78 22.61 29.86 26.82 37.87 30.66 65.10
34.10 28.30 31.99 19.83 32.60 41.97 62.75 58.23 20.02 9.00 31.55
21.95 48.39 17.58 18.47 19.93 16.63 35.59 29.52 49.55 38.74 22.43
34.69 22.09 45.81 28.00 28.70 19.85 62.69 27.56 23.86 26.90 12.31
21.00 30.15 45.29 32.68 23.33

```

```
;
```

```

proc print data=refer;
run;

```

```

proc print data=teste;
run;

/* Inicio do programa em IML para estimar as medidas
farmacocineticas para as formulacoes R e T*/

proc iml;
reset log;
/* carregando a matriz X dos dados de
bioequivalencia*/

/* lendo o planejamento do experimento crossover*/

use plan; read all into Plan;

print plan;

/Carregando as matrizes R com os dados de concentracao da
Referencia*/

use refer;
read all into R;
nobs=nrow(R);
indiv=ncol(R);
print nobs indiv;

Rtransp=R'; print Rtransp;

print ' Matriz X dos dados bioequivalencia e o numero de obs';
print R,nobs;

BR=j(indiv-1,7,.);

do k=1 to indiv-1;
BR[k,1]=k;
end;

X=j(nobs,2,.);

```

```

/* Inicio do programa para calcular a ASC atrav\''{e}s do m\''{e}todo
trapezoidal para a formulacao referencia*/

do j=1 to indiv-1;
X[,1]=R[,1]; X[,2]=R[,j+1];
print X;

s_trap=0;
do i=2 to nob-1;
if X[i,2]=. then X[i,]=X[i+1,];
trapez=0.5*(X[i,1]-X[i-1,1])*(X[i,2]+X[i-1,2]);
s_trap=s_trap+trapez;
print trapez s_trap;
end;

if X[nob,2]=. then BR[j,2]=s_trap;
else do;
trapez=0.5*(X[i,1]-X[i-1,1])*(X[i,2]+X[i-1,2]);
s_trap=s_trap+trapez;
BR[j,2]=s_trap;
end;

/* calculo da estimativa de cmax e tmax*/

Cmax=X[1,2]; tmax=X[1,1];

do i=2 to nob-1;
if (Cmax<X[i,2]) then do; Cmax=X[i,2];
tmax=X[i,1];
end;
end;

BR[j,4]=Cmax; BR[j,5]=tmax;

Z=j(4,2,.);

/* inicio do programa para estimar o kel e tambem a ASCinf*/

if X[nob,2]=. then do k=nob-3 to nob-1;

```

```

do l=0 to 3;
  Z[l+1,1]=X[k-1,1];
  Z[l+1,2]=log(X[k-1,2]);
end;
end; else do k=nobs-4 to nobs;
  do l=0 to 3;
    Z[l+1,1]=X[k-1,1];
    Z[l+1,2]=log(X[k-1,2]);
  end;
end;

print Z;

Z1=j(4,2,1);
Y=j(4,1,.);

do k=1 to 4;
  Z1[k,2]=Z[5-k,1];
  Y[k,1]=Z[5-k,2];
end;

print Z1 Y;

M=Z1'*Z1; M2=Z1'*Y;
print M M2;

beta=inv(M)*M2;
print beta;
kel=abs(beta[2,1]);
tmed=log(2)/kel;
BR[j,6]=kel;
BR[j,7]=tmed;

if X[nobs,2]=. then ASCinf=s_trap+(X[nobs-1,2])/kel; else
ASCinf=s_trap+(X[nobs,2])/kel; BR[j,3]=ASCinf;

print kel tmed ASCinf s_trap; end;

print BR;

```

```

DR=j(indiv-1,10,.);

do i=1 to indiv-1;
  if Plan[i,2]=1 then do;
    DR[i,1]=i;
    DR[i,2]=Plan[i,2];
    DR[i,3]=1;
    DR[i,4]=1;
    DR[i,5]=BR[i,2];
    DR[i,6]=BR[i,3];
    DR[i,7]=BR[i,4];
    DR[i,8]=BR[i,5];
    DR[i,9]=BR[i,6];
    DR[i,10]=BR[i,7];
  end; else do;
    DR[i,1]=i;
    DR[i,2]=Plan[i,2];
    DR[i,3]=2;
    DR[i,4]=1;
    DR[i,5]=BR[i,2];
    DR[i,6]=BR[i,3];
    DR[i,7]=BR[i,4];
    DR[i,8]=BR[i,5];
    DR[i,9]=BR[i,6];
    DR[i,10]=BR[i,7];
  end;

end;

print DR;

med=median(DR);

print med;

/calculando as medidas farmacocineticas da formulacao Teste*/

use teste; read all into T; nobs=nrow(T); indiv=ncol(T); print
nobs indiv;

```

```

Ttransp=T'; print Ttransp;

print ' Matriz X dos dados bioequivalencia e o numero de obs';
print T,nobs;

BT=j(indiv-1,7,.);
do k=1 to indiv-1;
BT[k,1]=k;
end;

X=j(nobs,2,.);

do j=1 to indiv-1;
X[,1]=T[,1];
X[,2]=T[,j+1];
print X;

s_trap=0;
do i=2 to nobs-1;
if X[i,2]=. then X[i,]=X[i+1,];
trapez=0.5*(X[i,1]-X[i-1,1])*(X[i,2]+X[i-1,2]);
s_trap=s_trap+trapez;
print trapez s_trap;
end;
if X[nobs,2]=. then BT[j,2]=s_trap;
else do;
trapez=0.5*(X[i,1]-X[i-1,1])*(X[i,2]+X[i-1,2]);
s_trap=s_trap+trapez;
BT[j,2]=s_trap;
end;

Cmax=X[1,2];
tmax=X[1,1];
do i=2 to nobs-1;
if (Cmax<X[i,2]) then do;
Cmax=X[i,2]; tmax=X[i,1];
end;
end;

```

```

BT[j,4]=Cmax; BT[j,5]=tmax;

Z=j(4,2,.);

if X[nobs,2]=. then do k=nobs-3 to nobs-1;
  do l=0 to 3;
    Z[l+1,1]=X[k-1,1];
    Z[l+1,2]=log(X[k-1,2]);
  end;
end; else do k=nobs-4 to nobs;
  do l=0 to 3;
    Z[l+1,1]=X[k-1,1];
    Z[l+1,2]=log(X[k-1,2]);
  end;
end; print Z;

Z1=j(4,2,1); Y=j(4,1,.);

do k=1 to 4; Z1[k,2]=Z[5-k,1]; Y[k,1]=Z[5-k,2]; end;

print Z1 Y;
M=Z1'*Z1; M2=Z1'*Y;
print M M2;
beta=inv(M)*M2;
print beta;
kel=abs(beta[2,1]);
tmed=log(2)/kel;
BT[j,6]=kel;
BT[j,7]=tmed;

if X[nobs,2]=. then ASCinf=s_trap+(X[nobs-1,2])/kel; else
ASCinf=s_trap+(X[nobs,2])/kel; BT[j,3]=ASCinf;

print kel tmed ASCinf s_trap; end;

print BT;

DT=j(indiv-1,10,.);

do i=1 to indiv-1;

```

```

if Plan[i,2]=1 then do;
DT[i,1]=i;
DT[i,2]=Plan[i,2];
DT[i,3]=2;
DT[i,4]=2;
DT[i,5]=BT[i,2];
DT[i,6]=BT[i,3];
DT[i,7]=BT[i,4];
DT[i,8]=BT[i,5];
DT[i,9]=BT[i,6];
DT[i,10]=BT[i,7];
end; else do;
DT[i,1]=i;
DT[i,2]=Plan[i,2];
DT[i,3]=1;
DT[i,4]=2;
DT[i,5]=BT[i,2];
DT[i,6]=BT[i,3];
DT[i,7]=BT[i,4];
DT[i,8]=BT[i,5];
DT[i,9]=BT[i,6];
DT[i,10]=BT[i,7];
end;
end;

print DT;

med=median(DT);

print med;

Dados=DR//DT;

print dados;

create bioeq from dados[colname={indiv seq per trat asc ascinf
cmax tmax kel tmed}];

append from dados;

```

```

quit;/*saindo do PROC IML*/

proc print data=bioeq;
run;

/*calculando as estatisticas descritivas das formulacoes R e T*/

proc means data=bioeq;
by trat; var asc ascinf cmax tmax kel tmed;
run;

proc sort data=bioeq;
by per seq;
proc print data=bioeq;

proc means data=bioeq;
by per seq;
var asc cmax;
run;

/*calculando o logaritmo da medida farmacocinetica Cmax*/

data bioeq; set bioeq;
lnasc=log(asc);
proc sort data=bioeq; by
seq indiv trat;
title ' Analise de bioequivalencia de um
experimento crossover 2 x 2';

proc print data=bioeq;

proc means n data=bioeq;
by seq; var asc;
output out=no n=n;
run;

data no; set no;
n=n/2;
proc sort data=no;

```

```

by seq;

data bioeq; merge bioeq no;
by seq;

proc sort data=bioeq;
by seq indiv trat;
run;

proc print data=bioeq;

/*Analise de Variancia (ANOVA) do modelo do ensaio crossover 2 x
2, considerando o efeito de carry-over */

proc glm data=bioeq; class trat per seq indiv; model asc=seq indiv
(seq) per trat / ss1 ss2 ss3 ss4 solution p; test h= seq e= indiv
(seq) / htype=3 etype=3; means trat per seq; lsmeans trat per /
stderr pdiff; lsmeans seq/ stderr pdiff e=indiv(seq);

/* *Analise de Variancia (ANOVA) do modelo do ensaio crossover 2 x
2, n~{a}o considerando o efeito de carry-over. arquivos gerados:
tanova-cont\{e}m as somas de quadrados e os respectivos graus de
liberdade; lsmean1- cont\{e}m as m\{e}dias de m\{i}nimos quadrados das
formula\c{c}\~{o}es T e R e dos per\{i}odos 1 e 2; pred - cont\{e}m os res\{i}duos
intraindiv\{i}duos. */

proc glm data=bioeq outstat=tanova; class trat per indiv; model
asc= indiv per trat/ss1 ss2 ss3 ss4 solution p; output out=pred
p=aschat r=resid student=stresid; means trat per ; lsmeans trat
per / stderr pdiff out=lsmean1;

/*Gerando alguns datasets uteis que possuem as medias de minimos
quadrados das formula\c{c}\~{o}es T e R, QMintra, graus de liberdade e
numero de individuos nas seq 1 e 2 */

data error;
set tanova;
if _SOURCE_='ERROR';
mse=ss/df;
sse=ss;

```

```

id=1;
keep id mse sse df;

proc sort data=error;
by id;
run;

data no1; set no;
if seq=1; n1=15;
id=1; keep n1 id;

proc sort data=no1;
by id;

data no2; set no;
if seq=2; n2=13;
id=1; keep n2 id;

proc sort data=no2;
by id;

data lsmean11; set lsmean1;
if trat=1; masc1=lsmean; id=1;
keep id masc1;

proc sort data=lsmean11;
by id;
run;

data lsmean12; set lsmean1;
if trat=2; masc2=lsmean; id=1;
keep id masc2;

proc sort data=lsmean12;
by id;
run;

```

/* Este programa apresenta:

a) o intervalo de confianca de 90\% para a diferenca e a razao das

medias das formulacoes T e R (Linf1, Lsup2) e (Linf2, Lsup2),
respectivamente; b) o teste parametrico de Schuirmann atraves dos
valores de Tinf e Tsup e dos respectivos valores p do teste; */

```
data ic_sch_b; merge lsmean11 lsmean12 no1 no2 error; by id;
dp2=mse*(0.5)*((1/n1)+(1/n2));
dp=sqrt(dp2);
dif_med=masc2-masc1;
t=(masc2-masc1)/dp;
thetasup=0.2*masc1;
thetainf=-thetasup;
tinf=(masc2-masc1+(thetasup))/dp;
tsup=-((thetasup)-(masc2-masc1))/dp;
ct=tinv(0.05,df,0);
absct=abs(ct);
linf_d1=(masc2-masc1)-(absct*dp);
lsup_d1=(masc2-masc1)+(absct*dp);
linf_r2=((linf_d1/masc1)+1);
lsup_r2=((lsup_d1/masc1)+1);
valor_p1=1-probt(tinf,df);
valor_p2=probt(tsup,df);
```

```
proc print; title ' IC de 90\% para mT-mR e mT/mR; teste de
Schuirmann ';
var masc1 masc2 n1 n2 df dp dif_med thetainf
thetasup tinf valor_p1 tsup valor_p2 linf_d1 lsup_d1 linf_r2
lsup_r2;
run;
```

/* Este procedimento realiza o teste parametrico de Anderson-Hauck
e apresenta os valores da estatistica T3, do parametro de
nao-centralidade delta e do valor p do teste estatistico. */

```
data andhau; merge lsmean11 lsmean12 no1 no2 error; by id;
dp2=mse*(0.5)*((1/n1)+(1/n2));
dp=sqrt(dp2); dif_med=masc2-masc1;
bl1=(-0.2)*masc1; bu1=-bl1;
t3=(masc2-masc1-(0.5)*(bl1+bu1))/dp;
delta=(0.5)*(bu1-bl1)/dp;
sup=abs(t3)-delta;
```

```

inf=-abs(t3)-delta;
psup=probt(sup,df,0);
pinf=probt(inf,df,0);
valor_p=psup-pinf;
proc print;
title ' Teste de Anderson e Hauck';
var masc1 masc2 n1 n2 df dif_med dp t3 delta valor_p;
run;

/* Calculo os limites do IC de 90\% de Westlake para a diferenca
das medias T e R (Linf, Lsup) e tambem fornece os valores de k1 e
k2 */

data westlake; merge lsmean11 lsmean12 no1 no2 error; by id;
dp2=mse*(0.5)*((1/n1)+(1/n2));
dp=sqrt(dp2);
dif_d1=masc1-masc2;
dif_d2=dif_d1;
if dif_d2=0 then dif_d2=0.001*masc1;
sumk=2*dif_d2/dp;
inc=0.1; k1=2*sumk;
if sumk>0 then k1=-2*sumk;
again:
k2=sumk-k1;
prob1=probt(k1,df,0);
prob2=1-probt(k2,df,0);
prob=prob1+prob2;
if prob1>0.1 then k1=2*k1;
if prob1>0.1 then
goto again;
if prob2 >0.1 then k1=k1+sumk;
if prob2>0.1 then goto
again;
start:
k1=k1+inc;
k2=k2-inc;
prob1=probt(k1,df,0);
prob2=1-probt(k2,df,0);
prob=prob1+prob2;
if prob<0.1 then goto

```

```

start;
k1=k1-inc;
k2=k2+inc;
inc=inc/5;
if inc<0.0001 then goto
end;
goto start;
end:
dif_d=-dif_d1;
linf=dif_d+k1*dp;
lsup=dif_d+k2*dp;
proc print;
title ' IC de Westlake de 90\% para diferenca de medias T e R';
var masc1 masc2 n1 n2 df dif_d dp k1 k2 linf lsup;
run;

proc sort data=bioeq; by trat per; run;

/*Para a construçao do IC de Locke de 90\% e para teste
n\~{a}o-parametrico */

data bioeq1; set bioeq;
if per=1;
asc1=asc;
drop per asc;
run;

data bioeq2; set bioeq;
if per=2; asc2=asc;
drop per asc;
run;

proc sort data=bioeq1;
by seq indiv;
proc sort data=bioeq2;
by seq indiv;
run;

data work; merge bioeq1 bioeq2;
by seq indiv;

```

```

id=1;

proc sort data=work;
by id seq indiv;
run;

data work; merge work lsmean11;
by id;
if seq=2 then
w1=asc1;
if seq=1 then w1=asc2;
if seq=2 then w2=asc2;
if seq=1 then w2=asc1;
dik=0.5*(asc2-asc1);
if seq=1 then binf=dik+(0.2*masc1);
if seq=2 then binf=dik;
if seq=1 then bsup=dik-(0.2*masc1);
if seq=2 then bsup=dik;
uik=asc1+asc2;
if seq=1 then oik=dik;
if seq=2 then oik=-dik;
proc print;
title ' Medidas para o teste nao-parametrico da soma dos postos de
Wilcoxon-Mann-Whitney';
proc sort data=work;
by seq;
run;

proc print data=work;
by seq;
var indiv asc1 asc2 w1 w2;
run;

/* Teste n~{a}o param\ '{e}trico de Wilcoxon para o efeito de carry--over,
de formula\c{c}ao e de periodo do modelo crossover 2 x 2; e o teste
nao-param\ '{e}trico de bioequivalencia para as medidas binf e bsup*/

proc npar1way wilcoxon data=work;
class seq;
var uik dik oik binf bsup;

```

```

run;

/* As estimativas de SSR, SST e STR para encontrar os limites do
intervalo de Locke podem ser obtidas atrav\{e}s do proc corr*/

proc corr csscp noprint data=work outp=sscp;
by seq;
var w1 w2;
run;

data sscp21; set sscp;
if seq=1;
if _type_='CSSCP' and _name_='w1';
ss22=w1;
ss12=w2;
keep seq ss22 ss12;

proc sort data=sscp21;
by seq;
run;

data sscp22; set sscp;
if seq=1;
if _type_='CSSCP' and _name_='w2';
ss11=w2;
keep seq ss11;

proc sort data=sscp22;
by seq;

data sscp2; merge sscp21 sscp22;
by seq;
run;

data sscp11; set sscp;
if seq=2;
if _type_='CSSCP' and _name_='w1';
ss22=w1; ss12=w2;
keep seq ss22 ss12;
proc sort data=sscp11;

```

```

by seq;
run;

data sscp12; set sscp;
if seq=2;
if _type_='CSSCP' and _name_='w2';
ss11=w2;
keep seq ss11;
proc sort data=sscp12;
by seq;
run;

data sscp1; merge sscp11 sscp12;
by seq;

data sscpf; set sscp1 sscp2;
proc means noprint sum data=sscpf;
var ss11 ss22 ss12; output out=sscps sum=css11 css22 css12;

data sscps; set sscps; id=1;
proc sort data=sscps;
by id;
run;

/*Este procedimento fornece os limites do IC de Locke de 90\% para
a razao das medias T e R (Linf; Lsup) */

data locke; merge lsmean11 lsmean12 no1 no2 error sscps; by id;
dp2=mse*(0.5)*((1/n1)+(1/n2));
dp=sqrt(dp2); ms11=css11/df;
ms12=css12/df; ms22=css22/df;
razao=masc2/masc1;
absct=abs(tinv(0.05,df, 0));
w=((1/n1)+(1/n2))/4;
g2=(absct/(masc1/sqrt(w*mse)))*2;
g1=(absct**2)/((masc1**2)/(w*ms11)); sr1=ms22/ms11; sr2=ms12/ms11;
k=(razao**2)+sr1*(1-g1)+sr2*((g1*sr2)-(2*razao));
if g1 <1 and k ge 0 then finf=((razao-(g1*sr2)) -
(absct*sqrt(ms11*w)/masc1)*sqrt(k))/(1-g1); if g1 <1 and k ge 0
then fsup=((razao-(g1*sr2)) +(absct*sqrt(ms11*w)/masc1)*sqrt(k))/(1-g1);

```

```

k1=razao**2 + (1-g2);
linf=100*finf;
lsup=100*fsup;
proc print;
title ' IC de Locke de 90\% para a razao de medias T e R';
var masc1 masc2 n1 n2 df razao linf lsup;
run;

/* Calculos das estimativas para a medida farmacocinetica em
escala logaritmica*/

data bioeq; set bioeq; proc sort data=bioeq; by seq indiv trat;
title ' Analise da medida farmacocinetica em escala logaritmica';
proc print data=bioeq; run;

proc means n noprint data=bioeq; by seq; var lnasc;
output out=no n=n;
run;

data no; set no; n=n/2;
proc sort data=no;
by seq;

data bioeq; merge bioeq no;
by seq;

proc sort data=bioeq;
by seq indiv trat;
run;

/*Analise de Variancia (ANOVA) do modelo do ensaio crossover 2 x
2, considerando o efeito de carry-over */

proc glm data=bioeq;
class trat per seq indiv;
model lnasc=seq indiv (seq) per trat / ss1 ss2 ss3 ss4 solution p;
test h= seq e= indiv (seq) / htype=3 etype=3; means trat per seq;
lsmeans trat per / stderr pdiff; lsmeans seq/ stderr pdiff e=indiv(seq);

/* *Analise de Variancia (ANOVA) do modelo do ensaio crossover 2 x

```

```

2, n\~{a}o considerando o efeito de carry-over. arquivos gerados:
tanova-contem as somas de quadrados e os respectivos graus de
liberdade; lsmean1- contam as medias de minimos quadrados das
formulacoes T e R e dos periodos 1 e 2; pred - contam os residuos
intra-indivi\~{\i}duos.    */

proc glm data=bioeq outstat=tanova;
class trat per indiv;
model lnasc= indiv per trat/ss1 ss2 ss3 ss4 solution p;
output out=pred p=aschat r=resid student=stresid; means trat per ;
lsmeans trat per / stderr pdiff out=lsmean1;

/*Gerando alguns datasets uteis que possuem as medias de minimos
quadrados das formulacoes T e R, QMintra, graus de liberdade e
numero de individuos nas seq 1 e 2    */

data error; set tanova;
if _SOURCE_='ERROR';
mse=ss/df; sse=ss;
id=1;
keep id mse sse df;
proc sort data=error;
by id;
run;

data no1; set no;
if seq=1; n1=15;
id=1; keep n1 id;

proc sort data=no1;
by id;

data no2; set no;
if seq=2; n2=13; id=1;
keep n2 id;

proc sort data=no2;
by id;

data lsmean11; set lsmean1;

```

```

if trat=1; mlnasc1=lsmean;id=1;
keep id mlnasc1;

proc sort data=lsmean11;
by id;
run;

data lsmean12; set lsmean1;
if trat=2; mlnasc2=lsmean;
id=1; keep id mlnasc2;

proc sort data=lsmean12;
by id;
run;

/* Este programa apresenta:

a) o intervalo de confianca de 90\% para a diferenca e a razao das
medias das formulacoes T e R (Linf1, Lsup2) e (Linf2, Lsup2),
respectivamente; b) o teste parametrico de Schuirmann atraves dos
valores de Tinf e Tsup e dos respectivos valores p do teste;
*/

data ic_sch_b;
merge lsmean11 lsmean12 no1 no2 error; by id;
dp2=mse*(0.5)*((1/n1)+(1/n2));
dp=sqrt(dp2);
dif_med=mlnasc2-mlnasc1;
thetasup=0.2231;
thetainf=-thetasup;
tinf=(mlnasc2-mlnasc1+(thetasup))/dp;
tsup=-((thetasup)-(mlnasc2-mlnasc1))/dp;
ct=tinv(0.05,df,0);
absct=abs(ct); l
inf_d1=(mlnasc2-mlnasc1)-(absct*dp);
lsup_d1=(mlnasc2-mlnasc1)+(absct*dp);
linf_r2=exp(linf_d1);
lsup_r2=exp(lsup_d1);
valor_p1=1-probt(tinf,df);
valor_p2=probt(tsup,df);

```

```

proc print; title ' IC de 90\% para mT-mR e mT/mR; teste de
Schuirmann e probabilidade posteriori RoddaDavis';
var mlnasc1 mlnasc2 n1 n2 df dp dif_med thetainf thetasup tinf
valor_p1 tsup valor_p2 linf_d1 lsup_d1 linf_r2 lsup_r2;
run;

/* Este procedimento realiza o teste parametrico de Anderson-Hauck
e apresenta os valores da estatistica T3, do parametro de
nao-centralidade delta e do valor p do teste estatistico. */

data andhau; merge lsmean11 lsmean12 no1 no2 error; by id;
dp2=mse*(0.5)*((1/n1)+(1/n2));
dp=sqrt(dp2);
dif_med=mlnasc2-mlnasc1;
bl1=-0.2231;
bu1=-bl1;
t3=(mlnasc2-mlnasc1-(0.5)*(bl1+bu1))/dp;
delta=(0.5)*(bu1-bl1)/dp;
sup=abs(t3)-delta;
inf=-abs(t3)-delta;
psup=probt(sup,df,0);
pinf=probt(inf,df,0);
valor_p=psup-pinf;
proc print;
title ' Teste de Anderson e Hauck';
var mlnasc1 mlnasc2 n1 n2 df dif_med dp t3 delta valor_p;
run;

/* Calculo os limites do IC de 90\% de Westlake para a diferenca
das medias T e R (Linf, Lsup) e tambem fornece os valores de k1 e
k2 */

data westlake; merge lsmean11 lsmean12 no1 no2 error; by id;
dp2=mse*(0.5)*((1/n1)+(1/n2));
dp=sqrt(dp2);
dif_d1=mlnasc1-mlnasc2;
dif_d2=dif_d1;
if dif_d2=0 then dif_d2=0.001*mlnasc1;

```

```

sumk=2*dif_d2/dp; inc=0.1;
k1=2*sumk;
if sumk>0 then k1=-2*sumk;
again: k2=sumk-k1;
prob1=probt(k1,df,0);
prob2=1-probt(k2,df,0);
prob=prob1+prob2;
if prob1>0.1 then k1=2*k1;
if prob1>0.1 then goto again;
if prob2>0.1 then k1=k1+sumk;
if prob2>0.1 then goto again;
start:
k1=k1+inc;
k2=k2-inc;
prob1=probt(k1,df,0);
prob2=1-probt(k2,df,0);
prob=prob1+prob2;
if prob<0.1 then goto start;
k1=k1-inc; k2=k2+inc;
inc=inc/5;
if inc<0.0001 then goto end;
goto start;
end:
dif_d=-dif_d1;
linf=dif_d+k1*dp;
lsup=dif_d+k2*dp;
proc print;
title ' IC de Westlake de 90\% para diferenca de medias T e R';
var mlnasc1 mlnasc2 n1 n2 df dif_d dp k1 k2 linf lsup;
run;

proc sort data=bioeq; by trat per;
run;

/*Para a construcao do IC de Locke de 90\% e para teste
nao-parametrico*/

data bioeq1; set bioeq;
if per=1;
lnasc1=lnasc;

```

```

drop per lnasc;
run;

data bioeq2; set bioeq;
if per=2;
lnasc2=lnasc;
drop per lnasc;
run;

proc sort data=bioeq1;
by seq indiv;
proc sort data=bioeq2;
by seq
indiv;
run;

data work2; merge bioeq1 bioeq2;
by seq indiv; id=1;
proc sort data=work2;
by id seq indiv;
run;

data work2; merge work2 lsmean11;
by id; if seq=2 then w1=lnasc1;
if seq=1 then w1=lnasc2;
if seq=2 then w2=lnasc2;
if seq=1 then w2=lnasc1;
run;

/* As estimativas de SSR, SST e STR para encontrar os limites do
intervalo de Locke podem ser obtidas atraves do proc corr*/

proc corr csscp noprint data=work2 outp=sscp;
by seq; var w1 w2;
run;

data sscp21; set sscp;
if seq=1;
if _type_='CSSCP' and _name_='w1';

```

```

ss22=w1; ss12=w2;
keep seq ss22 ss12;

proc sort data=sscp21;
by seq; run;

data sscp22; set sscp;
if seq=1;

if _type_='CSSCP' and _name_='w2';
ss11=w2;
keep seq ss11;
proc sort data=sscp22;
by seq;

data sscp2; merge sscp21 sscp22;
by seq; run;

data sscp11; set sscp;
if seq=2;
if _type_='CSSCP' and _name_='w1';
ss22=w1; ss12=w2;
keep seq ss22 ss12;

proc sort data=sscp11;
by seq; run;

data sscp12; set sscp;
if seq=2;
if _type_='CSSCP' and _name_='w2';
ss11=w2;
keep seq ss11;

proc sort data=sscp12;
by seq; run;

data sscp1; merge sscp11 sscp12;
by seq; run;

data sscpf; set sscp1 sscp2; proc means noprint sum data=sscpf;

```

```

var ss11 ss22 ss12; output out=sscps sum=css11 css22 css12;

data sscps; set sscps; id=1;
proc sort data=sscps; by id;
run;

/*Este procedimento fornece os limites do IC de Locke de 90\% para
a razao das medias T e R (Linf; Lsup) */

data locke; merge lsmean11 lsmean12 no1 no2 error sscps; by id;
dp2=mse*(0.5)*((1/n1)+(1/n2));
dp=sqrt(dp2); ms11=css11/df;
ms12=css12/df; ms22=css22/df;
razao=mlnasc2/mlnasc1;
absct=abs(tinv(0.05,df, 0));
w=((1/n1)+(1/n2))/4;
g2=(absct/(mlnasc1/sqrt(w*mse)))*2;
g1=(absct**2)/((mlnasc1**2)/(w*ms11));
sr1=ms22/ms11;
sr2=ms12/ms11; k=(razao**2)+sr1*(1-g1)+sr2*((g1*sr2)-(2*razao));
if g1 <1 and k ge 0 then finf=((razao-(g1*sr2)) -
(absct*sqrt(ms11*w)/mlnasc1)*sqrt(k))/(1-g1);
if g1 <1 and k ge 0 then fsup=((razao-(g1*sr2))
+(absct*sqrt(ms11*w)/mlnasc1)*sqrt(k))/(1-g1);
k1=razao**2 + (1-g2);
linf=100*finf;
lsup=100*fsup; proc print;
title ' IC de Locke de 90\% para a razao de medias T e R';
var mlnasc1 mlnasc2 n1 n2 df razao linf lsup;
run;

```

Bibliografia

- [1] Anderson, S., Hauck, W. W. (1983). A new procedure for testing equivalence in comparative bioavailability and other clinical trials. *Communications in Statistics - Theory and Methods*, 12, 2663 - 2692.
- [2] Balaam, L. N. (1968). Two-period design with t^2 experimental units. *Biometrics*, 24, 61-73.
- [3] Chow, S. C.; Liu, J. P. (2000) *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*. New York: Marcel Dekker.
- [4] Crown, E., Shimizu, K. (1988) *Lognormal distribution. Theory and Applications*. Marcel Dekker.
- [5] Efron, B. (1982). *The Jackknife, Bootstrap and Other Resampling Plans*. SIAM, Philadelphia, PA.
- [6] Efron, B; Tibshirani, R. J. (1993) *An Introduction to the Bootstrap*. Chapman & Hall.
- [7] Fieller, E. (1954). Some problems in interval estimation. *J. Roy. Stat. Soc.*, B, 16, 175-185.
- [8] Fisher, R. A (1935) *The Design of Experiments*. Oliver and Boyd.
- [9] Grizzle, J. E. (1965) The two-period changeover design and its use in clinical trials. *Biometrics*, 21, 467-480.
- [10] Hills, M.; Armitage, P.(1979) The two-period crossover clinical trial. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 8, 7-20.
- [11] Hodges, J. L. ; Lehmann, E. L. (1963). *Estimates of location based on rank tests*. Ann. Math. Stat., 34, 598-611.
- [12] Hollander, M; Wolfe, D. A. (1973). *Nonparametrics Statistical Methods*. New York:John Wiley Sons.
- [13] Jones, B; Kenward, M. G. (1989) *Design and Analysis of Crossover Trials*. London: Chapman-Hall.

- [14] Kunz, R., Oxman, A. D. (1998) *British Medical Journal*, 317, 1185-90.
- [15] Liu, J. P. e Weng, C. S. (1992) Estimation of direct formulation effect under lognormal distribution in bioavailability/bioequivalence studies. *Statistics in Medicine*, 11, 881-96.
- [16] Locke, C. S (1984) An exact confidence interval for untransformed data for the ratio of two formulation means. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 12, 649-655.
- [17] Meinert, C. L.; Tonascia, S. (1986) *Clinical Trials: Design, Conduct and Analysis. Monographs in Epidemiology and Biostatistics*. Volume 8. New York: Oxford University Press.
- [18] Owen, D. B. (1965). A special case of a noncentral t distribution. *Biometrika*, 52, 437-446.
- [19] Patel H. I. (1983) Use of baseline measurements in the two-period cross-over design. *Communications in Statistics - Theory and Methods*, 12, 2693-2712.
- [20] Phillips, K. F. (1990). Power of the two one-sided tests procedure in bioequivalence. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 18, 137-144.
- [21] Resolução - RDC nº.896 de 29 de maio de 2003/ANVISA/Ministério da Saúde.
- [22] Resolução - RDC nº.898 de 29 de maio de 2003/ANVISA/Ministério da Saúde.
- [23] Schuirmann, D. J. (1981). On hypothesis testing to determine if the mean of a normal distribution is contained in a known interval. *Biometrics*, 37, 617 (abstract).
- [24] Schuirmann, D. J. (1987). A comparison of the two one-sided test procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability. *J. of Pharmacokin. Biopharm.*, 15, 657-680.
- [25] Westlake, W. J. (1973). The Design and Analysis of Comparative Blood-Level Trials, in *Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences, Dosage Form Design and Bioavailability*. Lea and Febiger, 149-79.
- [26] Westlake, W. J. (1974) The use of balanced incomplete block designs in comparative bioavailability trials. *Biometrics*, 30, 319-327.
- [27] Westlake, W. J. (1976). Symmetrical confidence intervals for bioequivalence trials. *Biometrics*, 32, 273-280.
- [28] Westlake, W. J. (1988). *Bioavailability and Bioequivalence of Pharmaceutical Formulations in Biopharmaceutical Statistics for Drug Development*. New York: Marcel Dekker.
- [29] Williams, E. J. (1949) Experimental designs balanced for the residual effects of treatment. *Australian Journal of Scientific Research*, 2, 149-168.

- [30] Yeh, K.C.; Kwan, K.C. (1978). A comparison of numerical integrating algorithms by trapezoidal, Lagrange, and spline approximations. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 6, 79-81.