

**Universidade Federal de Alfenas
Unifal-MG**

Suéllen Cristina Rennó Silva

**Determinação de sinvastatina em plasma humano por
cromatografia líquida de ultra performance acoplada a
espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) para aplicação em
estudos farmacocinéticos de bioequivalência**

**Alfenas/MG
2012**

Suéllen Cristina Rennó Silva

Determinação de sinvastatina em plasma humano por cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) para aplicação em estudos farmacocinéticos de bioequivalência

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Avaliação físico-química e microbiológica de fármacos e medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques.

**Alfenas/MG
2012**

Silva, Suéllen Cristina Rennó.

Determinação de sinvastatina em plasma humano por cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) para aplicação em estudos farmacocinéticos de bioequivalência / Suéllen Cristina Rennó Silva. - 2012.

106 f. -

Orientadora: Vanessa Bergamin Boralli Marques

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. Sinvastatina. 2. Cromatografia Líquida 3. Espectrometria de Massas em Tandem. 4. Plasma. 5. Farmacocinética. I. Marques, Vanessa Bergamin Boralli. II. Título.

CDD: 615.7

Suéllen Cristina Rennó Silva

Determinação de sinvastatina em plasma humano por cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) para aplicação em estudos farmacocinéticos de bioequivalência

A Banca Examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Avaliação físico-química e microbiológica de fármacos e medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG)

Profa. Dra. Natalia Valadares de Moraes Assinatura: _____

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCFAR-UNESP)

Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques, por ter me recebido como orientada, tornando possível a realização deste trabalho. Por ter me dado toda atenção, confiança e apoio nas *idas e vindas* deste projeto.

A todos do CEBIO, por disponibilizar as instalações do Laboratório de Bioequivalência – Etapa Analítica, por dar credibilidade e confiança em meu trabalho e por disponibilizar os dados do estudo à minha dissertação de mestrado;

Ao amigo Gustavo Rodrigues de Rezende por confiar em meu trabalho e por me dar a oportunidade e colaboração que permitiram a parceria com o CEBIO;

Aos amigos André Luis Morais Ruela e Túlio Felipe Pereira pela amizade, companheirismo e pelo apoio desde o início do mestrado até o final;

A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF, pela amizade, pela força, pelo carinho e pelo apoio a mais um trabalho científico;

À CAPES e a Unifal-MG pelo apoio financeiro e oportunidade;

À Deus e Nossa Senhora por todas as bênçãos;

À minha família que sempre me apoiou em minhas escolhas e caminhos, me dando força, coragem, carinho e alegrias;

À minha grande amiga Robes (Roberta Corrêa Ferreira), pela amizade, pelo carinho, pela força e pelo apoio imensurável em todas as etapas deste trabalho;

À minha grande amiga Brunna Nadur pelo apoio, carinho, conselhos e amizade todo este tempo;

Aos meus queridos amigos, Bruno Baeta, Ananda Sanson e Pollyana Rodrigues pelo apoio de sempre, pelo carinho, pelo companheirismo em OP e BH durante a realização desta pesquisa e pela amizade em todos estes anos;

Aos meus amigos do ICM P&D (Grupo CIMED), que me apoiaram e acreditaram em mim mesmo com todos os desvios que tivemos nesta trajetória;

A todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

RESUMO

A sinvastatina é um agente antilipêmico, da classe das estatinas, utilizado no tratamento de primeira escolha em pacientes com hipercolesterolemia primária. A apresentação referência da sinvastatina no Brasil é o medicamento Zocor[®] (Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda.). Os medicamentos genéricos e similares podem ser considerados “cópias” do medicamento de referência e para o registro de ambos medicamentos, há obrigatoriedade de apresentação dos estudos de biodisponibilidade relativa e equivalência farmacêutica. Por isso este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para aplicação em estudos de biodisponibilidade relativa do fármaco sinvastatina em voluntários sadios. Aplicou-se a técnica de extração líquido-líquido para purificação das amostras e para quantificação foi utilizada a cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). O método desenvolvido e validado apresentou uma faixa linear de 0,4 - 40,0 ng/mL, com seletividade, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade adequadas segundo a RE 899/2003 da ANVISA e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA. Após a validação o método foi aplicado para estudo de biodisponibilidade relativa de sinvastatina. Os resultados dos parâmetros farmacocinéticos foram obtidos através das curvas de concentração plasmática do fármaco em função do tempo, e analisados estatisticamente para determinação da bioequivalência. Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram determinados: ASC, C_{max} e t_{max} . O método desenvolvido apresentou preparo de amostras simples, baixo limite de quantificação e tempo de corrida curto, adequados a estudos com grande volume de amostras e baixos níveis plasmáticos. Portanto, o método desenvolvido e validado, bem como o estudo de bioequivalência foram adequados para avaliação das formulações de sinvastatina comprimido de 40 mg (teste e referência). O produto teste analisado não foi considerado bioequivalente ao produto referência.

Palavras-chaves: Sinvastatina. Cromatografia Líquida. Espectrometria de Massas em Tandem. Plasma. Farmacocinética.

ABSTRACT

Simvastatin (member of the statin class) is an antilipemic agent used in the primary treatment of primary hypercholesterolemia. The simvastatin reference drug in Brazil is Zocor[®] (Merck Sharp & Dohme Pharmaceutical Ltda.). The generic and similars drugs can be considered as “copies” of the reference drug. Relative bioavailability studies and pharmaceutical equivalence studies are needed before submitting the registration petition of these drugs. Thus, the aim of this work was the development and validation of a bioanalytical method for application in relative bioavailability studies in healthy volunteers. Liquid-liquid extraction was employed as a purification technique and the ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) as a quantitative technique. The method was developed and validated and presented a linear range of 0.4 – 40.0 ng/mL, and fulfilled all preset criteria for selectivity, recovery, precision, accuracy and stabilities according to ANVISA`s RE 899/2003 and FDA`s Bioanalytical Method Validation Guidance. After the validation, the method was applied to the relative bioavailability study of simvastatin. The pharmacokinetics parameters results was obtained through the blood concentration-time curves, and statistically analyzed for the determination of bioequivalence. The following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC, C_{max} , t_{max} . The developed method showed simple sample preparation, low lower limit of quantification and short running time, which was suitable for applying. Therefore, the proposed bioanalytical method and the bioequivalence study showed adequate for evaluating the simvastatin 40 mg tablet formulations (reference and test). The test drug analyzed was not considered bioequivalent to the reference drug.

Keywords: Simvastatin. Chromatography, Liquid. Tandem Mass Spectrometry. Plasma. Pharmacokinetics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Farmacocinética da sinvastatina - dose oral de 40 mg (NAJIB, 2003; FONSECA, 2005; NOVÁKOVÁ et al., 2009).	26
Tabela 2 -	Metodologias para quantificação de sinvastatina em amostras biológicas.	31
Tabela 3 -	Lista de aleatorização do estudo clínico.	36
Tabela 4 -	Descrição dos equipamentos e materiais utilizados.	41
Tabela 5 -	Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de sinvastatina em plasma humano por UPLC-MS/MS.	44
Tabela 6 -	Condições do espectrômetro de massas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de sinvastatina em plasma humano por UPLC-MS/MS.	45
Tabela 7 -	Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de sinvastatina em plasma por UPLC-MS/MS na faixa de concentração de 0,4 e 40,0 ng/mL.	62
Tabela 8 -	Somatório absoluto dos resíduos das curvas analíticas com ponderação $1/x$ e $1/x^2$	63
Tabela 9 -	Recuperação do procedimento de purificação das amostras de plasma para sinvastatina.	65
Tabela 10 -	Precisão e exatidão intra-corrída e inter-corrídas referentes ao método analítico para quantificação de sinvastatina em amostras de plasma por UPLC-MS/MS.	67
Tabela 11 -	Resultados referentes ao estudo de estabilidade do sinvastatina em amostras analisadas após manutenção a temperatura ambiente por 19 horas.	68

Tabela 12 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade do sinvastatina em amostras de plasma de controle de qualidade, analisadas logo após o preparo e mantidas a -20 °C por 90 dias.	69
Tabela 13 - Resultados referente a estudo de estabilidade do sinvastatina em amostras de plasma analisadas 73 horas após o procedimento de purificação.	69
Tabela 14 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade do sinvastatina em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas a temperatura de -20 °C e submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.	70
Tabela 15 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade da solução de sinvastatina por 60 dias mantidas a temperatura de 5 °C.	70
Tabela 16 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade da solução de lovastatina por 60 dias mantidas a temperatura de 5 °C.	70
Tabela 17 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade da solução de sinvastatina por 18 horas mantidas a temperatura ambiente.	71
Tabela 18 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade da solução de lovastatina por 18 horas mantidas a temperatura ambiente.	71
Tabela 19 - Concentrações plasmáticas médias da sinvastatina após a administração oral dos produtos teste e referência aos 41 voluntários sadios.	76
Tabela 20 - Parâmetros farmacocinéticos referentes à absorção oral do produto teste.	78
Tabela 21 - Parâmetros farmacocinéticos referentes à absorção oral do produto referência.	79

Tabela 22 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro C_{max} , transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos referência e teste a 41 voluntários sadios.....	81
Tabela 23 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro ASC_{0-t} , transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos referência e teste a 41 voluntários sadios.....	81
Tabela 24 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro $ASC_{0-\infty}$, transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos e teste a 41 voluntários sadios.....	82
Tabela 25 - Intervalos de confiança 90% (IC 90 %) para as relações entre os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ obtidos após administração dos produtos teste e referência a 41 voluntários sadios.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula estrutural da sinvastatina (ZHAO, 2002).	28
Figura 2 -	Fórmula estrutural da sinvastatina hidroxí-ácida (ZHAO, 2002).	28
Figura 3 -	Estudo do tipo aleatório e cruzado.	34
Figura 4 -	Espectro de massas dos íons precursores e íons produtos da sinvastatina.	59
Figura 5 -	Espectro de massas dos íons precursores e íons produtos da lovastatina.	59
Figura 6 -	Cromatogramas referentes a injeção de padrões de sinvastatina e lovastatina nas concentrações de 40,0 ng/mL e 0,15 µg/mL, respectivamente.	60
Figura 7 -	Cromatogramas referentes a injeção de amostra branco extraída.	60
Figura 8 -	Cromatogramas referentes a injeção de amostra extraída na concentração de 0,4 ng/mL.	60
Figura 9 -	Cromatogramas do teste de seletividade. (A) Amostra de <i>pool</i> de plasmas branco (B) Amostra de LIQ extraído.	61
Figura 10 -	Curva analítica Sinvastatina em plasma humano.....	62
Figura 11 -	Dispersão dos Resíduos para ponderação $1/x$ e $1/x^2$ respectivamente em (a) e (b).	63

- Figura 12 - Teste de Efeito Matriz pelo método de infusão pós-coluna. A aquisição em verde representa análise cromatográfica de amostra branco extraída com a infusão dos padrões concomitante e aquisição em vermelho representa uma análise cromatográfica de lovastatina e sinvastatina, respectivamente..... 66
- Figura 13 - Curvas médias de concentrações plasmáticas em função do tempo após a administração oral dos produtos teste e referência aos 41 voluntários sadios. (As barras verticais representam o erro padrão da média). 77

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Belo Horizonte, credenciado pelo CONEP – Conselho Nacional de Saúde/MS	91
ANEXO B	Termo de consentimento livre e esclarecido	92
ANEXO C	Autorização de Divulgação de Dados	98
ANEXO D	Concentrações plasmáticas individuais (ng/mL) ao longo dos tempos de coleta (horas) dos 41 voluntários.....	99
ANEXO E	Curvas individuais de concentrações plasmáticas em função do tempo, referente aos produtos teste e referência	101

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Nível de significância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ASC	Área sob a curva “concentração plasmática versus tempo”
CEBIO	Centro de pesquisa em biotecnologia Ltda.
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CONEP	Conselho nacional de saúde
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CQs	Controles de qualidade
C_{max}	Concentração plasmática máxima
CV	Coeficiente de variação
DP	desvio padrão
DPa	Desvio-padrão do intercepto com o eixo do Y da curva de calibração
DPR	Desvio-padrão relativo
F	Feminino
F	Valor da estatística do teste <i>F</i> da análise de variância
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLU	Fluorescência
g	Gramas
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
h	Horas
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	Enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC	Inclinação da curva de calibração
IC 90%	Intervalo de confiança 90%
IMC	Índice de massa corporal

Kg	Quilogramas
kV	Quilovolts
L	Litro
LC-FLU	Cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
LC-UV	Cromatografia líquida acoplada a detector de ultravioleta
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LLE	Extração líquido-líquido
LIQ	Limite de quantificação inferior
Log P	Coeficiente de partição octanol/água
M	Masculino
mmol	Milimol
mg	Miligramas
mm	Milímetros
µg	Microgramas
min	Minutos
mL	Mililitros
MTBE	Éter-metil-terc-butil
ng	Nanogramas
µg	Microgramas
µL	Microlitros
p	Probabilidade de significância, ou nível descritivo do teste, ou ainda valor-p.
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Padrão interno
pKa	Logaritmo da constante de dissociação ácida
PPT	Precipitação de proteínas
R	Medicamento referência
RDC	Resolução de diretoria colegiada
RE	Resolução específica
RNA	Regressão não ajustada

RP	Amostras recém-preparadas
SPE	Extração em fase sólida
t	Tempo
T	Medicamento teste
$t_{1/2}$	Meia-vida de eliminação
t_{max}	Tempo correspondente à concentração plasmática máxima
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
V	Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Medicamentos Genéricos e Similares	21
2.2	Bioequivalência/Biodisponibilidade relativa	22
2.3	Sinvastatina	24
2.3.1	PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	24
2.3.2	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	27
2.4	Metodologias Bioanalíticas	29
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivos Gerais	33
3.2	Objetivos Específicos	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Casuística	34
4.2	Materiais	39
4.2.1	AMOSTRAS	39
4.2.2	SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA	39
4.2.3	SOLVENTES E REAGENTES	39
4.2.4	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	40
4.3	Métodos	42
4.3.1	ETAPA ANALÍTICA	42
4.3.1.1	<i>Método Bioanalítico</i>	42
4.3.1.2	<i>Validação do método bioanalítico</i>	46
4.3.1.2.1	Seletividade	46
4.3.1.2.2	Linearidade	46
4.3.1.2.3	Determinação do Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	48
4.3.1.2.4	Limite Inferior de Detecção (LD)	48
4.3.1.2.5	Recuperação	49
4.3.1.2.6	Efeito Matriz	49
4.3.1.2.7	Precisão e Exatidão	50

4.3.1.2.8	Testes de Estabilidade	51
4.3.1.2.8.1	Estabilidade de Curta Duração	52
4.3.1.2.8.2	Estabilidade de Longa Duração	52
4.3.1.2.8.3	Estabilidade de Pós-Processamento	53
4.3.1.2.8.4	Estabilidade de Ciclos de Congelamento e Descongelo	53
4.3.1.2.8.5	Estabilidade de Soluções Padrão	54
4.3.1.3	<i>Quantificação de sinvastatina nas amostras de plasma</i>	55
4.3.2	ETAPA ESTATÍSTICA	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	Desenvolvimento e Validação do método bioanalítico para quantificação de sinvastatina em plasma humano	58
5.1.1	SELETIVIDADE	60
5.1.2	LINEARIDADE	61
5.1.3	LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO (LIQ)	64
5.1.4	LIMITE DE DETECÇÃO (LD)	64
5.1.5	RECUPERAÇÃO	65
5.1.6	EFEITO MATRIZ	65
5.1.7	PRECISÃO E EXATIDÃO	67
5.1.8	TESTES DE ESTABILIDADE	68
5.1.8.1	Estabilidade de Curta Duração	68
5.1.8.2	Estabilidade de Longa Duração	68
5.1.8.3	Estabilidade de Pós-Processamento	69
5.1.8.4	Estabilidade de Ciclos de Congelamento e Descongelo	69
5.1.8.5	Estabilidade de Soluções Padrão	70
5.2	Considerações finais sobre a metodologia desenvolvida	71
5.3	Etapa Clínica do estudo de Bioequivalência	74
5.4	Etapa Analítica do estudo de Bioequivalência	74
5.5	Etapa Estatística do estudo de Bioequivalência	77
5.5.1	PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	77
5.5.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	80
5.5.2.1	Poder do Teste e Intervalo de Confiança (IC 90%)	83
6	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO A	91

ANEXO B	92
ANEXO C	98
ANEXO D	99
ANEXO E	101

1 INTRODUÇÃO

A identificação e quantificação de fármacos em materiais biológicos têm aplicação em diversas áreas, como em estudos de farmacocinética, monitorização terapêutica, análises forenses e estudos de bioequivalência. Este tipo de análise compreende as etapas de extração do analito, separação de interferentes e detecção, por meio das quais se pode obter informações a respeito da quantidade e identidade do fármaco.

O desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e seletivos, desde o preparo da amostra até a identificação e quantificação das espécies de interesse, permite a obtenção de dados confiáveis para a quantificação de determinado fármaco em estudos farmacocinéticos. A técnica de LC-MS/MS vem sendo introduzida nos últimos anos com essa finalidade. A introdução deste tipo de equipamento implica em um aumento na sensibilidade e seletividade do método bioanalítico, além de permitir menor tempo de análise (YANG; FENG; LUAN, 2003).

A sinvastatina é um dos maiores representantes dos medicamentos inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, conhecidos como estatinas. É um fármaco administrado como um agente antilipêmico atuando no controle da síntese de colesterol *in vivo* reduzindo a hipercolesterolemia (APOSTOLOU et al., 2008).

A concentração plasmática da sinvastatina durante o tratamento por via oral é bastante baixa, e para que seja possível a monitorização deste fármaco nestes níveis terapêuticos é necessário o desenvolvimento de métodos bioanalíticos de baixa detectabilidade e alta seletividade (YANG; FENG; LUAN, 2003; APOSTOLOU et al., 2008; DING et al., 2011).

Utilizando cromatografia líquida acoplada a detectores convencionais como ultravioleta e fluorescência ou mesmo a cromatografia gasosa, dificilmente consegue-se níveis de quantificação tão baixos quanto necessário para a quantificação da sinvastatina utilizando um preparo de amostra simples; sendo necessário, portanto, uma derivatização prévia do analito e/ou um preparo de amostra mais complexo (YANG; FENG; LUAN, 2003). Sendo assim, desenvolveu-se metodologia bioanalítica moderna baseada em extração líquido-líquido e UPLC-

MS/MS para a análise desse fármaco em plasma, unindo as vantagens de ambas as técnicas para obtenção de um método ideal para estudos de bioequivalência: rapidez, praticidade e que se enquadre em limites de quantificação necessários ao estudo de sinvastatina.

O método foi devidamente validado segundo as normas da Resolução 899 de 2003 (BRASIL, 2003a) e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (UNITED STATES, 2001) e foi posteriormente aplicado para estudos farmacocinéticos de bioequivalência.

A bioequivalência pode ser avaliada pela comparação de parâmetros farmacocinéticos relacionados à biodisponibilidade, ou seja, à quantidade absorvida e à velocidade do processo de absorção. Compara-se dois produtos, administrados por via extravascular, tendo um deles como referência (BRASIL, 2002).

Durante os estudos de bioequivalência, os produtos teste e referência são administrados a voluntários sob mesmas condições. Posteriormente, amostras biológicas como sangue, plasma ou urina, são analisadas para medida da concentração de fármaco ou metabólitos e os seguintes parâmetros farmacocinéticos dos medicamentos teste e referência são avaliados: concentração plasmática máxima (C_{max}) e área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo (ASC), que são comparados estatisticamente (STORPIRTIS; CONSIGLIERI, 1995).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Medicamentos Genéricos e Similares

De acordo com a definição legal, medicamento similar é aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, e que é equivalente ao medicamento registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículo, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca (BRASIL, 2012a).

O medicamento genérico, segundo a ANVISA (BRASIL, 2012a), é aquele que contém o mesmo fármaco (princípio ativo), na mesma dose e forma farmacêutica, é administrado pela mesma via e com a mesma indicação terapêutica do medicamento de referência no país, apresentando a mesma segurança que o medicamento de referência no país podendo, com este, ser intercambiável.

Diante dessas definições, os medicamentos genéricos e similares podem ser considerados “cópias” do medicamento de referência e para o registro de ambos medicamentos, há obrigatoriedade de apresentação dos estudos de biodisponibilidade relativa e equivalência farmacêutica.

O medicamento referência é, geralmente, o inovador cuja biodisponibilidade foi determinada, durante o desenvolvimento do produto, e que teve sua eficácia e segurança comprovadas por meio de ensaios clínicos antes da obtenção do registro junto ao órgão federal para comercialização. A empresa que desenvolveu a formulação e a forma farmacêutica adequada à via de administração e ao objetivo terapêutico do medicamento, deve estabelecer e validar os processos de fabricação, bem como as especificações que deverão ser reproduzidas posteriormente, lote a lote (STORPIRTIS et al., 2004).

Desde sua criação, o medicamento genérico já tinha como obrigatoriedade a apresentação dos testes de bioequivalência, enquanto a obrigatoriedade de tais testes para medicamentos similares foi exigida a partir de 2003. Além disso, os

medicamentos similares possuem nome comercial ou marca, enquanto o medicamento genérico possui a denominação genérica do princípio ativo, não possuindo nome comercial (BRASIL, 2012a).

Desde 2003, com a publicação da Resolução RDC 133/2003 (BRASIL, 2003b) e Resolução RDC 134/2003 (BRASIL, 2003c) os medicamentos similares devem apresentar os testes de biodisponibilidade relativa e equivalência farmacêutica para obtenção do registro para comprovar que o medicamento similar possui o mesmo comportamento no organismo (*in vivo*), como possui as mesmas características de qualidade (*in vitro*) do medicamento de referência.

A apresentação dos testes de biodisponibilidade relativa para os medicamentos similares já registrados segue uma ordem de prioridade, ou seja, medicamentos considerados de maior risco, como antibióticos, antineoplásicos, antiretrovirais e alguns medicamentos com princípios ativos já realizaram esta adequação na primeira renovação após a publicação desta Resolução. Os demais medicamentos deverão apresentar o teste de biodisponibilidade relativa na segunda renovação do registro, e, até 2014 todos os medicamentos similares já terão a comprovação da biodisponibilidade relativa. Além disso, os medicamentos similares passam por testes de controle de qualidade que asseguram a manutenção da qualidade dos lotes industriais produzidos (BRASIL, 2012a).

Em 2007, foi publicada a Resolução RDC 17/2007 (BRASIL, 2007) com todos os pré-requisitos necessários para o registro do medicamento similar. Com a publicação desta norma, houve evolução da legislação relacionada a esta classe de medicamentos, uma vez que determina a apresentação das mesmas provas necessárias para registro de medicamento genérico.

2.2 Bioequivalência/Biodisponibilidade relativa

A equivalência terapêutica de produtos farmacêuticos depende diretamente da biodisponibilidade, que é definida pela quantidade e velocidade pela qual o princípio ativo é absorvido e se torna disponível em seu sítio de ação. Um estudo comparativo de biodisponibilidade refere-se à comparação das biodisponibilidades de diferentes

formulações do mesmo fármaco, ou de fármacos diferentes. Dois produtos são considerados bioequivalentes se as suas quantidades e velocidades de absorção não apresentam diferenças significativas, quando administradas à mesma dose molar do princípio ativo, sob condições experimentais similares (BRASIL, 2002).

Os ensaios de bioequivalência são realizados em humanos, por meio da administração dos medicamentos a serem avaliados seguido pela determinação das concentrações plasmáticas, séricas ou sangüíneas do fármaco ou metabólito ativo em função do tempo. A partir das curvas de concentração em função do tempo obtidas determinam-se os parâmetros farmacocinéticos utilizados na avaliação da bioequivalência e que são, basicamente, a concentração sanguínea máxima (C_{max}) do fármaco ou metabólito, e a área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo (PORTA, 1999).

De acordo com a RE 1.170, de 19 de abril de 2006, o estudo de bioequivalência deve ter três etapas: clínica, analítica e estatística.

Na etapa clínica, são realizadas a seleção dos voluntários, a administração das preparações farmacêuticas em estudo e a coleta das amostras biológicas, as quais são armazenadas em temperatura adequada até o momento da quantificação. O estudo convencional é do tipo aberto, aleatório e cruzado. O número de voluntários deverá ser estatisticamente significativo, não sendo permitida a utilização de número inferior a 12 participantes. Na falta de dados relativos ao coeficiente de variação do fármaco, pode-se optar por utilizar um número mínimo de 24 voluntários (BRASIL, 2006a; ARAUJO et al., 2010).

A etapa analítica é aquela em que o fármaco é quantificado nas amostras biológicas. Durante o planejamento da etapa analítica devem ser estabelecidos o analito a ser quantificado, a matriz biológica utilizada e o método analítico adequado, que deve ser específico para cada analito, exato e relativamente simples, de modo a minimizar os erros, devendo estar validado antes da realização do estudo. A validação consiste na avaliação de parâmetros que permitam atestar que o método pode ser utilizado para o fim a que se destina, possibilitando a obtenção de resultados precisos, exatos e isentos de interferentes, dentro de uma margem de erro estabelecida como aceitável (BRASIL, 2006a; ARAUJO et al., 2010).

A etapa estatística, cronologicamente, a primeira etapa do estudo, inicia-se com o cálculo do número adequado de voluntários para o fármaco em questão e

finaliza com o tratamento a que serão submetidos os dados gerados na etapa analítica. Não é aceita a exclusão de mais do que 5% dos voluntários do estudo e/ou a ausência superior a 10% dos valores das concentrações sanguíneas do fármaco provenientes da administração de cada medicamento por voluntário. Quanto ao tratamento dos dados, os estudos de bioequivalência utilizam os parâmetros farmacocinéticos que derivam diretamente das curvas de concentração plasmática do fármaco em função dos tempos de coleta da matriz biológica empregada no estudo. São eles: área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo (ASC), que fornece uma estimativa direta sobre a extensão de fármaco absorvida, concentração plasmática máxima atingida após a administração da dose do medicamento (C_{max}) e o tempo necessário para alcançar C_{max} (t_{max}) fornecendo estimativa sobre a velocidade que este processo ocorre (BRASIL, 2006a; ARAUJO et al., 2010).

Segundo Storpiritis e Consiglieri (1995), dois medicamentos são considerados bioequivalentes quando, ao serem administrados ao mesmo indivíduo, nas mesmas condições experimentais e na mesma dose molar, não apresentam diferenças significativas em relação à quantidade de fármaco absorvida e à velocidade do processo de absorção.

A bioequivalência entre dois produtos é estabelecida por meio do intervalo de confiança 90%, que deve estar entre 80 e 125% para os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ (BRASIL, 2006a) e nível de significância (α) menor que 0,05.

2.3 Sinvastatina

2.3.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

A sinvastatina é um agente antilipêmico, da classe das estatinas, utilizada no tratamento de primeira escolha em pacientes com hipercolesterolemia primária (NAJIB et al., 2003).

Segundo Muralidharan et al. (2009), a sinvastatina é um fármaco utilizado no controle da hipercolesterolemia (níveis elevados de colesterol) e para prevenção de doenças cardiovasculares. Em dosagens de 5 a 80 mg é um potente redutor de lipídeos que pode reduzir a lipoproteína de baixa densidade (LDL) em níveis de até 50%. Segundo os mesmos autores, não há um efeito de tal fármaco confirmado sobre os níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade) e triglicerídeos.

A sinvastatina é um pró-fármaco, ou seja, é administrada em sua forma lactona (forma inativa) e quando absorvida é rapidamente hidrolisada a sua forma ácida (metabólito ativo); a qual é um potente inibidor reversível e competitivo da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que está envolvida na biossíntese do colesterol (FONSECA, 2005; TSENG et al., 2007; ZHANG et al., 2010). Na aplicação clínica, portanto, a inibição desta enzima vai resultar na diminuição do colesterol plasmático.

Ainda que 85% da dose seja absorvida após administração oral, menos de 5% atinge a circulação devido ao extenso metabolismo de primeira passagem. A disponibilidade sistêmica de sinvastatina é inferior a 5% devido a conversão mediada por enzimas do citocromo P450 (CYP) no intestino e no fígado. O extenso metabolismo oxidativo de sinvastatina no fígado humano é primariamente mediado por CYP3A4 e CYP3A5, com o metabolismo remanescente sendo atribuído aos CYP2C8 e CYP2C9. Além do CYP, a glucuronidação constitui uma via metabólica comum para as estatinas. A sinvastatina, administrada na forma lactona, é metabolicamente ativada para a sinvastatina ácida. Esta conversão reversível na forma ativa ocorre por carboxiesterases inespecíficas na parede intestinal, fígado e no plasma, ou por hidrólise não enzimática (TUBIC-GROZDANIS et al., 2008).

O pico plasmático é atingido em 1,3 a 2,4 horas. A taxa de ligação proteica é alta (94-98%). Sofre extensa biotransformação hepática, originando por hidrólise metabólitos ativos. É excretada, principalmente, pelas fezes (58%) e parcialmente, na urina (13%). A meia-vida é de cerca de 3 horas (NAJIB et al., 2003; FONSECA, 2005). A farmacocinética da sinvastatina é demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Farmacocinética da sinvastatina - dose oral de 40 mg (NAJIB et al., 2003; FONSECA, 2005; NOVÁKOVÁ et al., 2009).

Biodisponibilidade Oral	Excreção Urinária	Excreção Fecal	Ligação à proteína plasmática	Meia-Vida ($t_{1/2}$)	Tempo de C_{max} (t_{max})	Concentração Máxima (C_{max})
5%	13%	58%	94 a 98 %	2 a 3 h	1,3 a 2,4 h	10 a 34 ng/mL

Segundo Tseng et al. (2007), como o fármaco em estudo sofre grande efeito de primeira passagem no fígado, tem como consequência uma baixa concentração do mesmo na circulação sanguínea. Este fato é relevante devido a necessidade bioanalítica de métodos capazes de quantificar baixas concentrações do analito.

Vale ressaltar, também, que o fato de existir a interconversão entre a sinvastatina e a sinvastatina ácida, aumenta a dificuldade na exatidão e precisão do método bioanalítico em questão. Esta interconversão está diretamente relacionada ao pH do meio no qual o fármaco se encontra (ZHANG et al., 2010).

Durante o desenvolvimento de um método bioanalítico para quantificação de analitos que sofrem interconversão é necessário otimizar uma condição na qual a mesma é diminuída ou eliminada. Para amostras com estrutura química hidroxil-ácida e a correspondente forma lactona, é importante manter o pH entre 4 e 5 para diminuir a interconversão. O aumento do pH (maior que 6) facilita a conversão da forma lactona para a ácida (na forma ionizada), enquanto que a diminuição do pH facilita a conversão da forma ácida para lactona ou da lactona para forma ácida não-ionizada. A maioria dos trabalhos utilizam pH em torno de 4,5 (JEMAL; OUYANG; POWELL, 2000; NOVÁKOVÁ et al., 2009).

A escolha da quantificação da sinvastatina inalterada segue a lista apresentada pela ANVISA constando quais os analitos que devem seguir estudos de bioequivalência / biodisponibilidade relativa: fármaco inalterado e/ou metabólito (BRASIL, 2006b).

A apresentação referência da sinvastatina no Brasil é o medicamento Zocor[®], da Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda. E segundo a ANVISA, outras apresentações disponíveis de sinvastatina hoje são: sinvastatina (Arrow, Biolunis, Biosintética, Brainfarma, Cristália, EMS, Germed, Legrand, Medley, Nova Química, Novartis, Ranbaxy, Sandoz); Ana-Lip (Gunther do Brasil); Sinvaz (Apsen); Clinfar

(Merck S/A); Cordiron (Diffucap-Chemobrás); Diocomb Si (Novartis); Genocardil (Genoma); Lipistatina (Germed); Lipotex (Medley); Liptrat (União Química); Lovacor (Lab. Americano de Farmacoterapia S/A); Menocol (Multilab); Mevilip (Laboris); Prevencor (Medley); Prevencor pril (Medley); Revastin (Brainfarma); Revastin (Hypermarcas); Revastin (Neo Química); Sinvalip (EMS); Sinvalip AASPAC (EMS); Sinvane (Brasterapica); Sinvacor (Baldacci); Sinvasmax (Globo); Sinvast (Biosintética); Sinvastacor (Sandoz); Sinvastamed (CIMED); Sinvastamil (Milian); Sinvastin (Pharlab); Sinvaston (Sanval); Sinvatrox (EMS); Sinvatrox (Legrand); Sinvax (Geolab); Androlip (Teuto) (BRASIL, 2012b).

2.3.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A sinvastatina, fármaco cujo nome químico é (1S,3R,7S,8S,8aR)-1,2,3,7,8,8a-Hexahidro-3,7-dimetil-8- {2- [(2R,4R)-tetrahydro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-il] etil} -1-naftil 2,2-dimetilbutirato, possui fórmula molecular $C_{25}H_{38}O_5$, peso molecular de 418,6, pKa de 4,68 e Log P (octanol/água) de 4,7 (CORSINI et al., 1999; MARTINDALE, 1999; DOMENIC et al., 2002). A sua fórmula estrutural está apresentada nas Figuras 1 e 2, como sinvastatina e sinvastatina hidroxilada, respectivamente.

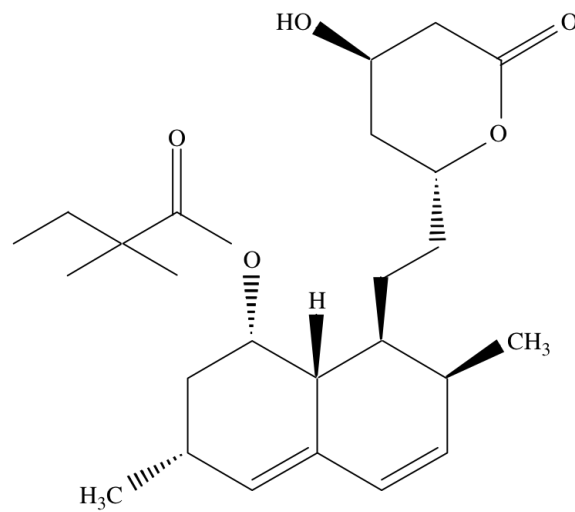


Figura 1 - Fórmula estrutural da simvastatina (ZHAO; YANG; ROGERS, 2002).

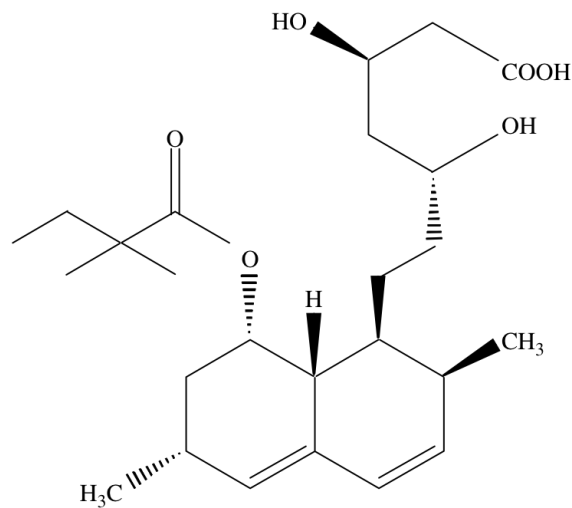


Figura 2 - Fórmula estrutural da simvastatina hidroxi-ácida (ZHAO; YANG; ROGERS, 2002).

Tal fármaco apresenta-se como um pó branco ou quase branco; praticamente insolúvel em água; levemente solúvel em álcool; muito solúvel em diclorometano (MARTINDALE, 1999).

2.4 Metodologias Bioanalíticas

Diferentes técnicas já foram desenvolvidas e estão presentes na literatura para quantificação das estatinas em matrizes biológicas, incluindo cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida acoplada a detector de ultravioleta (LC-UV), cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência (LC-FLU) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) (YANG; FENG; LUAN, 2003; APOSTOLOU et al., 2008; PATEL et al., 2008; NOVÁKOVÁ et al., 2009; ZHANG et al., 2010; DING et al., 2011).

Segundo Yang, Feng e Luan (2003), os métodos por GC-MS são de baixa detectabilidade e seletivos para realização de análises que contemplam esta faixa terapêutica de concentração plasmática de sinvastatina, porém a etapa do preparo da amostra é muito complicada. Takano, Abe e Hata (1990) desenvolveram metodologia por GC-MS com faixa linear de 0,1 a 10,0 ng/mL para quantificação de sinvastatina em soro, porém a metodologia exigia etapa de extração em fase sólida e derivatização do analito, o que dificulta o processamento da amostra, demanda um maior tempo para análise e aumentam os erros provenientes do preparo de amostras.

As metodologias desenvolvidas por LC-UV não possuem detectabilidade suficiente para análises nas concentrações terapêuticas da sinvastatina. Para tais equipamentos exige-se grande volume de plasma, extrações exaustivas, longos tempos de corridas cromatográficas, e mesmo assim não atingem limites de quantificações tão baixos quanto necessário para aplicação em estudos farmacocinéticos de sinvastatina (YANG; FENG; LUAN, 2003; PATEL et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

Carlucci et al. (1992) desenvolveram um método por LC-UV com erros relativos na exatidão de 5,0, 2,1 e 3,2% para controles nas concentrações de 50, 250 e 500 ng/mL de sinvastatina em plasma, respectivamente. As correspondentes precisões foram de 2,3, 1,8 e 1,0% (CV%); porém o método era linear de 20 - 1000 ng/mL, não sendo aplicável à estudos farmacocinéticos para o antilipêmico.

A cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência é uma técnica de alta sensibilidade, porém as amostras exigem um complexo processo de derivatização antes da análise, o que a torna inconveniente (YANG; FENG; LUAN, 2003; DING et al., 2011). Ochiai et al. (1997) desenvolveram metodologia bioanalítica para quantificação de sinvastatina em plasma utilizando o detector de fluorescência, porém mesmo adquirindo detectabilidade suficiente para o estudo (limite de quantificação de 0,1 ng/mL), exigiu-se um maior tempo de preparo de amostras com derivatização e extração em fase sólida.

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tem sido bastante explorada devido a maior sensibilidade, seletividade, detectabilidade e praticidade no preparo de amostras. Encontram-se, previamente desenvolvidos, métodos bioanalíticos com baixa detectabilidade, utilização de técnicas de preparo de amostras desde precipitação de proteínas (PPT), extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), entre outras.

Devido a seu extenso metabolismo hepático, interconversão e coeficiente de partição, os níveis de sinvastatina no plasma humano durante a terapia da hipercolesterolemia tornam-se bastante baixos (mesmo quando administradas as maiores doses terapêuticas), o que faz necessário o desenvolvimento de metodologias de baixa detectabilidade e alta seletividade para validação adequada do método bioanalítico e aplicação em estudos de farmacocinética.

Em virtude das dificuldades encontradas em diversas metodologias descritas na literatura, buscou-se desenvolver uma metodologia adequada por sua praticidade e de fácil implantação.

A Tabela 2 sumariza alguns parâmetros das metodologias bioanalíticas descritas na literatura para quantificação de sinvastatina em amostras biológicas.

Tabela 2 - Metodologias para quantificação de sinvastatina em amostras biológicas

Fármaco	Matriz	Extração	Análise	LIQ (ng/mL)	Referências
Sinvastatina	Soro	SPE/ derivatização	GC-MS	0,1	TAKANO; ABE; HATA, 1990
Sinvastatina	Plasma	PPT	LC-UV	20	CARLUCCI et al., 1992
Sinvastatina	Plasma	PPT	LC-UV	1	MURALIDHARAN et al., 2009
Sinvastatina	Plasma	SPE/ derivatização	LC-FLU	0,1	OCHIAI et al., 1997
Atorvastatina/ Sinvastatina	Plasma	SPE	LC-MS	0,08	NOVÁKOVÁ et al., 2009
Atorvastatina/ Sinvastatina	Plasma	SPE	LC-MS/MS	0,05	NOVÁKOVÁ; ŠATÍNSKÝ; SOLICH, 2008
Sinvastatina	Plasma	SPE	LC-MS/MS	0,05	YANG et al., 2005
Sinvastatina	Plasma	LLE	LC-MS/MS	0,1	PATEL et al., 2008
Sinvastatina	Plasma	SPE	LC-MS/MS	0,1	BARRETT et al., 2006
Sinvastatina	Plasma	SPE	LC-MS/MS	0,5	JEMAL; OUYANG; POWELL, 2000
Sinvastatina	Plasma	LLE	LC-MS/MS	0,05	ZHANG et al., 2004
Sinvastatina	Plasma	LLE	LC-MS/MS	0,1	NAJIB et al., 2003
Sinvastatina	Plasma	LLE/PPT	LC-MS/MS	0,1	APOSTOLOU et al., 2008
Sinvastatina	Plasma	LLE/ <i>salting-out</i>	LC-MS/MS	0,1	ZHANG et al., 2010
Sinvastatina	Plasma	LLE	LC-MS	0,1	YANG; FENG; LUAN, 2003

SPE = extração em fase sólida

PPT = precipitação de proteínas

LLE = extração líquido-líquido

GC-MS = cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

LC-UV = cromatografia líquida acoplada a detector de ultravioleta

LC-FLU = cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência

LC-MS = cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

LC-MS/MS = cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial

LIQ = limite de quantificação inferior.

Como se pode observar, a maioria dos métodos encontrados na literatura utilizaram a técnica de LC-MS/MS para quantificar a sinvastatina em plasma. Porém, existem poucos métodos rápidos de análise: preparo de amostra simples e rápido, tempo curto de corrida cromatográfica e utilização de técnicas avançadas como a

cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS), que além de permitir análises mais rápidas e robustas ainda permite um menor gasto de solventes. Desta maneira, como os parâmetros supracitados são de extrema importância pelo grande volume de amostras a serem processadas e analisadas durante a aplicação em estudos de bioequivalência, o presente estudo visa o desenvolvimento de metodologia adequada para as análises propostas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar metodologia bioanalítica para quantificação de sinvastatina em plasma humano e posterior aplicação em estudo farmacocinético de bioequivalência de duas formulações de sinvastatina em voluntários saudáveis.

3.2 Objetivos Específicos

- desenvolver metodologia bioanalítica rápida e com baixo limite de quantificação inferior (LIQ) para determinação de sinvastatina em amostras de plasma de voluntários incluídos em estudo de biodisponibilidade relativa por cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS);
- validar a metodologia desenvolvida conforme as legislações vigentes no Brasil;
- aplicar a metodologia desenvolvida e validada para quantificação de sinvastatina em plasma humano de voluntários incluídos no estudo de bioequivalência;
- realizar comparação entre os parâmetros farmacocinéticos obtidos para as formulações (teste *versus* referência) para determinação ou não de bioequivalência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

O estudo clínico foi realizado na Unidade CEBIO do Hospital Belo Horizonte, localizado na cidade de Belo Horizonte - MG, onde foi definido um cronograma de coleta para as amostras do estudo e a população de voluntários.

A população selecionada para o estudo foi de 44 voluntários sadios, adultos, de ambos os sexos, com idade de 18 a 40 anos e com índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 e 27,0 kg/m²; segundo os critérios de inclusão de voluntários: não fumantes, peso e idade ideal, ausência de patologias (cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas), sem antecedentes de hipersensibilidade aos medicamentos, voluntários do sexo feminino não grávidas (comprovada por meio de exame laboratorial) ou em período de amamentação.

O estudo foi do tipo aberto, conduzido segundo um delineamento aleatório cruzado de dois períodos (*crossover 2X2*), ou seja, o planejamento possuiu blocos aleatorizados modificados, nos quais cada bloco recebeu mais de uma formulação (teste e referência) de um mesmo fármaco em períodos diferentes (Fase I e Fase II) (FIGURA 3).

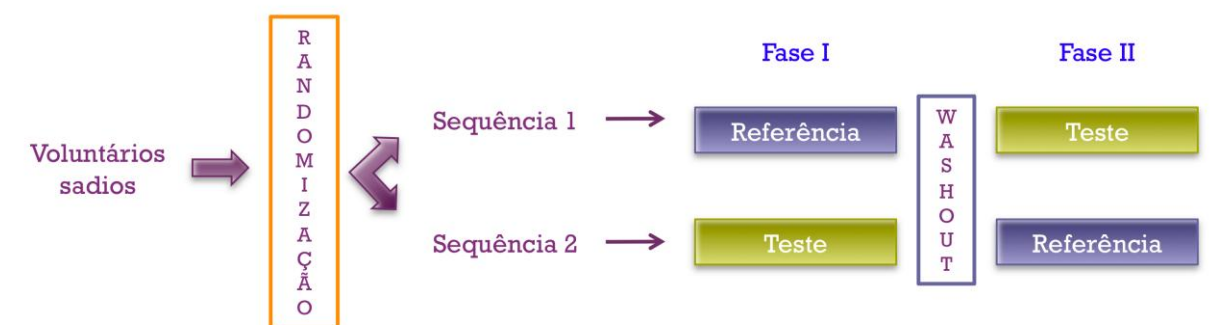


Figura 3 - Estudo do tipo aleatório e cruzado.

A sequência atribuída a cada voluntário nos períodos de estudo foi determinada por uma lista de randomização (aleatorização) gerada automaticamente pelo *software* nQuery Advisor[®] versão 7.0 (TABELA 3). No período I (Fase I), os voluntários descritos como “T” receberam por via oral, comprimido Teste contendo 40 mg de sinvastatina, enquanto que os descritos como “R” receberam um comprimido de Zocor[®] contendo 40 mg de sinvastatina considerado como o produto Referência. No período II (Fase II) o procedimento foi repetido, invertendo-se os grupos, de modo que cada voluntário recebeu cada um dos produtos em estudo, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Lista de aleatorização do estudo clínico.

ID do Voluntário	Sexo	Período I	Período II
1	F	T	R
2	F	R	T
3	F	R	T
4	F	T	R
5	F	T	R
6	F	R	T
7	F	T	R
8	F	R	T
9	F	R	T
10	F	T	R
11	F	R	T
12	F	T	R
13	F	T	R
14	F	R	T
15	F	R	T
16	F	T	R
17	F	R	T
18	F	T	R
19	F	R	T
20	F	T	R
21	F	R	T
22	F	T	R
23	M	R	T
24	M	T	R
25	M	R	T
26	M	T	R
27	M	T	R
28	M	R	T
29	M	R	T
30	M	T	R
31	M	R	T
32	M	T	R
33	M	R	T
34	M	T	R
35	M	T	R
36	M	R	T
37	M	R	T
38	M	T	R
39	M	T	R
40	M	R	T
41	M	T	R
42	M	R	T
43	M	T	R
44	M	R	T

R = Produto Referência

T = Produto Teste

M = sexo masculino

F = sexo feminino.

De acordo com a RE 1.170 de 19 de abril de 2006, as duas etapas de administração do medicamento deveriam obedecer a um intervalo mínimo de 7 meias-vidas entre elas (*washout* - tempo entre os períodos de tratamento suficientemente grande para que não haja efeito residual do fármaco entre fase I e fase II). No caso, usando o valor máximo de meia-vida relatado na literatura para indivíduos adultos saudáveis, que é de 3 horas, a segunda etapa do estudo deveria ocorrer em período não inferior a 21 horas após a ingestão dos medicamentos na primeira etapa. Por segurança e comodidade, realizou-se o segundo período do estudo uma semana após o primeiro período.

O cronograma de coleta das amostras deve garantir a adequada caracterização do perfil plasmático do fármaco (concentração em função do tempo), contemplando um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida de eliminação dos mesmos (BRASIL, 2006a). Portanto, considerando a meia-vida de 3 horas, haveria a necessidade de coletar as amostras até 15 horas após a administração do medicamento; porém, por comodidade, coletou-se até 24 horas.

Conforme o desenho amostral na Tabela 3, a administração dos medicamentos aos voluntários foi feita pela manhã, após jejum de 8 horas, com o auxílio de 200 mL de água à temperatura ambiente. O período de jejum antes da administração dos medicamentos foi de, no mínimo oito horas e após a administração da medicação os voluntários ainda permaneceram em jejum por mais 4 horas. O jejum feito pelos voluntários consistiu na abstinência de ingestão de alimentos e de água. Os voluntários receberam almoço, lanche e jantar padronizados, respectivamente, quatro, sete e onze horas após a administração dos medicamentos.

Os voluntários ainda foram orientados a não ingerirem bebidas alcoólicas, café e outras bebidas xânticas, por pelo menos 48 horas antes do ensaio, e estas bebidas não foram oferecidas durante a realização do estudo. Além disso, os voluntários foram orientados a não tomarem qualquer medicação uma semana antes do estudo, e durante a sua realização, e qualquer intercorrência deveria ser imediatamente comunicada ao médico de plantão.

Foram coletadas amostras de 8 mL de sangue em tubo heparinizado nos seguintes intervalos de tempo: -0,50; 0,33; 0,66; 1; 1,33; 1,66; 2; 2,33; 2,66; 3; 3,33; 3,66; 4; 6; 8; 10; 12 e 24 horas após a administração dos medicamentos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1800 g e o plasma aliquoteado em

duplicata em frascos criogênicos de polipropileno de 4 mL. Os frascos foram armazenados em freezer a -20°C até o momento das análises.

As amostras de plasma foram transportadas para o laboratório analítico (Laboratório de Bioequivalência – Etapa Analítica do Centro de Pesquisa em Biotecnologia Ltda. - CEBIO) em caixas com isolamento térmico.

As amostras recebidas foram armazenadas em freezer a -20°C , com controlador de temperatura em tempo integral, até o momento da análise e quantificação dos fármacos.

As coletas das amostras utilizadas neste projeto foram realizadas mediante aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Belo Horizonte, credenciado pelo CONEP – Conselho Nacional de Saúde/MS (ANEXO A) e são motivo de avaliação neste estudo. Porém a realização da etapa clínica foi de total responsabilidade e execução do CEBIO.

Todos os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B), cujo protocolo clínico foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Belo Horizonte. Os voluntários receberam uma explanação da natureza e dos objetivos do estudo, métodos, benefícios previstos e potenciais riscos; enfatizando que o estudo tinha a finalidade de pesquisa e que ele estaria livre para se retirar a qualquer momento do estudo sem que isto lhe cause qualquer prejuízo.

Todos os resultados obtidos foram cedidos à elaboração desta dissertação de mestrado, bem como publicação dos mesmos em artigos científicos e periódicos da área conforme descrito na carta de autorização de divulgação de dados (ANEXO C), concedida pelo CEBIO.

4.2 Materiais

4.2.1 AMOSTRAS

Foram avaliadas duas formulações contendo sinvastatina: produto designado referência (R) - Zocor[®] - comprimidos contendo 40 mg de sinvastatina, produzido por Merck Sharp & Dohme e o produto designado teste (T) - comprimidos contendo 40 mg de sinvastatina.

O nome do medicamento teste e de seu patrocinador são dados protegidos por sigilo contratual e por isso, não são divulgados nesta dissertação (ANEXO C).

4.2.2 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA

Todas as análises foram realizadas com padrões primários de sinvastatina (lote: I1H070) e lovastatina (lote: H3F071, utilizada como padrão interno nas análises) fornecidos pela USP (*The United States Pharmacopeia*), com grau de pureza superior a 99% e dentro do prazo de validade.

4.2.3 SOLVENTES E REAGENTES

Para a realização da validação e aplicação da metodologia bioanalítica desenvolvida, foram utilizados os seguintes solventes e reagentes: acetato de amônio (J.T. Baker, grau HPLC), acetonitrila (J.T. Baker, grau HPLC), ácido fórmico (Sigma-Aldrich, P.A.) água ultrapura (milli-Q, Millipore), éter-metil-terc-butil (J.T. Baker, grau HPLC) e hidróxido de amônio (Vetec, P.A.).

4.2.4 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

As análises foram realizadas em sistema de LC-MS/MS (Waters®) constituído por bomba UPLC (Acquity UPLC® HClass), detector MS/MS do tipo TQ Detector®, injetor automático (*Sample Manager – FTN*) e *software* MassLynx® versão 4.1.

Além do cromatógrafo líquido acoplado a espectrometria de massas, foram utilizados diversos tipos de equipamentos e materiais (TABELA 4) para a validação e aplicação da metodologia bioanalítica desenvolvida:

Tabela 4 - Descrição dos equipamentos e materiais utilizados.

Equipamentos/Acessórios	Marca	Modelo/Descrição
Agitador tipo <i>Vortex</i>	Vixar	<i>Vortex</i> mixer
Agitador tipo <i>Vortex</i>	Ciencor	Vortex-Genie 2 G560
Balança Analítica	Ohaus	AdventurerTMPPro AV264CP
Banho ultrasônico	Branson	Soni-tech B8510R-MT
Bomba de vácuo	Sartorius	16695
Capela de Exaustão	-	-
Centrífuga Refrigerada	Thermo Scientific	Megafuge 11R
Compressor de ar	Cristófoli	9001
Concentrador de amostras	Tecnal	TE-019
Dessecador	Pyrex	Vidro borossilicato/vácuo
Filtro membrana em PVDF	Sartorius Stedim	47mm diâmetro 0,45 µm porosidade
Freezer -20 °C	Fanem	349 FV
<i>Inserts</i>	Alcrom	ALL-1062
Micropipetas	HTL S.A	Lambmate (100, 200 e 1000 µL) Discovery Comfort (100, 200 e 1000 µL) Gilson (200 e 1000 µL)
Microtubos	Sarstedt	72.690.001 e 72.695.500
Ponteiras descartáveis	Global Trade Technology	4767 e 18260
Purificador de água	Elga	PURELAB Option-Q 7BP
Refrigerador	Electrolux	Frost Free DF 37
Repipetador manual	Eppendorf	Multipette® plus
Secador de ar	Metalplan	Airpoint
Seringas para repipetador	Eppendorf	Combitips plus 5 e 25 mL
Tubos cônicos	Falcon	17018 (15 mL) e 17002 (50 mL)
Tubos criogênicos	Sarstedt	60.557.001
<i>Vials</i>	Sun-sri	200.402
Plasma Branco	Allcrom	ALL-CP-1253
Balões Volumetricos	-	Voluntários Sadios
Provetas	Pyrex	10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mL
Pré-colunas	Pyrex	200, 500 e 1000 mL
Colunas	Phenomenex	Gemini C18 5 µm (3,0 x 4,6mm)
	Phenomenex	Kinetex C18, 2,6 µm (100,0 x 4,60 mm)

4.3 Métodos

4.3.1 ETAPA ANALÍTICA

4.3.1.1 Método Bioanalítico

O desenvolvimento do método constituiu um dos principais objetivos desta pesquisa. A determinação de sinvastatina em plasma humano foi processada baseando-se principalmente nos estudos descritos por Najib et al. (2003) e por Zhang et al. (2004), utilizando extração líquido-líquido e a análise por método cromatográfico em fase líquida acoplada a espectrometria de massas. As condições de extração e detecção foram otimizadas e validadas, e o método desenvolvido foi aplicado à análise de amostras de voluntários sadios do estudo de bioequivalência entre duas formulações de sinvastatina.

Foram preparadas soluções-mãe do padrão de sinvastatina e do padrão interno de lovastatina, na concentração de 1 mg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas para sinvastatina para preparo das curvas analíticas e controles de qualidade (CQs) em plasma, e foram preparadas para a lovastatina para ser utilizada como padrão interno durante o processamento das amostras.

As concentrações das soluções de trabalho de sinvastatina foram definidas durante o desenvolvimento do método bioanalítico e preparadas a partir da solução-mãe em água:acetonitrila (1:1, v/v). A lovastatina foi diluída e utilizada como PI na concentração de 0,15 µg/mL em acetonitrila, enquanto que a curva analítica e os controles de qualidade foram preparados em plasma.

A curva analítica foi preparada através do enriquecimento de alíquotas de 450 µL de plasma com 50 µL de cada solução-padrão de sinvastatina, resultando nas concentrações plasmáticas equivalentes a 0,4; 1; 2,5; 5; 10; 15; 25 e 40 ng/mL e os controles de qualidade a 1,2; 12 e 30 ng/mL de sinvastatina.

Juntamente com a curva analítica, em duplicata, foram realizadas análises de duas amostras branco e duas amostras zero, que consistem em amostra de uma

matriz biológica na qual nenhum analito foi adicionado e amostra de matriz processada com adição apenas de padrão interno (PI), respectivamente. Todas as amostras foram preparadas a partir do mesmo “pool” de plasmas branco.

O procedimento de extração foi realizado para todas as amostras. Resumindo, em um microtubo de 2,0 mL foram adicionados 500 µL plasma, adicionou-se 50 µL de PI, 50 µL de acetato de amônio 50 mmol/L pH= 4,50 e 1000 µL de MTBE. Agitou-se por 5 minutos em agitador tipo vórtex com plataforma orbital, centrifugou-se a 5000 g, por 5 minutos e sob refrigeração a 5 °C e transferiu-se 850 µL da fase orgânica para microtubos limpos e secos. As amostras foram levadas a secura sob fluxo de ar comprimido em temperatura ambiente e ressuspensas em 200 µL de fase móvel para posterior injeção no UPLC-MS/MS conforme condições cromatográficas estabelecidas.

Para o desenvolvimento do método bioanalítico foi necessário a otimização das condições de extração, das condições cromatográficas e dos parâmetros do espectrômetro de massas. Para isso foram considerados diferentes tipos de solventes, materiais e reagentes, sendo escolhidos pelo método os objetos que trouxeram maior praticidade, segurança, estabilidade, seletividade, recuperação, robustez, precisão, exatidão e que se enquadrasse na detectabilidade necessária.

O método bioanalítico desenvolvido, que melhor se enquadrou nos parâmetros de validação, está descrito nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de sinvastatina em plasma humano por UPLC-MS/MS.

Parâmetros	Descrição
Técnica bioanalítica	UPLC-MS/MS
Detecção	sinvastatina: 419,3 > 199,0 lovastatina: 405,0 > 199,0
Anticoagulante	heparina
Coluna Analítica	Phenomenex, Kinetex C18, 2,6 µm (100,0 x 4,60 mm)
Pré-coluna	Phenomenex, Gemini C18 5 µm (3,0 x 4,6 mm)
Temperatura da coluna	45 °C
Fase Móvel	Acetonitrila : Acetato de Amônio 2,0 mmol/L + 0,025% ácido fórmico (70:30, v/v)
Vazão de Fase Móvel	1,00 mL/min
Razão do <i>splitter</i>	1:4
Volume de injeção	20 µL
Temperatura do amostrador	5 °C
Linearidade	0,4 – 40,0 ng/mL
Tempos de retenção	2,70 ± 0,50 min (sinvastatina) 2,25 ± 0,50 min (lovastatina)
Tempo de Corrida	3,5 min
Tipo de Integração	(base-a-base)
Equação da curva	$y = a + bx (1/x^2)$

Tabela 6 - Condições do espectrômetro de massas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de sinvastatina em plasma humano por UPLC-MS/MS.

Parâmetros	Descrição
Espectrômetro de Massas	MS/MS – <i>TQ Detector</i>
Fonte de ionização	<i>Electrospray</i> no modo positivo
Íons monitorados pelo sistema MRM	sinvastatina: 419,3 > 199,0 lovastatina: 405,0 >199,0
Energia de colisão	sinvastatina: 10,0 eV lovastatina: 14,0 eV
Capilaridade	3,80 kV
Tensão do cone	sinvastatina: 22,0 V lovastatina: 18,0 V
Tensão do extrator	3,0 V
RF lens	0,1 V
Temperatura de fonte de ionização	140 °C
Temperatura de dessolvatação	450 °C
Fluxo do gás de dessolvatação	550 L/h
Fluxo do gás do cone	50 L/h
LM Resolution 1	10,0
HM Resolution 1	9,0
Ion Energy 1	1,0
Entrance	1,0
Exit	1,0
LM Resolution 2	10,0
HM Resolution 2	10,0
Ion Energy 2	1,0
Gain	2,0
Dwell time	0,15 s

4.3.1.2 Validação do método bioanalítico

4.3.1.2.1 Seletividade

Segundo a RE 899/2003, a seletividade consiste na habilidade do método bioanalítico de medir e diferenciar o analito e o PI de interferentes, os quais podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição, impurezas e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo. A interferência de metabólitos, nicotina, cafeína e medicamentos de venda isenta de prescrição é considerada quando necessário, assim como a possibilidade de conversão de um metabólito no composto original durante os procedimentos da análise (BRASIL, 2003a).

Para avaliação da seletividade foram analisadas amostras de plasma de seis lotes diferentes, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, sob condições controladas referentes ao tempo, alimentação e outros fatores importantes para o estudo. Cada amostra branco foi testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas estabelecidas para o estudo.

Os resultados obtidos serão comparados com aqueles obtidos de amostras de LIQ extraído. A obtenção de cromatogramas com áreas de picos interferentes nos tempos de retenção do fármaco e do PI inferiores, respectivamente, a 20% da área do LIQ e 5% da área na concentração utilizada, confirma a seletividade do método (ANVISA, 2003a).

4.3.1.2.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diferentes e diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003a).

Para definir a relação entre concentração e resposta, foi preparada uma curva

analítica contendo oito diferentes níveis de concentração, variando de 0,4 a 40,0 ng/mL em plasma.

Para a construção da curva analítica adicionou-se padrão de sinvastatina às amostras de plasma branco de voluntários em oito concentrações diferentes (0,4 ng/mL, 1,0 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5,0 ng/mL, 10,0 ng/mL, 15,0 ng/mL, 25,0 ng/mL e 40,0 ng/mL). Na análise da curva analítica ainda foram incluídas amostras de plasma branco e plasma branco adicionado de padrão interno.

De acordo com a RE 899/2003, existem alguns critérios que devem ser levados em consideração no momento de analisar uma curva analítica, a menor concentração nominal deve ter desvio menor ou igual a 20% e as demais concentrações não devem ultrapassar 15% em relação ao valor nominal e o coeficiente de correlação linear deve ser superior a 0,98 (BRASIL, 2003a).

Quando a curva analítica possui uma extensa faixa de linearidade (duas ou mais ordens de magnitude), exige-se que se defina o peso dos pontos situados nas extremidades, para evitar a polarização da curva em favor dos padrões de concentrações mais elevadas. Deve ser avaliado, qual a forma matemática mais simples e adequada a ser utilizada na construção da curva analítica do método. Para isso foi utilizado o método de regressão dos mínimos quadrados (BRAGGIO et al., 1996).

Para definir o melhor modelo de regressão linear foram utilizadas três diferentes curvas analíticas em matriz, utilizando-se os mesmos procedimentos e condições dos outros parâmetros de validação, porém sem a eliminação de valores com desvio acima dos critérios estabelecidos para linearidade, como forma de obter uma avaliação mais criteriosa da análise de regressão.

A equação da reta foi o modelo matemático escolhido para cálculo das curvas analíticas, apresentando-se a mais simples das opções.

A escolha do peso dos pontos se deu através da observação dos histogramas dos resíduos (erro relativo) calculados para três curvas de calibração, usando-se ponderação $1/x$ e $1/x^2$, e da avaliação do somatório dos valores absolutos de resíduo das curvas analíticas calculadas nas duas ponderações. O melhor modelo é aquele que possuir o menor somatório de resíduos. (BRAGGIO et al., 1996; ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002).

A uniformidade das variâncias (homoscedasticidade) é um parâmetro

comumente utilizado para avaliar a adequação da ponderação ao modelo experimental em questão (ALMEIDA ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002).

4.3.1.2.3 Determinação do Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O LIQ é a menor concentração do analito na matriz biológica que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. A razão entre o sinal e o ruído da linha de base deve ser maior que 5:1, ou seja, o LIQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do fármaco. Os picos de resposta do fármaco nos LIQ devem ser identificáveis e reproduzíveis com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120 % quando comparados à concentração nominal declarada.

Para avaliação da precisão e da exatidão do método, amostras de LIQ e CQs foram incluídas no procedimento de validação. Ambos devem ser comparados com a concentração nominal declarada e seguir os critérios de precisão e exatidão.

4.3.1.2.4 Limite Inferior de Detecção (LD)

Segundo a RE 899/2003, o limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003a).

Este parâmetro pode ser calculado da seguinte forma:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}, \text{ onde}$$

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y da curva analítica.

IC = inclinação da curva analítica.

4.3.1.2.5 Recuperação

O teste de recuperação mede a eficiência do procedimento de extração do método analítico, dentro de um limite de variação. A recuperação das substâncias de interesse depende de fatores intrínsecos ao processo de extração aplicado, tais como solução de extração, método, matriz biológica, entre outros. É expressa como porcentagem da concentração nominal declarada do analito e obtida a partir da comparação dos resultados de amostras contendo os analitos em solução, com os resultados de amostras extraídas (nas mesmas concentrações do padrão adicionado em solução).

Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja consistente e reprodutível. O cálculo da recuperação foi feito em função da relação de área das amostras extraídas e não extraídas, preparadas tanto em solução quanto aquelas adicionadas ao extrato da matriz biológica, para o analito e para o padrão interno separadamente.

4.3.1.2.6 Efeito Matriz

O efeito matriz é o efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica. A coeluição de componentes da matriz biológica com algum dos analitos estudados pode afetar a ionização do mesmo resultando em supressão ou indução iônica, o que pode afetar a precisão e exatidão do método (CHAMBERS et al., 2007; CASSIANO et al., 2009).

Segundo Chambers et al. (2007) o efeito matriz pode ser causado por diversos fatores, entre eles, fosfolipídeos endógenos, excipientes da formulação e fase móvel.

Existem dois métodos comuns para detectar um efeito matriz: o método de infusão pós-coluna (qualitativo/dinâmico) e o método de dopagem pós-extração (quantitativo/estático) (CHAMBERS et al., 2007; CASSIANO et al., 2009).

Neste trabalho utilizou-se o primeiro método, no qual monitorou-se a resposta do instrumento durante a infusão constante de solução-padrão no MS/MS e injeção de amostra de branco extraído no UPLC-MS/MS identificando possíveis regiões cromatográficas com efeito matriz onde os analitos possivelmente sofreriam indução ou supressão iônica. A infusão dos analitos foi feita após a coluna cromatográfica e antes da fonte de ionização do espectrômetro de massas, enquanto que a matriz extraída (sem adição de analito e padrão interno) foi injetada normalmente nas condições cromatográficas otimizadas. Sendo assim foi possível avaliar a influência da matriz na resposta do analito.

Caso as regiões de indução ou supressão iônica estivessem próximas ao tempo de retenção dos analitos, tentaria-se uma modificação cromatográfica que modificasse a eluição dos mesmos para que não houvesse o efeito matriz (CHAMBERS et al., 2007).

4.3.1.2.7 Precisão e Exatidão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados individuais de análises quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. Com isso, avalia-se a proximidade dos resultados obtidos.

A precisão do método foi determinada em uma mesma corrida analítica (precisão intra-corrída) e em corridas diferentes (precisão inter-corrídas), utilizando-se três níveis de CQs, (CQB, CQM, CQA) em sete determinações para cada nível, contemplando a faixa de variação do procedimento.

É expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%, segundo a fórmula:

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

A exatidão consiste no grau de concordância entre os resultados individuais obtidos em um ensaio e o valor aceito como referência.

A exatidão do método foi determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrída) e em corridas diferentes (exatidão inter-corrídas), envolvendo diferentes datas, utilizando-se três níveis de CQs (CQB, CQM, CQA) em sete determinações para cada nível, contemplando a faixa de variação do procedimento.

Segundo a RE 899/2003, o desvio não deve exceder 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%. A exatidão deve, então, estar entre a faixa de 85% a 115% (80% a 120% para LIQ).

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concetração média determinada}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

No mínimo 67% das replicatas de cada concentração devem apresentar desvio inferior ao limite especificado.

4.3.1.2.8 Testes de Estabilidade

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica, de substâncias presentes na matriz (como anticoagulante), do material de acondicionamento utilizado e das condições de armazenamento (BRASIL, 2003a).

Os estudos de estabilidade são realizados para determinar se a concentração de um analito se mantém dentro de limites específicos, numa dada matriz (plasma humano, nesse estudo), sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo e visa garantir que o fármaco não sofre alteração entre a coleta e a análise da amostra (CAUSON, 1997).

A estabilidade do analito foi avaliada durante manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise (pós-processamento e nas soluções-padrão) (BRASIL, 2003a).

Em cada estudo de estabilidade utilizou-se uma curva analítica recém-preparada para determinação da concentração das amostras de CQs. As soluções do analito e do PI utilizadas foram recentes, exceto no estudo de estabilidade de solução estoque, através do qual se determinou a estabilidade do analito e PI em solução.

A estabilidade foi demonstrada quando não se observou desvio superior a 15,0 % da média das concentrações obtidas para as amostras-teste com relação à média das concentrações obtidas para as amostras recém-preparadas. Todas as concentrações obtidas foram incluídas no cálculo da média.

4.3.1.2.8.1 Estabilidade de Curta Duração

A estabilidade de curta duração do analito é avaliada após a manutenção dos CQs em estudo (CQB e CQA) à temperatura ambiente por um período de 4 a 24 horas, baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente (até o início da extração).

Ao término desse período as amostras foram extraídas e analisadas. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

4.3.1.2.8.2 Estabilidade de Longa Duração

Este parâmetro avaliou a estabilidade das amostras durante o período que está compreendido entre a data da coleta das amostras de plasma de voluntários que receberam o comprimido de sinvastatina e a data de término da análise da última

amostra (BRASIL, 2003a).

Os resultados das amostras de controle de qualidade analisadas, em duas concentrações diferentes, mantidas a -20°C por 90 dias foram comparados aos resultados de amostras recém-preparadas e imediatamente analisadas.

4.3.1.2.8.3 Estabilidade de Pós-Processamento

A estabilidade de pós-processamento é fundamental em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de amostragem/injeção, de modo que pode haver um intervalo de tempo relativamente grande entre o término da extração e a análise das amostras.

Por isso, a estabilidade do analito e do PI foi avaliada após o processamento e armazenamento das amostras à mesma faixa de temperatura do autoinjeter ($\pm 5^{\circ}\text{C}$), por período superior ao intervalo entre o término do processamento da lista e o final da corrida analítica (lista de amostras de voluntários).

A média das concentrações dos CQs testes de estabilidade de pós-processamento foi comparada com aquela obtida na lista de estabilidade de recém-preparado, verificando-se a variação nas concentrações obtidas.

4.3.1.2.8.4 Estabilidade de Ciclos de Congelamento e Descongelo

A estabilidade do processo de congelamento e descongelamento das amostras biológicas foi determinada após três ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras (CQB e CQA) destinadas ao estudo foram congeladas à mesma temperatura de armazenamento das amostras de voluntários e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente (por uma hora). Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas por 12 a 24 horas e, assim sucessivamente, até completar os três ciclos.

As amostras do conjunto 1 passaram por 1 ciclo de congelamento e

descongelamento, as amostras do conjunto 2 passaram por dois ciclos e as amostras do conjunto 3 passaram por 3 ciclos. Ao término do último processo de descongelamento as amostras do conjunto 3 foram extraídas e analisadas juntamente com as amostras de uma curva analítica recém-preparada.

O número de ciclos de congelamento e descongelamento aprovados no estudo foi maior ou igual ao número de ciclos a que as amostras de voluntários foram submetidas.

A média das concentrações dos CQs testes do estudo de estabilidade congelamento e descongelamento foi comparada com aquela obtida na lista de estabilidade recém-preparado, verificando-se o grau de degradação.

4.3.1.2.8.5 Estabilidade de Soluções Padrão

A estabilidade das soluções-padrão do analito e do PI foram avaliadas de duas maneiras. Primeiramente em soluções mantidas sob refrigeração a temperatura de aproximadamente 5°C por um período de tempo superior ao período de uso, e posteriormente em soluções avaliadas mantendo as mesmas à temperatura ambiente por um período de no mínimo 6 horas (BRASIL, 2003a).

As soluções foram consideradas estáveis quando não foi observado desvio superior a 15% do valor obtido a partir das soluções recém-preparadas.

Todas as amostras de soluções foram preparadas em fase móvel, na concentração final equivalente a amostras de CQB, CQA e PI em plasma, obtidas a partir de soluções estoque (solução-mãe) e foram analisadas logo após o preparo.

A média das áreas dos CQ testes foi comparada com aquela obtida para os CQ recém-preparados, verificando-se o grau de degradação.

4.3.1.3 Quantificação de sinvastatina nas amostras de plasma

A quantificação de sinvastatina nas amostras de plasma foi realizada conforme a metodologia analítica descrita no item (4.3.1.1).

As amostras de plasma dos voluntários que receberam sinvastatina foram analisadas paralelamente à curva analítica com oito pontos e à análise das amostras de plasma de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) em triplicata, quadruplicata ou quintuplicata, dependendo da quantidade de amostras de voluntários analisados por corrida analítica.

A curva analítica e as amostras de controle de qualidade de concentrações conhecidas foram preparadas adicionando-se o fármaco à matriz biológica escolhida para este estudo.

Para avaliar quaisquer contaminações foram analisadas amostras branco e zero em duplicata, além de amostras branco de cada voluntário (amostras coletadas antes da administração do medicamento e analisadas sem a adição de PI).

As áreas de picos interferentes nos tempos de retenção do analito e do PI devem ser inferiores, respectivamente, a 20% da área do LIQ e 5% da área na concentração utilizada.

A linearidade da curva analítica, a precisão e exatidão do método foram avaliadas utilizando os seguintes critérios:

- o LIQ, deve ter desvio $\leq 20\%$ da concentração nominal declarada;
- todos os outros padrões não-zero devem ter desvio $\leq 15\%$ da concentração nominal declarada;
- no mínimo 4 entre 6 padrões não-zero devem atingir o critério descrito acima. Os pontos excluídos não podem ser consecutivos, nem extremos da curva, e a exclusão não pode alterar o modelo a ser utilizado;
- quando utilizadas replicatas das concentrações, no mínimo 67% de todas as réplicas devem apresentar desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal e menor ou igual a 20% para réplicas do LIQ. Não devem ser excluídas todas as réplicas de dois níveis de concentração consecutivos;

- o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 em todas as listas.

A concentração das amostras foi calculada utilizando como base de cálculo a curva analítica da corrida analítica. A função resposta utilizada para o método bioanalítico foi a relação entre a resposta do detector para as concentrações do analito e do PI. Amostras branco, zero e pontos com desvio acima dos critérios estabelecidos não foram utilizados para construção da curva analítica.

4.3.2 ETAPA ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no estudo de bioequivalência foram avaliados estatisticamente para a comparação das duas formulações em estudo.

A análise estatística dos resultados foi realizada conforme recomendado pela RE 1.170, de 19 de abril de 2006.

Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados (BRASIL, 2006a):

- área sob a curva de concentração sanguínea em função do tempo, calculada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao tempo t (ASC_{0-t}), onde t é o tempo relativo à última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação);
- área sob a curva de concentração sanguínea em função do tempo, calculada do tempo zero ao tempo infinito ($ASC_{0-\infty}$), onde $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + C_t/k$, onde C_t é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação) e k é a constante de eliminação da fase terminal.
- pico de concentração máxima (C_{max}) do fármaco e o tempo para atingir este pico (t_{max}) obtidos diretamente, sem interpolação dos dados;
- meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) do fármaco.

Para avaliação da bioequivalência foram empregados os parâmetros ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e C_{max} , como exigido pela RE 1.170, de 19 de abril de 2006. Todos os parâmetros farmacocinéticos e estatísticos foram determinados pelo programa *Phoenix WinNonlin*[®], incluindo os intervalos de confiança (IC) de 90% para os

parâmetros ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e C_{max} , poder do teste e coeficientes de variação intra e inter individuais para os parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e C_{max} transformados em logaritmos naturais; além de testes de Análise de Variância (ANOVA) para estes parâmetros farmacocinéticos, de acordo com o desenho *crossover* 2X2 padrão, para avaliação de efeitos de seqüência, de voluntários dentro da seqüência, de formulação e de período.

Dois produtos possuem a mesma biodisponibilidade se os intervalos de confiança 90%, considerado nível de significância (α) menor que 0,05, para as relações entre os valores de C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ de ambos, calculados com base nas transformações logarítmicas, estiverem entre 80 e 125%, ou seja:

$$80 \leq \frac{C_{max} (teste)}{C_{max} (referência)} \leq 125 \%$$

$$80 \leq \frac{ASC_{0-t} (teste)}{ASC_{0-t} (referência)} \leq 125 \%$$

$$80 \leq \frac{ASC_{0-\infty} (teste)}{ASC_{0-\infty} (referência)} \leq 125 \%$$

No qual:

C_{max} = concentração plasmática máxima;

ASC_{0-t} = área sob a curva de zero a t (tempo relativo à última concentração determinada experimentalmente);

$ASC_{0-\infty}$ = área sob a curva de zero a infinito.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e Validação do método bioanalítico para quantificação de sinvastatina em plasma humano

O método desenvolvido mostrou limites adequados para quantificação de sinvastatina em amostras de plasma provenientes de ensaio de bioequivalência.

Esta adequação foi comprovada por meio dos resultados referentes à validação do método, tais como, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, efeito matriz, precisão, exatidão e estabilidades (BRASIL, 2003a).

As figuras a seguir demonstram a determinação dos íons monitorados tanto de sinvastatina (FIGURA 4) quanto de lovastatina (FIGURA 5), cromatogramas de solução-padrão de analito e padrão interno na concentração do limite de quantificação superior (FIGURA 6), amostra branco extraída (FIGURA 7) e amostra na concentração de 0,4 ng/mL plasma (LIQ) (FIGURA 8), segundo o método desenvolvido.

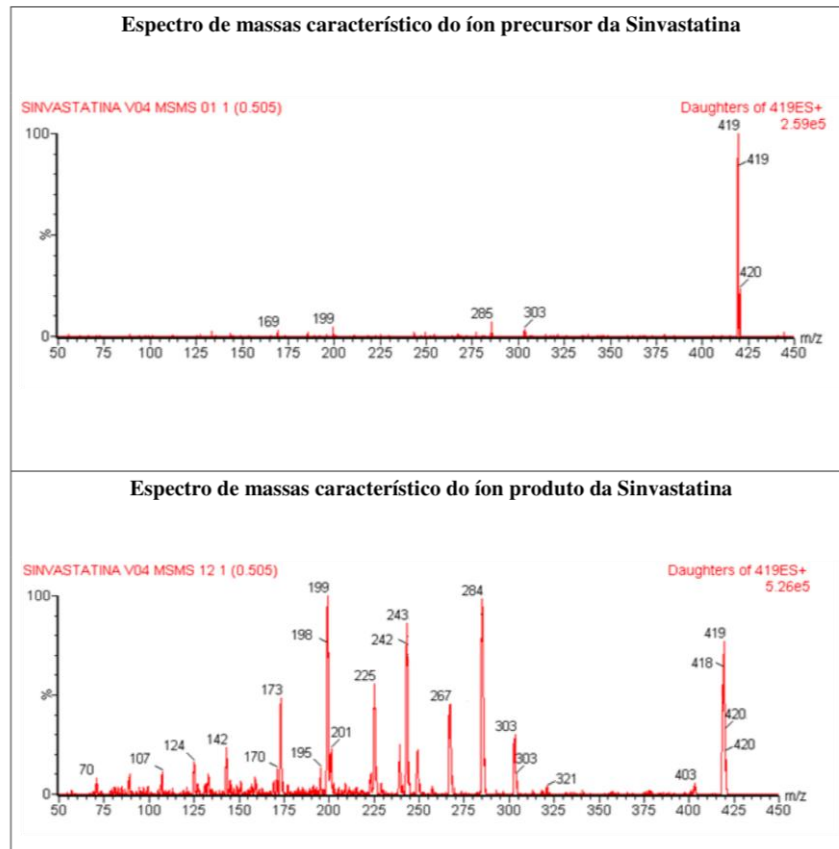


Figura 4 - Espectro de massas dos íons precursores e íons produtos da sinvastatina.

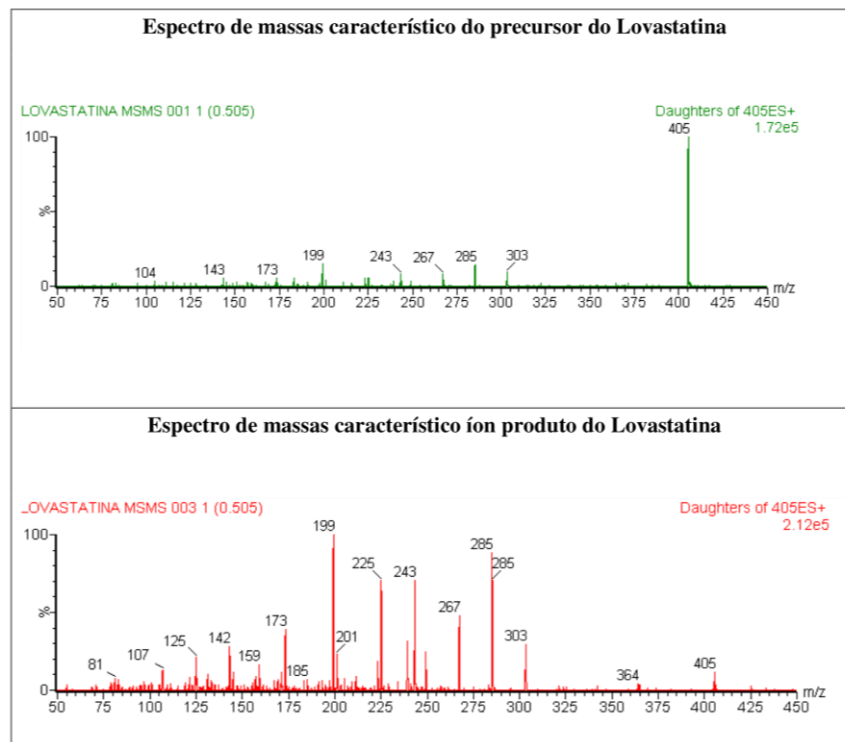


Figura 5 - Espectro de massas dos íons precursores e íons produtos da lovastatina.

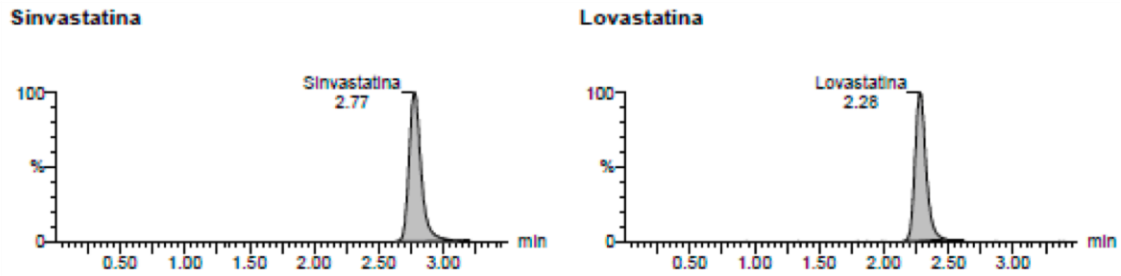


Figura 6 - Cromatogramas referentes a injeção de padrões de simvastatina e lovastatina nas concentrações de 40,0 ng/mL e 0,15 µg/mL, respectivamente.

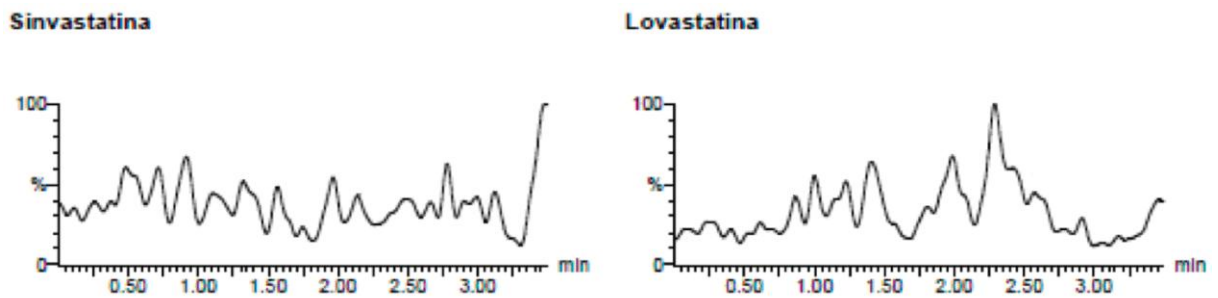


Figura 7 - Cromatogramas referentes a injeção de amostra branco extraída.

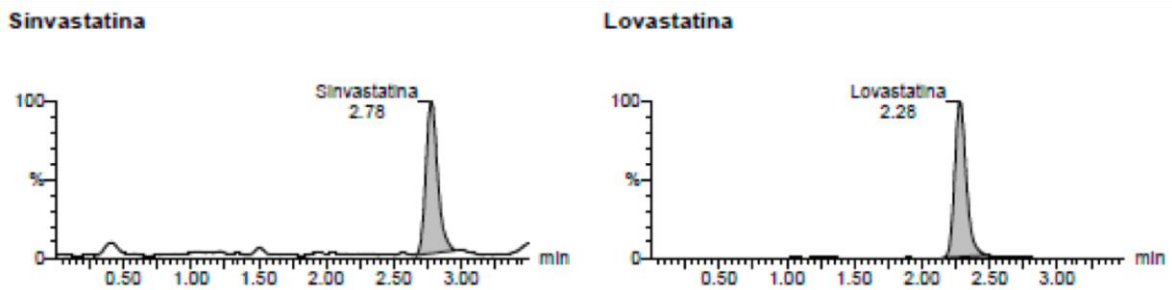


Figura 8 - Cromatogramas referentes a injeção de amostra extraída na concentração de 0,4 ng/mL.

5.1.1 SELETIVIDADE

Conforme os cromatogramas da Figura 9, não foi verificada a presença de picos interferentes nos tempos retenção do analito e do PI maiores que, respectivamente, a 20% da área do LIQ (extraído) e 5% da área do padrão interno na concentração utilizada, para os plasmas brancos normais, lipêmico e hemolisado.

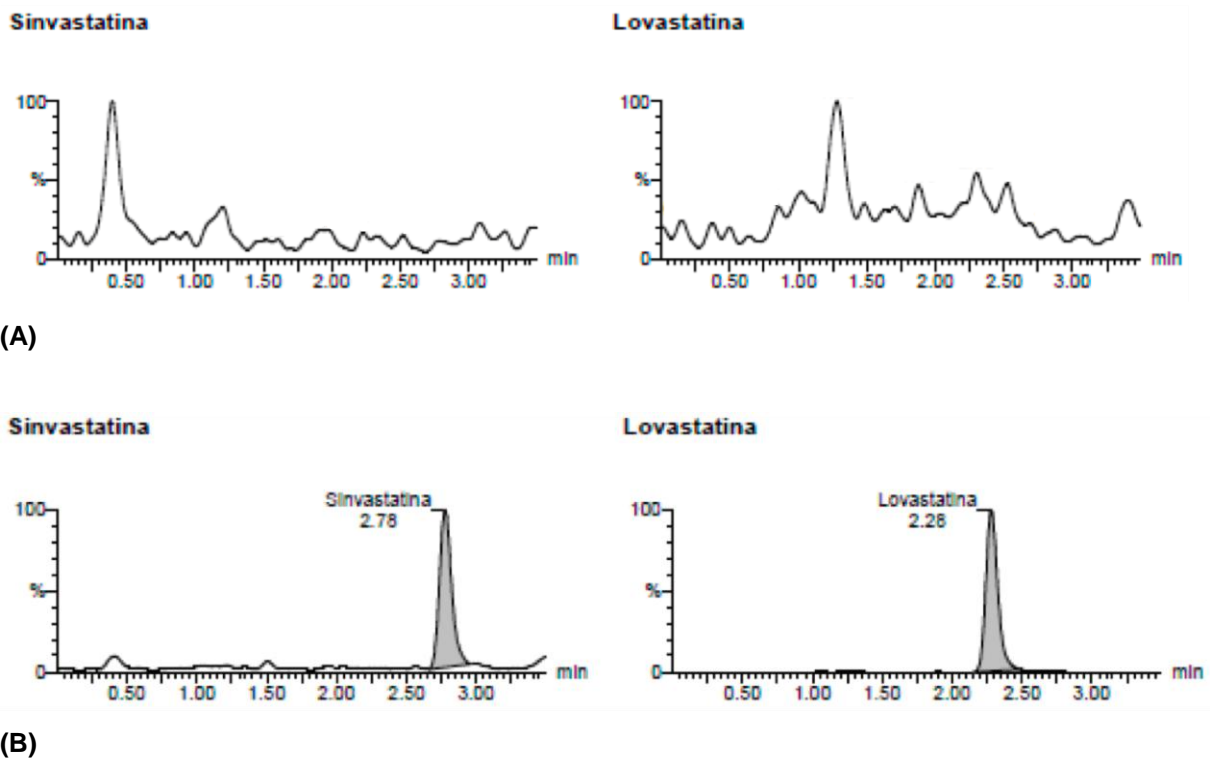


Figura 9 - Cromatogramas do teste de seletividade. (A) Amostra de *pool* de plasmas branco (B) Amostra de LIQ extraído.

5.1.2 LINEARIDADE

O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 0,4 a 40,0 ng/mL, com de coeficiente de correlação linear (r) de 0,99.

A curva analítica está representada na Figura 10 e os parâmetros relativos à curva analítica estão apresentados na Tabela 7.

Esta faixa de linearidade foi considerada adequada à aplicação do método aos estudos de bioequivalência e farmacocinética, pois a mesma abrangeu as concentrações obtidas nas amostras do estudo realizado.

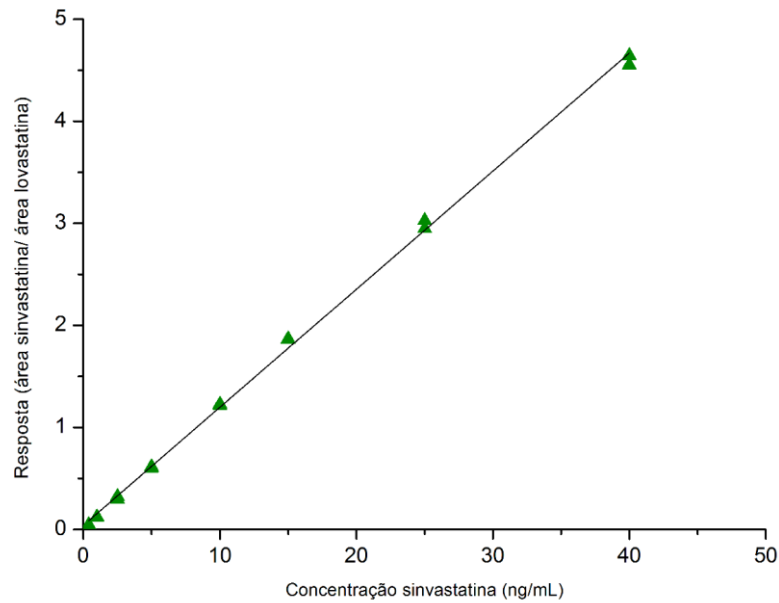


Figura 10 - Curva analítica Sinvastatina em plasma humano.

Tabela 7 - Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de sinvastatina em plasma por UPLC-MS/MS na faixa de concentração de 0,4 e 40,0 ng/mL.

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	0,121288
Coeficiente linear (b)	-5,02624E-05
Coeficiente de correlação linear (r)	0,998328

Para determinação da ponderação mais adequada ao método bioanalítico estudado foi utilizado o método de regressão dos mínimos quadrados. Avaliou-se com o gráfico de dispersão de resíduos, a amplitude dos desvios de exatidão nas concentrações mais baixas e as distribuições da amplitude dos desvios ao longo da faixa de trabalho (FIGURA 11).

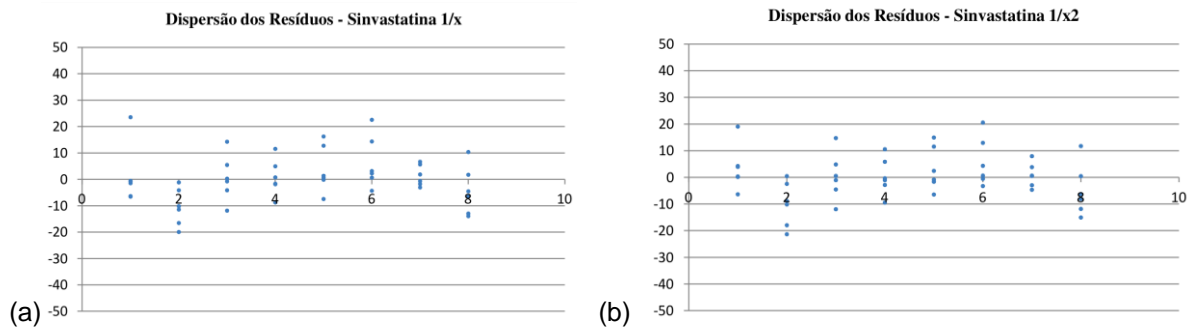


Figura 11 - Dispersão dos Resíduos para ponderação $1/x$ e $1/x^2$ respectivamente em (a) e (b).

A comparação entre os gráficos de dispersão dos resíduos permitiu concluir que a melhor ponderação a ser utilizada neste caso foi $1/x^2$, uma vez que a amplitude dos desvios, principalmente nas menores concentrações, foram mais baixas.

Observou-se, também, maior resíduo total das concentrações de sinvastatina nas curvas com ponderação $1/x$. A Tabela 8 exhibe o somatório dos valores absolutos de resíduo das curvas de calibração das listas de validação com ponderação $1/x$ e $1/x^2$.

Tabela 8 - Somatório absoluto dos resíduos das curvas analíticas com ponderação $1/x$ e $1/x^2$.

Ponderação	Valor
$1/x$	324,10
$1/x^2$	317,30

Concluiu-se que a ponderação mais adequada para a equação que relaciona a resposta do equipamento com a concentração do analito para quantificação de sinvastatina foi $1/x^2$.

Portanto, a melhor relação matemática que descreve o método bioanalítico para sinvastatina pode ser representada como:

$$y = mx + b \text{ (ponderação } 1/x^2 \text{) onde,}$$

y = relação entre a área do padrão de sinvastatina e a do padrão de lovastatina

m = coeficiente angular (inclinação da reta)

x = concentração analítica de sinvastatina;

b = intercepto

Todas as análises cromatográficas para a validação e quantificação das amostras do estudo de bioequivalência foram realizadas utilizando este modelo de regressão linear.

5.1.3 LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO (LIQ)

O limite de quantificação do fármaco é um parâmetro de elevada importância, tendo em vista que no estudo de bioequivalência foi administrada dose única (40 mg sinvastatina) a cada voluntário em cada uma das fases, resultando em baixas concentrações plasmáticas do fármaco, por motivos já discutidos neste trabalho, especialmente nas amostras relativas aos últimos tempos de coleta.

O método desenvolvido mostrou-se adequado, pois apresentou seletividade e detectabilidade adequadas à aplicação para os estudos de farmacocinética, biodisponibilidade e bioequivalência, contemplando a quantificação de todos os pontos de eliminação plasmática delineados pelo estudo (amostras coletadas até um tempo superior a 3-5 meias-vidas do fármaco). A quantificação do fármaco com precisão e exatidão adequadas é imprescindível para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção e eliminação do fármaco.

Os valores médios para o limite de quantificação do método de 0,4 ng/mL foram de 12,3% e 103,3% para a precisão e a exatidão, respectivamente.

5.1.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção calculado para o método foi 0,23 ng/mL, que foi adequado para a realização deste estudo.

5.1.5 RECUPERAÇÃO

As amostras foram purificadas por um processo simples de extração líquido - líquido, utilizando MTBE como solvente extrator, o que possibilitou boa recuperação para sinvastatina e lovastatina em relação aos outros solventes.

Nos trabalhos publicados por Yang et al. (2005), Barret et al. (2006) e Nováková et al. (2009) é utilizada a técnica de extração em fase sólida, que apesar de gerar bons resultados de recuperação, não é um método de escolha neste tipo de estudo, devido ao grande número de amostras.

No desenvolvimento do método, outros solventes orgânicos foram utilizados em testes de recuperação, como por exemplo, o acetato de etila e diclorometano, porém os resultados foram inferiores ao obtido com MTBE e tempo da secagem do solvente orgânico era muito maior.

A recuperação média com o MTBE foi de 82,9% para a sinvastatina (TABELA 9) e de 82,1% para a lovastatina, com precisão e exatidão dentro dos limites especificados pela ANVISA, o que indicou que o procedimento de extração descrito para o método bioanalítico apresentou eficiência adequada.

Tabela 9 - Recuperação do procedimento de purificação das amostras de plasma para sinvastatina.

Amostra	CQB	CQM	CQA
	1,2 ng/mL	12 ng/mL	30,0 ng/mL
CV (%)	12,75	12,40	1,41
Recuperação (%)	93,04	79,13	76,39

5.1.6 EFEITO MATRIZ

Como se pode observar na Figura 12, em vermelho está representado uma corrida cromatográfica de padrões de sinvastatina e lovastatina para observação dos tempos de retenção; em verde está representado o sinal produzido com infusão

contínua direta dos padrões no MS/MS e análise cromatográfica concomitante de branco extraído.

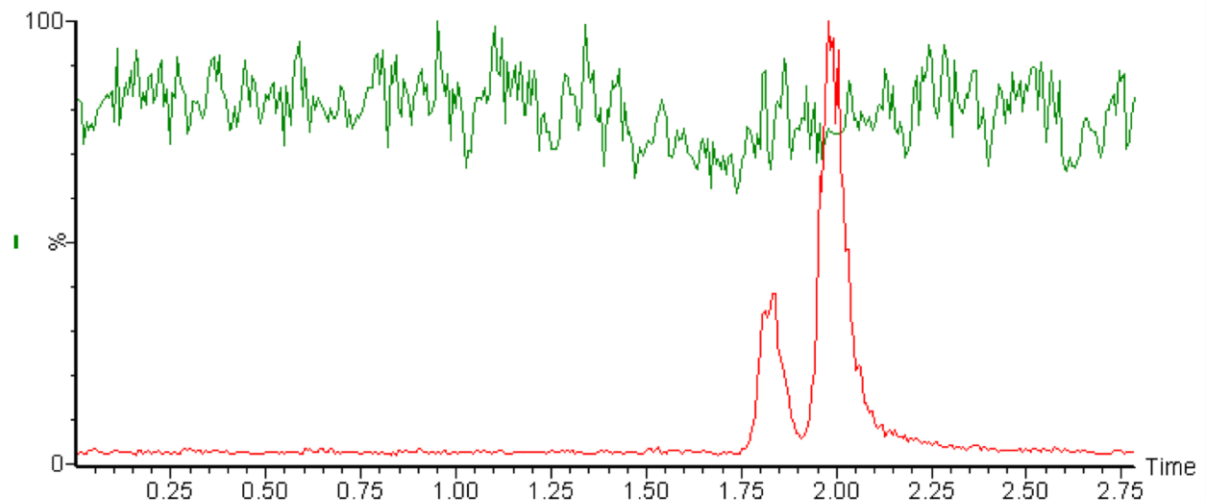


Figura 12 - Teste de Efeito Matriz pelo método de infusão pós-coluna. A aquisição em verde representa análise cromatográfica de amostra branco extraída com a infusão dos padrões concomitante e aquisição em vermelho representa uma análise cromatográfica de lovastatina e sinvastatina, respectivamente.

A partir da figura apresentada concluiu-se que não houve efeito de supressão nem indução iônica significativo nos tempos de retenção dos analitos.

Outra maneira de detectar o efeito matriz seria o método de dopagem pós-extração: as respostas obtidas para as amostras cujos analitos de interesse são adicionados pós-extração são comparadas com as soluções preparadas na fase móvel, sob as mesmas condições. A diferença da resposta entre a amostra pós-extração e a solução em solvente determina o grau do efeito matriz (CASSIANO et al., 2009).

Optou-se por testar o efeito matriz pelo método de infusão pós-coluna pois ao detectar alguma supressão ou indução iônica ao redor dos tempos de retenção dos analitos de interesse, já no desenvolvimento do método se poderia modificar o método cromatográfico otimizando estas condições; enquanto que ao realizar o método de dopagem pós-extração apenas se quantifica a intensidade deste efeito matriz no tempo exato de retenção dos analitos; dificultando uma otimização necessária caso o efeito matriz estivesse presente.

5.1.7 PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão do método analítico variou entre 4,54 e 8,68% para as amostras analisadas na mesma corrida (intra-corrida) e entre 7,29 e 7,86% para as amostras analisadas em corridas diferentes (inter-corridas).

A exatidão do método analítico variou entre 93,3 e 108,1% para as amostras analisadas na mesma corrida (intra-corrida) e entre 98,7 e 102,7% para as amostras analisadas em corridas diferentes (inter-corridas). Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Precisão e exatidão intra-corrida e inter-corridas referentes ao método analítico para quantificação de sinvastatina em amostras de plasma por UPLC-MS/MS.

Concentração	CQB 1,2 ng/mL			CQM 12,0 ng/mL			CQA 30,0 ng/mL		
Média Intra-corrida (ng/mL)	1,24	1,26	1,13	12,97	12,48	11,64	31,32	30,08	27,99
Precisão Intra-corrida (CV%)	6,11	6,31	4,54	4,75	6,24	8,68	7,26	5,27	6,02
Exatidão Intra-corrida (%)	103,5	104,9	94,2	108,1	104,0	97,0	104,4	100,3	93,3
Média Inter-corridas (ng/mL)	1,21			12,32			29,61		
Precisão Inter-corridas (CV%)	7,29			7,86			7,54		
Exatidão Inter-corridas (%)	100,6			102,7			98,7		

Os resultados de exatidão e precisão estão de acordo com os desvios aceitos pela agência regulatória (inferiores a 15%) (BRASIL, 2003a).

5.1.8 TESTES DE ESTABILIDADE

5.1.8.1 Estabilidade de Curta Duração

A estabilidade de curta duração foi avaliada mantendo-se amostras de plasma de controle de qualidade, em duas concentrações, descongeladas e mantidas à temperatura ambiente por 19 horas. Após este período estas amostras foram processadas e analisadas imediatamente. Os resultados foram comparados com os de amostras recém-preparadas (RP) e analisadas em seguida.

As amostras mostraram-se estáveis com desvios de 1,77% para concentração baixa e -0,04% para concentração alta (TABELA 11).

Tabela 11 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade do sinvastatina em amostras analisadas após manutenção a temperatura ambiente por 19 horas.

Tipo de amostra	CQB RP	CQB 19h	CQA RP	CQA 19h
	1,20 ng/mL	1,20 ng/mL	30,00 ng/mL	30,00 ng/mL
Média	1,13	1,15	28,30	28,28
CV (%)	5,33	7,45	2,29	2,17
Variação (%)		1,77		-0,04

5.1.8.2 Estabilidade de Longa Duração

As amostras de plasma de controle de qualidade preparadas com a adição de sinvastatina, mantiveram-se estáveis por, pelo menos, 90 dias, mostrando desvios de - 3,31 e - 5,46% para CQB e CQA respectivamente.

As amostras foram processadas após 90 dias de armazenamento em freezer a -20 °C e analisadas imediatamente.

Os resultados foram comparados com os de amostras recém-preparadas, sendo aceitos desvios entre $\pm 15\%$ (TABELA 12).

Tabela 12 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade do sinvastatina em amostras de plasma de controle de qualidade, analisadas logo após o preparo e mantidas a -20 °C por 90 dias.

Tipo de amostra	CQB RP	CQB 90 dias	CQA RP	CQA 90 dias
	1,2 ng/mL	1,2 ng/mL	30,0 ng/mL	30,0 ng/mL
Média	1,15	1,11	30,16	28,52
CV (%)	4,58	5,80	3,82	1,43
Varição (%)		-3,31		-5,46

5.1.8.3 Estabilidade de Pós-Processamento

A estabilidade do analito e do PI foi avaliada após processamento dos CQs e armazenamento à temperatura de 5°C por um período equivalente a 73 horas.

Como pode se observar na Tabela 13, as amostras se apresentaram estáveis no tempo avaliado com desvios menores que 15%.

Tabela 13 - Resultados referente a estudo de estabilidade do sinvastatina em amostras de plasma analisadas 73 horas após o procedimento de purificação.

Tipo de amostra	CQB RP	CQB 73h	CQA RP	CQA 73h
	1,2 ng/mL	1,2 ng/mL	30,0 ng/mL	30,0 ng/mL
Média	1,27	1,31	27,85	31,85
CV (%)	12,9	6,2	8,4	6,2
Varição (%)		4,3		14,3

5.1.8.4 Estabilidade de Ciclos de Congelamento e Descongelo

As amostras de controle de qualidade foram analisadas e mantiveram-se estáveis à -20 °C por três ciclos de congelamento e descongelamento.

Os resultados obtidos foram comparados com as amostras de controle de

qualidade recém-preparadas e analisadas imediatamente, sendo aceitos desvios entre $\pm 15\%$, e estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade do sinvastatina em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.

Tipo de amostra	CQB RP	CQB 3 ^o ciclo	CQA RP	CQA 3 ^o ciclo
	1,2 ng/mL	1,2 ng/mL	30,0 ng/mL	30,0 ng/mL
Média	1,13	1,07	28,30	32,32
CV (%)	5,33	9,16	2,29	2,82
Varição (%)		-5,3		14,2

5.1.8.5 Estabilidade de Soluções Padrão

A estabilidade das soluções-padrão do sinvastatina e da lovastatina foi determinada, e os resultados obtidos apresentaram-se dentro dos limites especificados de até 15% para o analito (TABELAS 15 e 17) e padrão interno (TABELAS 16 e 18).

Tabela 15 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade da solução de sinvastatina por 60 dias mantidas a temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tipo de amostra	CQB RP	CQB 60 dias	CQA RP	CQA 60 dias
	1,2 ng/mL	1,2 ng/mL	30,0 ng/mL	30,0 ng/mL
Média	7088	6262	131424	125310
CV (%)	13,46	1,31	1,76	3,33
Varição (%)		-11,65		-4,65

Tabela 16 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade da solução de lovastatina por 60 dias mantidas a temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tipo de amostra	PI RP	PI 60 dias
	0,15 $\mu\text{g/mL}$	0,15 $\mu\text{g/mL}$
Média	58533	60409
CV (%)	1,92	2,98
Varição (%)		3,21

Tabela 17 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade da solução de sinvastatina por 18 horas mantidas a temperatura ambiente.

Tipo de amostra	CQB RP	CQB 18 horas	CQA RP	CQA 18 horas
	1,2 ng/mL	1,2 ng/mL	30,0 ng/mL	30,0 ng/mL
Média	7088	7521	131424	124199
CV (%)	13,46	1,82	1,76	3,11
Variação (%)		6,11		-5,5

Tabela 18 - Resultados referentes ao estudo de estabilidade da solução de lovastatina por 18 horas mantidas a temperatura ambiente.

Tipo de amostra	PI RP	PI 18 horas
	0,15 µg/mL	0,15 µg/mL
Média	56084	64480
CV (%)	1,93	1,11
Variação (%)		14,97

As soluções-padrão de sinvastatina e lovastatina mantiveram-se estáveis por um período equivalente a 60 dias sob refrigeração (5°C) e por um tempo de 18 horas em temperatura ambiente.

5.2 Considerações finais sobre a metodologia desenvolvida

Na literatura estão apresentados alguns trabalhos que descrevem a quantificação de sinvastatina em plasma utilizando diferentes técnicas de extração e quantificação (TAKANO; ABE; HATA, 1990; OCHIAI et al., 1997; JEMAL; OUYANG; POWELL, 2000; NAJIB et al., 2003; YANG et al., 2005; BARRETT et al., 2006; APOSTOLOU et al., 2008; PATEL et al., 2008; NOVÁKOVÁ et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

Entretanto, os métodos descritos apresentam algumas desvantagens em relação ao tempo da corrida analítica, ao processo de extração que envolve inúmeras etapas, ou ao grande volume de solvente e/ou amostra utilizado. Todos estes aspectos dificultam a utilização desses métodos em ensaios de bioequivalência, uma vez que estes exigem um grande número de análises.

No presente trabalho, desenvolveu-se e validou-se um método de fácil implantação: tempo de corrida curto, preparo de amostras simples e rápido, baixo consumo de solventes e detectabilidade adequada para quantificação de sinvastatina em plasma humano através da cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) para aplicação no estudo de bioequivalência.

Esta adequação foi comprovada por meio dos resultados referentes à validação do método, tais como, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade; todos adequados a legislação vigente no país (BRASIL, 2003a).

Os resultados obtidos para as estabilidades destes analitos em plasma e em solução foram favoráveis para um estudo de bioequivalência; pois com estabilidades comprovadas por 19 horas de amostras em plasma a temperatura ambiente (curta duração), 90 dias em temperatura controlada de -20 °C (longa duração), 73 horas amostras processadas a 5 °C (pós-processamento), 3 degelos e soluções padrão estáveis por 18 horas a temperatura ambiente e 60 dias sob refrigeração de 5 °C, permite-se que se faça a quantificação das amostras provenientes dos voluntários do estudo de bioequivalência com grande segurança devido ao grande intervalo de tempo no qual se assegurou estabilidade. Inúmeras intercorrências que possam acontecer durante o processamento das amostras dos voluntários, serão sanadas, sem prejuízo às análises.

A detecção da sinvastatina é realizada, na maioria dos trabalhos de farmacocinética, empregando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) em detrimento aos detectores convencionais (ultravioleta e fluorescência). Devido à baixa concentração plasmática da sinvastatina, estes últimos exigiriam um preparo de amostras mais complexo e resultariam em corridas mais longas.

A escolha das massas a serem monitoradas pelo equipamento, no modo MRM, foi realizada durante a aquisição do espectro de massas do analito e do padrão interno. Selecionou-se a massa mais abundante de cada analito e monitorou-se nas formas protonadas devido a escolha do modo positivo de ionização. As transições iônicas utilizadas foram 419,3 → 199,0 para sinvastatina e 405,0 → 199,0 para o padrão interno. Lembrando que este tipo de análise é altamente seletiva quanto a

razão massa / carga dos analitos, portanto não houve interferência da sinvastatina ácida nesta quantificação, pois sua massa molecular é diferente das massas encontradas para os analitos estudados (sinvastatina ácida: 437,5 → 303,3 (JEMAL; OUYANG; POWELL, 2000; PATEL et al., 2008)).

As amostras biológicas obtidas dos voluntários e destinadas aos estudos de bioequivalência / biodisponibilidade relativa devem passar por um tratamento prévio à sua análise no cromatógrafo. As principais razões que justificam tais procedimentos são: a conhecida complexidade das matrizes biológicas, a existência de proteínas incompatíveis com as colunas cromatográficas e a baixa concentração das substâncias a serem analisadas. O objetivo do pré-tratamento é uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (QUEIROZ; COLLINS; JARDIN, 2001).

Uma consideração importante é a escolha da utilização de padrão externo ou interno. O padrão externo é utilizado em comparação com a resposta do analito e uma reta de calibração é gerada a partir dessa resposta do padrão externo. Sempre que possível, utiliza-se padrão interno nos estudos de bioequivalência / biodisponibilidade relativa, com molécula de estrutura semelhante ao analito. O padrão interno é adicionado nas etapas de pré-tratamento das amostras e os resultados da análise do padrão interno são utilizados para estabelecer uma razão entre a resposta do analito e a do padrão interno, possibilitando, assim, minimizar os erros decorrentes de possíveis perdas durante o preparo das amostras (CAUSON, 1997). Neste trabalho, utilizou-se lovastatina como padrão interno que apresentou-se adequado por causa da seletividade e precisão no método desenvolvido.

No presente trabalho, a fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila e tampão acetato, na concentração de 2,0 mmol/L, acrescido de 0,025% de ácido fórmico na proporção de 70:30, v/v. O fluxo foi de 1,0 mL/minuto, utilizando um *splitter* na razão 1:4 (MS/MS : descarte). Este fluxo foi utilizado para diminuir o tempo de retenção dos analitos e por consequência o tempo total da corrida analítica, contando com a razão do *splitter*, que garantiu boa dessolvatação da fase móvel na fonte e diminuiu a entrada de interferentes no espectrômetro de massas.

Os resultados obtidos após a avaliação dos parâmetros de validação demonstram que o método desenvolvido rápido e prático, apresentou-se específico, sensível, preciso e exato, justificando sua aplicação em estudos de bioequivalência

e farmacocinética.

5.3 Etapa Clínica do estudo de Bioequivalência

De forma a atender o que determina a ANVISA (pelo menos 24 voluntários) e como prevenção de eventuais desistências e de acordo com a variabilidade observada em estudos anteriores de bioequivalência, através de utilização de *software* já citado, foi planejado o recrutamento de 44 voluntários (22 de cada sexo) para a avaliação da biodisponibilidade entre os medicamentos teste e referência. Os voluntários 25, 26 e 41 informaram que não teriam disponibilidade para a internação na data proposta, sendo assim, excluídos do estudo. As análises foram realizadas para os 41 voluntários que completaram o estudo.

5.4 Etapa Analítica do estudo de Bioequivalência

O produto teste e o produto referência são considerados equivalentes farmacêuticos, por conterem o mesmo fármaco, na mesma dosagem e forma farmacêutica, com qualidade assegurada, cumprindo as especificações farmacopeicas. Ainda assim, esta classificação não atesta a intercambiabilidade entre estes medicamentos, sendo necessária a realização do estudo de bioequivalência (*in vivo*) para que se obtenham conclusões definitivas sobre a biodisponibilidade dos produtos em estudo, e se aprovado, a possibilidade de registro do produto teste como genérico ou similar.

O ensaio de biodisponibilidade relativa / bioequivalência entre os produtos teste e referência, foi realizado por meio de um estudo quantitativo direto, com delineamento aberto, aleatório e cruzado, no qual todos os voluntários receberam ambos os medicamentos avaliados, em duas fases distintas (Fase I e Fase II).

A análise concomitante das amostras de controle de qualidade e das amostras de plasma branco durante a quantificação de sinvastatina plasmática dos voluntários garantiu a qualidade dos resultados durante todo o procedimento analítico

empregado, já que serviram como base para aceitação ou rejeição das corridas analíticas.

Juntamente a todas as listas de voluntários analisadas foi processada e analisada uma curva analítica (em duplicata) recém-preparada, que foi o meio pelo qual as amostras com concentrações desconhecidas provenientes de cada corrida foram quantificadas.

A análise das amostras de voluntários foi realizada integralmente de acordo com as condições e período de tempo determinados nos estudos de estabilidade durante a validação do método bioanalítico.

Todas as amostras desconhecidas provenientes de um mesmo voluntário (Fase I e Fase II) foram processadas e analisadas em uma mesma corrida analítica. As amostras quantificadas que obtiveram concentrações abaixo do LIQ (0,4 ng/mL) foram consideradas como não-quantificável. Os cromatogramas foram integrados automaticamente pelo *software* MassLynx[®] versão 4.1., utilizando a integração dos picos base-a-base.

As concentrações plasmáticas médias de sinvastatina, após a administração do produto teste e referência aos 41 voluntários sadios, estão apresentados na Tabela 19. Os valores das concentrações individuais estão apresentados no ANEXO D.

Tabela 19 - Concentrações plasmáticas médias da sinvastatina após a administração oral dos produtos teste e referência aos 41 voluntários sadios.

Tempo (horas)	Concentração Plasmática (ng/mL)					
	Produto Referência			Produto Teste		
	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
0,00	NQ	-	-	NQ	-	-
0,33	4,2033	4,8753	115,9866	1,7181	1,4567	84,7813
0,66	5,7900	4,4554	76,9508	3,3862	2,5962	76,6710
1,00	5,5727	3,9308	70,5373	3,7503	2,6735	71,2879
1,33	5,0780	3,0209	59,4903	3,6008	2,3312	64,7426
1,66	4,4271	3,0277	68,3901	3,0407	1,8746	61,6510
2,00	4,5371	3,9454	86,9581	2,8849	1,7379	60,2400
2,33	3,9898	3,5978	90,1756	2,6885	2,0225	75,2269
2,66	3,4344	2,4255	70,6253	2,4761	1,9704	79,5773
3,00	3,1266	2,1365	68,3319	2,4149	2,2301	92,3477
3,33	2,7788	2,1107	75,9594	2,2534	2,2111	98,1237
3,66	2,5432	1,7437	68,5654	2,2344	2,1283	95,2510
4,00	2,4080	2,2551	93,6497	2,5120	3,6335	144,6481
6,00	2,0188	1,0640	52,7081	1,9749	1,3376	67,7317
8,00	1,5003	0,9214	61,4183	1,4533	0,8660	59,5908
10,00	1,3742	0,9869	71,8181	1,5784	1,1931	75,5890
12,00	1,2384	0,7314	59,0581	1,3911	1,0247	73,6672
24,00	0,8683	0,4294	49,4495	1,1837	0,6137	51,8490

DP= desvio padrão. CV (%)= coeficiente de variação. NQ= não quantificável.

As curvas médias de concentrações plasmáticas em função do tempo, referente aos produtos teste e referência estão representadas na Figura 13. As curvas individuais estão apresentadas no ANEXO E.

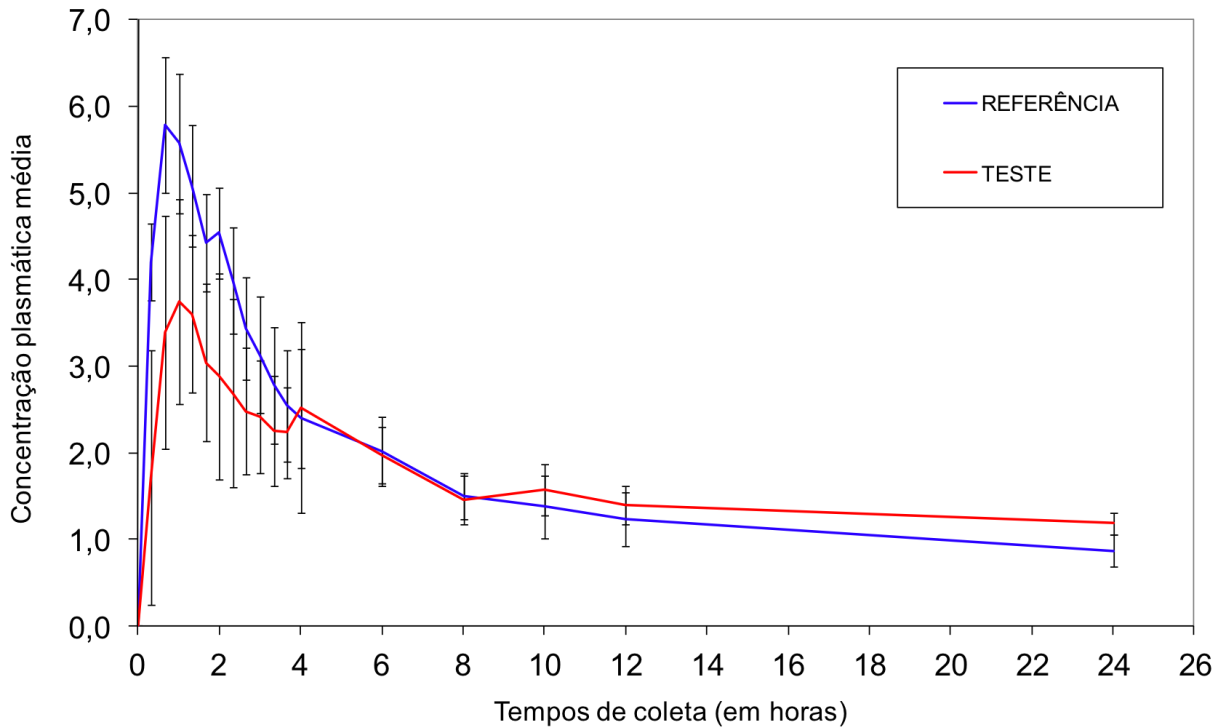


Figura 13 - Curvas médias de concentrações plasmáticas em função do tempo após a administração oral dos produtos teste e referência aos 41 voluntários sadios. (As barras verticais representam o erro padrão da média).

Os dados de concentração versus tempo dos 41 voluntários foram empregados na análise estatística, a qual foi conduzida de acordo com a RE 898, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003d).

5.5 Etapa Estatística do estudo de Bioequivalência

5.5.1 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

As Tabelas 20 e 21 apresentam as médias dos parâmetros farmacocinéticos referentes à fase de absorção (C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e $ASC_{0-t} / ASC_{0-\infty}$) obtidos após a administração oral dos produtos teste e referência, respectivamente, aos 41 voluntários sadios.

Tabela 20 - Parâmetros farmacocinéticos referentes à absorção oral do produto teste.

Voluntário	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	ASC_{0-t} (h.ng/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (h.ng/mL)	$ASC_{0-t} /$ $ASC_{0-\infty}$ (%)
1	7,39	0,66	10,37	100,73	136,79	73,64
2	4,02	2,00	16,40	36,05	66,11	54,54
3	4,96	1,66	23,86	52,49	101,01	51,96
4	6,95	1,00	33,35	60,08	138,02	43,53
5	12,76	0,66	20,83	46,14	77,69	59,39
6	2,79	3,66	28,23	19,63	48,95	40,10
7	5,89	1,00	12,31	25,46	32,57	78,19
8	3,85	1,66	5,99	12,11	16,52	73,33
9	5,33	1,00	27,82	62,36	143,85	43,35
10	4,64	6,00	14,83	34,29	52,26	65,61
11	8,80	1,33	17,36	53,81	80,35	66,97
12	1,88	1,00	3,45	6,68	8,82	75,73
13	2,92	2,00	43,20	32,75	108,79	30,11
14	20,65	4,00	2,37	49,71	51,65	96,23
15	5,17	0,66	3,54	14,52	17,58	82,56
16	11,16	1,00	23,89	23,93	46,33	51,65
17	4,11	12,00	RNA	60,05	RNA	RNA
18	3,16	1,00	7,86	25,37	30,14	84,19
19	3,10	0,66	RNA	27,24	RNA	RNA
20	3,89	3,00	127,45	53,84	482,26	11,16
21	5,21	1,33	9,01	24,50	33,21	73,77
22	2,95	0,66	10,14	9,02	15,75	57,27
23	5,16	0,66	45,28	33,31	82,30	40,47
24*	7,37	1,00	6,55	33,70	40,60	83,01
25*	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	4,32	0,66	4,67	8,21	11,58	70,92
28	4,27	0,66	3,37	17,49	19,82	88,24
29	4,84	1,00	16,94	42,87	70,97	60,41
30	4,28	2,66	3,71	13,83	16,45	84,08
31	7,78	1,33	6,98	23,43	27,56	85,02
32	2,39	1,00	9,25	24,88	31,42	79,19
33	8,72	4,00	14,76	45,31	63,40	71,46
34	3,05	4,00	2,88	19,24	21,36	90,07
35	7,53	1,00	21,17	57,51	126,54	45,45
36	4,34	0,66	21,64	28,16	53,13	53,00
37	2,35	1,66	14,84	21,83	31,68	68,90
38	3,31	10,00	RNA	59,05	RNA	RNA
39	2,16	10,00	RNA	35,28	RNA	RNA
40	8,22	0,66	7,35	51,42	59,16	86,91
41*	-	-	-	-	-	-
42	14,81	3,33	10,37	61,09	67,97	89,88
43	6,35	1,33	8,73	39,60	52,45	75,50
44	4,85	1,33	24,18	33,84	82,32	41,11
Média	5,80	2,31	17,97	36,12	68,85	65,59
DP	3,71	2,69	21,42	19,48	79,31	19,61
CV (%)	0,64	1,16	1,19	0,54	1,15	0,30

Tabela 21 - Parâmetros farmacocinéticos referentes à absorção oral do produto referência.

Voluntário	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	ASC _{0-t} (h.ng/mL)	ASC _{0-∞} (h.ng/mL)	ASC _{0-t} / ASC _{0-∞} (%)
1	17,42	0,66	9,72	75,24	90,09	83,51
2	3,68	2,33	36,87	24,41	56,87	42,93
3	8,36	0,66	3,79	22,02	25,25	87,21
4	19,32	2,00	11,39	92,05	120,32	76,50
5	19,36	0,33	6,52	48,88	58,67	83,32
6	4,50	1,33	4,25	14,29	16,93	84,44
7	19,32	2,33	2,72	31,37	33,49	93,68
8	5,84	1,33	10,05	35,92	45,20	79,48
9	6,97	3,00	19,67	58,95	99,24	59,40
10	4,42	0,66	10,95	30,21	39,21	77,04
11	10,35	0,66	8,53	63,85	72,23	88,41
12	3,77	0,66	1,65	8,52	9,52	89,52
13	16,22	0,66	10,37	50,42	59,54	84,68
14	13,80	4,00	1,78	27,70	28,86	96,00
15	7,93	0,66	27,80	32,94	57,81	56,98
16	7,94	3,33	2,02	35,19	36,50	96,41
17	5,79	2,66	10,52	59,46	77,98	76,25
18	9,21	1,00	11,51	64,06	82,49	77,66
19	3,85	0,33	11,85	24,83	33,38	74,39
20	10,92	0,66	28,48	57,29	119,33	48,01
21	3,90	1,00	11,16	29,68	39,50	75,13
22	7,02	0,66	1,13	7,42	8,18	90,67
23	4,28	0,66	9,09	33,77	41,25	81,87
24	9,38	2,00	2,41	27,88	29,31	95,13
25*	-	-	-	-	-	-
26*	-	-	-	-	-	-
27	5,68	0,66	5,16	15,92	19,20	82,92
28	9,07	0,66	6,64	21,13	27,64	76,44
29	7,67	1,00	14,94	29,49	38,55	76,51
30	17,81	1,66	5,04	33,59	36,86	91,12
31	9,59	0,66	3,94	28,41	31,59	89,93
32	9,57	1,00	3,42	19,98	22,34	89,41
33	9,29	3,00	3,53	36,39	41,13	88,47
34	5,22	1,00	2,27	11,86	14,93	79,42
35	16,68	1,00	8,95	46,57	55,74	83,55
36	6,14	1,00	6,47	13,03	17,42	74,83
37	6,21	0,66	1,81	13,08	14,36	91,09
38	2,81	0,66	72,80	41,79	244,49	17,09
39	3,34	2,00	10,11	39,90	49,68	80,32
40	4,12	6,00	6,14	49,26	54,13	91,00
41*	-	-	-	-	-	-
42	16,95	0,33	2,16	33,20	34,79	95,43
43	5,54	0,66	10,66	26,84	38,84	69,12
44	11,39	0,66	10,79	38,41	44,95	85,45
Média	9,04	1,37	10,46	35,49	50,43	79,53
DP	5,07	1,17	12,57	18,66	41,28	15,67
CV (%)	0,56	0,86	1,20	0,53	0,82	0,20

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; * Não participou do estudo.

As curvas de decaimento plasmático dos produtos referência e teste foram utilizadas para determinação dos parâmetros farmacocinéticos e os seguintes valores médios foram obtidos: C_{max} (referência: 9,04 ng/mL; teste: 5,80 ng/mL); t_{max} (referência: 1,37 h; teste: 2,31 h); ASC_{0-t} (referência: 35,49 ng.h/mL; teste: 36,12 ng.h/mL) e $ASC_{0-\infty}$ (referência: 50,43 ng.h/mL; teste: 68,85 ng.h/mL).

Os resultados obtidos neste trabalho foram similares com os previamente reportados por Tseng e colaboradores (2007) que obteve valores médios de ASC_{0-t} de 36,5 ng.h/mL após a administração de 40 mg de sinvastatina referência. Ressalta-se que existem vários estudos de bioequivalência de sinvastatina na literatura e o parâmetro ASC_{0-t} varia muito, na mesma dose de 40 mg do mesmo medicamento referência, sendo observados valores como 10,63; 56,88; 78,34 ng.h/mL (NAJIB et al., 2003; PATEL et al., 2008; MURALIDHARAN et al., 2009).

A sinvastatina é metabolizada majoritariamente pela isoforma CYP3A4, com expressão polimórfica na população. Esta isoforma sofre inibição de vários medicamentos como antifúngicos, antibióticos macrolídeos e alguns antidepressivos (CORSINI et al., 1999). Certos alimentos, como a toranja ou seu suco, aumentam de maneira considerável a biodisponibilidade de fármacos metabolizados pelo CYP3A4, ingeridos por via oral, por inibirem esta isoforma (TASSANEEYAKUL et al., 2000).

Desta maneira, sendo o CYP3A4 inibido por medicamentos ou até mesmo alimentos, Lamba et al. (2002) determinaram o *clearance* oral do midazolam, fármaco marcador de atividade desta isoforma, em 148 voluntários e observaram valores entre 10 e 40 mL/min/kg em 84% dos pacientes investigados, no entanto a variabilidade total foi da ordem de 48 vezes.

Estes fatores podem explicar a grande variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos nos diferentes estudos de bioequivalência de sinvastatina na dose de 40 mg, quando comparamos formulações referência (Zocor[®]).

5.5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As Tabelas 22, 23 e 24 apresentam, respectivamente, os resultados de ANOVA para C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, incluindo fonte de variação, grau de liberdade, soma dos

quadrados, quadrado médio, valor de estatística F e resíduo.

Tabela 22 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro C_{max} , transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos referência e teste a 41 voluntários sadios.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Inter-individual					
Residual (Sequência)	1	0,0145	0,0145	0,0317	0,8596
Resíduos (inter)	39	17,8238	0,4570	3,6903	< 0,0001
Intra-individual					
Formulação	1	4,1506	4,1506	33,5148	< 0,0001
Período	1	0,9336	0,9336	7,5383	0,0091
Resíduos (intra)	39	4,8300	0,1238		
Total	81	27,7525			

F = valor da estatística do teste F da análise de variância;

p = probabilidade de significância, ou nível descritivo do teste, ou ainda valor- p .

Tabela 23 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro ASC_{0-t} , transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos referência e teste a 41 voluntários sadios.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Inter-individual					
Residual (Sequência)	1	0,0379	0,0379	0,0619	0,8048
Resíduos (inter)	39	23,8589	0,6118	6,0479	< 0,0001
Intra-individual					
Formulação	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,9989
Período	1	0,1966	0,1966	1,9440	0,1711
Resíduos (intra)	39	3,9450	0,1012		
Total	81	28,0384			

F = valor da estatística do teste F da análise de variância;

p = probabilidade de significância, ou nível descritivo do teste, ou ainda valor- p .

Tabela 24 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro $ASC_{0-\infty}$, transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos e teste a 41 voluntários sadios.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Inter-individual					
Residual (Sequência)	1	0,0144	0,0144	0,0145	0,9048
Resíduos (inter)	38	37,9070	0,9929	5,1437	< 0,0001
Intra-individual					
Formulação	1	1,0191	1,0191	5,2795	0,0276
Período	1	0,0716	0,0716	0,3709	0,5464
Resíduos (intra)	35	6,7558	0,1930		
Total	76	45,7679			

F = valor da estatística do teste F da análise de variância;

p = probabilidade de significância, ou nível descritivo do teste, ou ainda valor-p.

Por intermédio dos resultados apresentados na Tabela 22 referentes ao modelo ajustado para $\ln(C_{\max})$, o efeito de sequência não foi considerado significativo ($p = 0,8596$). O teste de variabilidade inter-indivíduos foi considerado significativo ($p < 0,0001$), resultado já esperado devido às diferenças entre os voluntários. Houve efeito de formulação ($p < 0,0001$) e houve efeito de período ($p = 0,0091$).

Por intermédio dos resultados apresentados na Tabela 23 referentes ao modelo ajustado para $\ln(ASC_{0-t})$, o efeito da sequência não foi considerado significativo ($p = 0,8048$). O teste de variabilidade inter-indivíduos foi considerado significativo ($p < 0,0001$), resultado já esperado devido às diferenças entre os voluntários. Não houve efeito de formulação ($p = 0,9989$) e nem efeito de período ($p = 0,1711$).

Através dos resultados apresentados na Tabela 24 referentes ao modelo ajustado para $\ln(ASC_{0-\infty})$, o efeito da sequência não foi considerado significativo ($p = 0,9048$). O teste de variabilidade inter-indivíduos foi considerado significativo ($p < 0,0001$), resultado já esperado devido às diferenças entre os voluntários. Houve efeito de formulação ($p = 0,0276$) e não houve efeito de período ($p = 0,5464$).

5.5.2.1 Poder do Teste e Intervalo de Confiança (IC 90%)

O poder do teste de um estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência é definido como a probabilidade de aceitar a bioequivalência entre produto teste e referência corretamente (BRASIL, 2003d).

O Intervalo de confiança 90% (IC 90%) é definido como um intervalo sobre o valor estimado que garante 90% de certeza que este intervalo contém o verdadeiro valor. A bioequivalência é confirmada quando IC 90% está dentro do intervalo de 80 a 125%. IC 90% para C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Intervalos de confiança 90% (IC 90 %) para as relações entre os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ obtidos após administração dos produtos teste e referência a 41 voluntários sadios.

Parâmetro	CV intra (%)	Poder do Teste (%)	Intervalo de confiança (90%)
C_{max}	36	> 87	55,93 – 72,68 %
ASC_{0-t}	33	> 92	88,82 – 112,56 %
$ASC_{0-\infty}$	46	> 68	106,40 – 150,17 %

CV intra (%) = coeficiente de variação intra-indivíduos

O poder do teste estatístico para os parâmetros C_{max} e ASC_{0-t} foram maiores que 80%, porém para $ASC_{0-\infty}$ foi menor.

Baseado nos resultados apresentados na Tabela 25, os valores de Intervalo de Confiança 90% para os parâmetros farmacocinéticos avaliados C_{max} e $ASC_{0-\infty}$ estão fora dos limites de 80% - 125%, portanto, mesmo que ASC_{0-t} encontra-se no IC 90% especificado, os produtos avaliados encontraram-se fora dos limites estabelecidos pela legislação vigente, demonstrando que os produtos não são considerados bioequivalentes.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- o método bioanalítico desenvolvido e validado para quantificação de sinvastatina em plasma humano demonstrou adequada detectabilidade, reprodutibilidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade, utilizando extração líquido - líquido simples e tempo de corrida curto, justificando a sua utilização em ensaios de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa.
- o produto teste não pode ser considerado bioequivalente ao produto referência, portanto não podem ser administrados de forma intercambiável pois não se garantiu a eficácia terapêutica deste produto teste.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science**, Amsterdam, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

APOSTOLOU, C. et al. An improved and fully validated LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 46, n. 4, p. 771-779, 2008.

ARAÚJO, L. U. et al. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v.28, n.6, p. 480-492, 2010.

BARRETT, B. et al. Validated HPLC–MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 41, n. 2, p. 517-526, 2006.

BRAGGIO, S. et al. A strategy for validation of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 14, n. 4, p. 375-388, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamentos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/medicamentos>>. Acesso em: 28 de Maio de 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta de Produtos Medicamentos**. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp>. Acesso em 25 set. 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de boas práticas em biodisponibilidade/bioequivalência. **Brasília**: ANVISA, 2002. 1v. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/publicacoes/index.asp>>. Acesso em: 12 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 133**, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamento similar e dá outras providências. 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 134**, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a adequação dos medicamentos já registrados. 2003c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 898**, de 29 de maio de 2003. Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. 2003d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE No 1.170**, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. [S.I.]: Diário Oficial da União, Brasília, 24 de abril de 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Analito para Estabelecimento da Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência - RE nº 1.170**, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. [S.I.]: Diário Oficial da União, Brasília, 24 de abril de 2006b. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/medicamentos/listas/lista2.htm>. Acesso em: 22 out. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 17**, de 02 de março de 2007. Regulamento técnico para medicamento similar. 2007.

CARLUCCI, G. et al. Simultaneous determination of simvastatin and its hydroxy acid form in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 10, n. 9, p. 693-697, 1992.

CAUSON, R. Validation of Chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 689, n.1, p.175-180, 1997.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHAMBERS, E. et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 852, n. 1, p. 22-34, 2007.

CORSINI, A. et al. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 413-428, 1999.

DING, M. J. et al. Pharmacokinetics and bioequivalence study of simvastatin orally disintegrating tablets in Chinese healthy volunteers by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 3, n. 2, p. 032-037, 2011.

DOMENIC, A. et al. Rhabdomyolysis and statin therapy: relevance to the elderly. **The American Journal of Geriatric Cardiology**, Greenwich, v. 11, n. 1, p. 48-55, 2002.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinética das estatinas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. São Paulo, v. 85, n. 5, p. 9-14, 2005.

JEMAL, M.; OUYANG, Z.; POWELL, M. L. Direct-injection LC-MS-MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 23, n. 2-3, p. 323-340, 2000.

LAMBA, J. K. et al. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 54, p. 1271-1294, 2002.

MURALIDHARAN, S. et al. Bioequivalence study of simvastatin. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, Sunnyvale, v. 1, n. 1, p. 028-032, 2009.

NAJIB, N.M. et al. Pharmacokinetics and Bioequivalence Evaluation of two simvastatin 40mg tablets (*Sinvast & Zocor*) in healthy human volunteers. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, Chichester, v. 24, n. 5, p. 183-189, 2003.

NOVÁKOVÁ, L.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatina. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 352-367, 2008.

NOVÁKOVÁ, L. et al. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatina. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 877, n. 22, p. 2093-2103, 2009.

OCHIAI, U. et al. Determination of simvastatin and its active metabolite in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with 1-bromoacetylpyrene. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 694, n. 1, p. 211-217, 1997.

PATEL, B. N. et al. Simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma by LC-MS/MS without polarity switch: Application to a bioequivalence study. **Separation Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 301-313, 2008.

PARFITT, K. **Martindale: the complete drug reference**. 32. ed. London: Pharmaceutical Press. 1999.

PORTA, V. **Avaliação da bioequivalência de formulações do mercado nacional contendo fluconazol**. 1999. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo, 1999.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIN, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

STORPIRTIS, S. et al. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, Brasília, v. 16, p. 51–56, 2004.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V. O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.31, n.2, p. 63-70, 1995.

TAKANO, T.; ABE, S.; HATA, S. A selected ion monitoring method for quantifying

simvastatin and its acid form in human plasma, using the ferroceneboronate derivative. **Biomedical and Environmental Mass Spectrometry**, Chichester, v. 19, n. 9, p. 577-581, 1990.

TASSANEEYAKUL, W. et al. Inhibition Selectivity of Grapefruit Juice Components on Human Cytochromes P450. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 378, n. 2, p. 356-363, 2000.

TSENG, C.M. et al. Bioequivalence assessment of two simvastatin tablets in healthy Taiwanese volunteers. **Journal of Food and Drug Analysis**, China, v. 15, n. 1, p. 15-19, 2007.

TUBIC-GROZDANIS, M. et al. Pharmacokinetics of the CYP 3A Substrate Simvastatin following Administration of Delayed Versus Immediate Release Oral Dosage Forms. **Pharmaceutical Research**, United States, v. 25, n. 7, p. 1591-1600, 2008.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, 2001.

YANG, A. Y. et al. Application of a novel ultra-low elution volume 96-well solid-phase extraction method to the LC/MS/MS determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 38, n. 3, p. 521-527, 2005.

YANG, H.; FENG, Y.; LUAN, Y. Determination of simvastatin in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.785, n. 2, p. 369- 375, 2003.

ZHANG, N. et al. Quantitative analysis of simvastatin and its β -hydroxy acid in human plasma using automated liquid–liquid extraction based on 96-well plate format and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 34, n. 1, p. 175-187, 2004.

ZHANG, J. et al. High-throughput salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile for the simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 661, n. 2, p. 167-172, 2010.

ZHAO, J. J.; YANG, A. Y.; ROGERS, J. D. Effects of liquid chromatography mobile phase buffer contents on the ionization and fragmentation of analytes in liquid chromatographic/ion spray tandem mass spectrometric determination. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 37, n. 4, p. 421-433, 2002.

ANEXO A



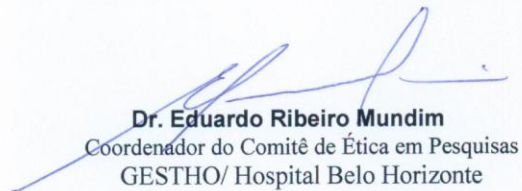
Belo Horizonte 19 de Outubro 2011.

Ao Sr. Dr. Marco Túlio Baccharini Pires,

Venho através desta, informar que o estudo: Referente ao protocolo CEP-HBH 58/2011 (CEBIO 28_2011) Versão inicial intitulado: **“Estudo de biodisponibilidade relativa, randomizado de duas preparações de Sinvastatina comprimidos revestidos 40 mg, Sinvaston® da Sanval Comércio e Indústria Ltda (Formulação teste) e Zocor® da Merck Sharp e Dohme (Formulação referência), em voluntários sadios, em jejum”**.

- Foi avaliado e aprovado por este comitê.

Atenciosamente,



Dr. Eduardo Ribeiro Mundim
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisas
GESTHO/ Hospital Belo Horizonte

ANEXO B

CEBIO – Centro de Pesquisa em Biotecnologia Ltda.
Protocolo CEBIO 28_2011

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto de Pesquisa:

“Estudo de biodisponibilidade relativa, randomizado, de duas preparações de Sinvastatina comprimidos revestidos 40 mg, Sinvaston® da Sanval Comércio e Indústria Ltda. (formulação Teste) e Zocor®, da Merck Sharp & Dohme (formulação Referência), em voluntários sadios, em jejum”.

Você está sendo convidado(a) a participar do Estudo comparativo de medicamento cujo Título se encontra acima. O estudo contará com a participação total de 44 (quarenta e quatro) voluntários. É importante que você leia e compreenda totalmente as informações fornecidas. Caso você não entenda alguma parte deste consentimento, pergunte ao seu médico ou médico do CEBIO antes de assiná-lo. Sua participação neste Estudo é totalmente voluntária (a escolha é sua). O estudo terá a Supervisão dos Médicos Dr. Marco Túlio Baccharini Pires e Dr. Thiago Horta Soares. Endereço do CEBIO: Av. José Cândido da Silveira, 2100, sala 35, bairro Horto Florestal. Telefone: 31- 3241-3458. O abaixo assinado:

Eu, _____, _____ anos, (nome completo e legível- letra de forma) CPF _____ declaro que é de livre e espontânea vontade que estou participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade dos médicos/ pesquisadores Dr. Marco Túlio Baccharini Pires e Dr. Thiago Horta Soares do CEBIO – Centro de Pesquisa em Biotecnologia Ltda. Estou ciente que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar se a preparação de Sinvastatina 40 mg da Sanval Comércio e Indústria Ltda.– Formulação Teste (Sinvaston®) - atinge níveis no sangue equivalentes à Sinvastatina 40 mg da da Merck Sharp & Dohme (Zocor®) - Formulação Referência. Você receberá 1 comprimido de cada um dos medicamentos em quantidade igual a 40 mg de Sinvastatina em uma ocasião diferente (duas etapas do estudo). A ordem em que você tomará cada medicação (Formulação Teste ou Formulação Referência) obedecerá a um sorteio feito por computador, obedecendo a parâmetros técnicos, tais como peso, idade e sexo. Este procedimento é denominado aleatorização ou randomização, e visa o estabelecimento de grupos homogêneos (iguais, similares) para a realização do estudo.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

Antes de sua participação no estudo e após a sua participação terminar você será convidado a ir ao CEBIO para avaliar a sua condição de saúde. Um membro da equipe médica do CEBIO fará seu histórico clínico (se você teve ou tem alguma doença e se você faz uso de algum medicamento, etc), medirá sua pulsação, sua temperatura, sua pressão arterial. Também será feito um exame para avaliar o seu coração (eletrocardiograma). O médico lhe fará um exame físico. Após a visita você será encaminhado a um laboratório e deverá colher amostras de sangue e urina para exames laboratoriais, Esses exames serão custeados pelo CEBIO e incluem os listados na tabela abaixo.

Categoria	Exames
ECG	ECG padrão, com 12 derivações.
Análise Hematológica	Hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas.
Análise Bioquímica	Ureia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, TGP, TGO, colesterol total, triglicérides, ácido úrico.
Urina	Sumário de urina (urina tipo I); HCG urinário (para mulheres, no momento do segundo período de internação)
Sorologia	Análise sorológica para: hepatite B, hepatite C e HIV (1 e 2), β HCG-mulheres.

Durante o estudo, você será internado duas vezes por aproximadamente 36 horas em cada período, com intervalo mínimo de 4 dias entre os períodos de internação, na Unidade do CEBIO no Hospital Belo Horizonte. Esta internação seguirá as orientações que você está recebendo em anexo a este documento. Em cada um dos dois períodos de internação: a) será realizada uma coleta de 27 mL de sangue após a admissão da internação, através de agulha introduzida em veia superficial para obtenção de pool de plasma; b) após jejum de aproximadamente 10 horas, será administrado 1 (um) comprimido de Sinvastatina (40 mg) acompanhado de 200 mL de água; c) serão coletadas 18 amostras de sangue de 9 mL cada (equivalente a aproximadamente 1 colher de sobremesa), através de agulha introduzida em veia superficial para a dosagem do medicamento; d) em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura; e) serão também servidas refeições padronizadas (jantar e ceia na noite da internação, almoço, lanche da tarde, jantar e ceia no dia de administração do medicamento). Não será permitida a ingestão de nenhum alimento e nenhuma bebida além do que for oferecido.

Um total de aproximadamente 420 mL de sangue será colhido nas amostras de sangue durante todo o estudo (uma coleta de 27 mL de sangue na admissão de cada internação aproximadamente 171 mL em cada período mais 20 mL para exames laboratoriais). Esta quantidade de sangue corresponde a uma doação de sangue normal. A duração total de sua participação na pesquisa será de aproximadamente quinze dias, a contar da data primeira internação, após o processo de seleção, até a alta final. Neste momento você terá acesso e poderá receber se desejar, uma cópia de todos os exames realizados.

RESPONSABILIDADES

É condição indispensável para participação no estudo clínico que você esteja em boa saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo, sendo de sua responsabilidade:

- para participar do estudo, você não pode ser dependente de drogas ou álcool e caso o investigador tenha alguma suspeita, poderá solicitar exames para detecção do uso de drogas;
- você não pode ter doado sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo ou ter doado 1500 mL (um litro e meio) no período de um ano antecedendo o estudo;
- você não poderá consumir produtos contendo cafeína e xantina (café, chá, coca-cola, bebidas contendo chocolate, etc) nas 48 horas que antecedem as internações até a última coleta.
- não poderá usar bebida alcoólica desde 48 horas antes da primeira internação até a coleta da última amostra de sangue do primeiro período do estudo, e desde 48 horas antes da segunda internação até a coleta da última amostra de sangue do segundo período do estudo;
- você não poderá tomar qualquer medicamento nas 48 horas que antecedem as internações até a última coleta, exceto sob autorização de pesquisador do Cebio;
- você não poderá fazer exercícios físicos intensos nas 48 horas que antecedem cada período de internação.

É ainda de sua responsabilidade em relação a sua participação no estudo clínico:

- comparecer às internações na data e horários marcados, inclusive comparecer às coletas externas nas datas agendadas;

- b) permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos 10 horas) antes de cada ingestão dos medicamentos, e por quatro horas após a ingestão dos medicamentos;
- c) tomar toda a medicação prevista no plano do estudo;
- d) ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos;
- e) retornar para fazer as coletas externas nas datas determinadas;
- f) retornar na data e horário agendados para a realização de consulta e exames de alta, independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

Aos voluntários do sexo feminino é condição indispensável para a participação no estudo clínico que não estejam grávidas, comprovado por exame de gravidez (Beta- HCG), e que não estejam amamentando. Não é permitida a participação se vier a ficar grávida após o exame de Beta-HCG, se estiver amamentando, ou se estiver pretendendo engravidar durante o prazo de duração do estudo. Caso, mesmo tendo considerado estas precauções, a voluntária vier a suspeitar que engravidou durante a participação no estudo, deverá comunicar imediatamente o fato à equipe e deverá interromper sua participação sem prejuízo dos seus direitos.

INDICAÇÕES DO USO DO MEDICAMENTO SINVASTATINA

(Informações gerais e constantes em Bula)

A Sinvastatina é usada em conjunto com mudanças estilo de vida (dieta, perda de peso, exercícios) para reduzir a quantidade de colesterol (gordura) e de algumas outras substâncias gordurosas no seu sangue. A Sinvastatina pertence em uma classe de medicamentos chamados estatinas. Ela funciona com uma diminuição na produção de colesterol no organismo. O acúmulo de colesterol e gorduras, ao longo das paredes de suas artérias (um processo conhecido como aterosclerose) diminui o fluxo sanguíneo e, por conseguinte, o abastecimento de oxigênio para o seu coração, cérebro e outras partes de seu corpo. Reduzir seu nível sanguíneo de colesterol e gorduras podem ajudar a diminuir as suas chances de ser afetado pelas doenças cardíacas, angina (dor no peito), acidentes vasculares cerebrais (derrames), e ataques cardíacos. A sinvastatina reduz o colesterol total, o colesterol LDL (chamado de colesterol "ruim"), os triglicérides, e aumentar o colesterol HDL (chamado de colesterol "bom"), em pessoas portadoras de doenças relacionadas com o aumento das gorduras no sangue.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

(informações gerais e constantes em Bula)

A administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis. A sinvastatina geralmente é bem tolerada. Podem ocorrer flatulência, diarreia, constipação e náuseas, durante o uso.

As reações mais comuns que podem ocorrer durante o tratamento continuado com este medicamento são: constipação intestinal; dor ou fraqueza muscular, falta de energia, cansaço, febre, amarelecimento da pele ou olhos, dor na parte superior direita do abdômen, náusea, hemorragia, perda de apetite, sintomas gripais, prurido (coceira), reações na pele (exantema), dificuldade em respirar ou deglutir, inchaço da face, da garganta, língua, lábios, olhos, mãos, pés, tornozelos, pernas ou rouquidão. Estas reações são mais esperadas em pessoas que fazem uso continuado do medicamento.

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

Haverá necessidade de um jejum de alimentos de aproximadamente 10 horas e de 4 horas para líquidos, antes da ingestão do medicamento. A experiência médica indica que não existem transtornos diretos em decorrência deste período de jejum em indivíduos normais. Entretanto, um médico estará presente durante todo o período de internação para atendimento a intercorrências decorrentes deste ou de outros procedimentos.

EFEITOS ADVERSOS DA SINVASTATINA, CONTRA-INDICAÇÕES E INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

(informações gerais e constantes em Bula)

A Sinvastatina não deve ser usada por indivíduos que apresentem alergia conhecida aos

componentes da fórmula. Não deve ser usada em pacientes portadores de doenças do fígado (ex: hepatite, cirrose, etc). Não deve ser usada durante a gravidez e período de amamentação. Avise ao seu médico se você estiver amamentando ou vai iniciar amamentação durante o uso deste medicamento.

Efeitos nos músculos: o uso de sinvastatina pode causar doenças musculares (geralmente com dor muscular e fraqueza), e muito raramente, rabdomiólise (síndrome resultante de danos na musculatura esquelética, com ruptura da célula).

Efeitos sobre a habilidade de dirigir veículos e / ou operar máquinas: Pacientes particularmente sensíveis, nos quais os medicamentos podem induzir reações infrequentes devem estar atentos para as reações que manifestam com o uso deste medicamento, antes de conduzir veículos, de operar máquinas ou de desenvolver qualquer outra atividade que requeira concentração.

Alguns medicamentos podem interagir com a sinvastatina: genfibrozil e outros fibratos, niacina (ácido nicotínico), ciclosporina, alguns bloqueadores do canal de cálcio, cetoconazol e outros antifúngicos, os antibióticos eritromicina e claritromicina e o antidepressivo nefazodona.

Os eventos adversos são, em geral, observados em indivíduos que fazem uso contínuo do medicamento, não sendo esperado que ocorram durante o estudo, uma vez que serão administradas apenas duas doses do medicamento, havendo entre elas um período de intervalo, em indivíduos avaliados e considerados saudáveis.

Informe ao médico da pesquisa Cebio se você tiver passados de alergias (de qualquer tipo) e hipersensibilidade a medicamentos. Informe ao médico da pesquisa Cebio se você estiver usando qualquer um outro medicamento, ou se faz uso habitual de bebidas alcoólicas ou outras drogas (incluindo cremes, sprays e pomadas), ou ainda, se fez ou faz qualquer tratamento, incluindo psiquiátrico. O médico poderá lhe explicar se alguma associação de medicamento com o Sinvastatina poderá lhe trazer qualquer prejuízo.

USO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue coletadas serão utilizadas exclusivamente para os fins de Estudos, sendo vedado ao CEBIO usá-las para qualquer outra finalidade sem o seu consentimento escrito.

BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES

A participação neste estudo não tem o objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Conseqüentemente, não se espera que a participação no estudo venha a trazer qualquer benefício em função da utilização da edicação a ser utilizada.

Esta pesquisa é para investigação de um medicamento que já existe no mercado e um medicamento genérico, e não haverá benefício direto pelo uso do medicamento. Entretanto, existe um benefício para a população em geral, pois esta pesquisa irá possibilitar o lançamento comercial de um medicamento genérico confiável e em tudo semelhante ao medicamento referência, mas que terá um preço de venda mais baixo.

INTERCORRÊNCIAS

(efeitos indesejáveis)

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

Durante um período de 3 (três) meses, a partir da primeira internação da primeira etapa deste estudo, você estará assegurado (Seguro de Vida em Grupo), com cobertura em caso de morte por qualquer causa, no valor de 30.000 reais. Na hipótese do seguro não ter sido efetivado a tempo da internação, o CEBIO assumirá a responsabilidade nesse valor em caso de morte.

RESSARCIMENTO

De acordo com valores previamente estabelecidos (R\$ 350,00 – trezentos e cinquenta reais), os voluntários serão ressarcidos das despesas que tiverem ao longo da realização do supracitado

estudo clínico, após a consulta de alta. Em caso de desistência do voluntário ou dispensa antes da finalização do estudo, o voluntário será ressarcido proporcionalmente às despesas efetuadas durante o período ao qual participou (por exemplo, se o número total de vezes que o voluntário se deslocaria ao hospital ou laboratório é 4 e o voluntário comparece apenas 2 vezes, o voluntário receberá metade do valor total do ressarcimento). A desistência ou dispensa do voluntário antes do comparecimento à primeira internação não dá direito a ressarcimento.

Estima-se que durante o período de sua participação no estudo, você terá como despesa, apenas gastos de deslocamento da residência ou trabalho até o CEBIO para internação ou realização das coletas, exames e consultas, bem como coletas de amostras após a alta. Ainda devem ser previstas eventuais visitas posteriores para acompanhamento dos eventos adversos. O ressarcimento destas despesas já está incluído no valor estabelecido no item acima. Estão previstas duas visitas ao Hospital Belo Horizonte e uma visita adicional ao consultório do CEBIO, a partir desta data de hoje.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

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

Você está recebendo e terá acesso a todas as informações e esclarecimentos necessários para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido estudo clínico.

Independente de seu desejo e consentimento, sua participação no Estudo clínico poderá ser interrompida, em função:

- a) da ocorrência de eventos adversos;
- b) da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no Estudo;
- c) do não cumprimento das normas estabelecidas;
- d) de qualquer outro motivo que, a critério médico, seja do interesse de seu próprio bem estar ou dos demais participantes;
- e) da suspensão do Estudo como um todo.

O CEBIO o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação. A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe do CEBIO.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÃO QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

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

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum efeito adverso, você deverá entrar em contacto com o CEBIO pelo telefone: (31) 3241-3458 e solicitar que sejam contatados os médicos responsáveis pelo ensaio clínico, ou então entrar em contato diretamente com os mesmos nos telefones indicados no final deste Termo de Consentimento.

Poderá contatar ainda o Dr. Marco Túlio Baccarini Pires ou Dr. Thiago Horta Soares para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa, ou quanto aos seus direitos como voluntário.

Poderá contatar o Comitê de Ética do Hospital Belo Horizonte pelo telefone (31) 3449- 7107 ou (31) 3440-7074, para apresentar recursos, reclamações ou fazer perguntas em relação ao estudo clínico.

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

Eu declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após, tive nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e também sobre o Estudo. Recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmo estar livre e espontaneamente decidindo participar do Estudo. Ao assinar este termo, estou também certificando que toda a informação que prestei, incluindo minha história médica, é verdadeira e correta até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento.

Ao assinar este termo de consentimento estou autorizando o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe e a monitores, auditores, membros do Comitê de Ética em Pesquisa e membros de órgãos regulamentares envolvidos, nas condições estabelecidas descritas nos itens acima, e me comprometo a manter sigilo e confidencialidade sobre qualquer informação relativa a este estudo.

Ao assinar este termo de consentimento não renunciei a qualquer direito legal que venha a ter ao participar deste estudo.

Nome do voluntário (LETRA DE FORMA – legível)	Data	Assinatura
Responsável pela obtenção do termo de Consentimento	Data	Assinatura
Testemunha (Necessário somente se o voluntário não souber ler)	Data	Assinatura

CONTATOS

Dr. Marco Tulio Baccarini Pires (31)3241-3458; (31) 3241-2848	Dr. Thiago Horta Soares (31)3241-3458	CEBIO (31) 3241-3458 (31) 8366-7230 Internação: 8411-8025 83151084
--	--	--

ANEXO C**AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DE DADOS**

Declaramos para devidos fins que a aluna Suéllen Cristina Rennó Silva, regularmente matriculada no Programa de *Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas* da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), nível mestrado, desenvolve a parte experimental de seu projeto de mestrado nas dependências desta empresa: CEBIO - Centro de Pesquisa em Biotecnologia Ltda, com sede na Avenida José Cândido da Silveira, número 2100, bairro Horto Florestal - Belo Horizonte-MG, CNPJ 07.601.429/0001-83.

Salientamos também que todos os resultados aqui obtidos serão integralmente cedidos à referida aluna para elaboração de sua dissertação de mestrado bem como publicação dos mesmos como artigos científicos em periódico da área a serem selecionados pela aluna.

Vale ressaltar que o nome do patrocinador do estudo concedido à aluna só será divulgado sob autorização desta instituição.

Belo Horizonte, 02 de Abril de 2012.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Marco Túlio Baccharini Pires", is written over a horizontal line.

Dr. Marco Túlio Baccharini Pires

Coordenador do Centro

Investigador Principal

Sócio-proprietário

Av. José Cândido da Silveira, 2.100 . Cidade Nova
CEP 31170-000 . Belo Horizonte . Minas Gerais
Tel.: 55 31 3241.3458 . www.cebio.med.br

ANEXO D

Concentrações plasmáticas individuais (ng/mL) ao longo dos tempos de coleta (horas) dos 41 voluntários referentes ao medicamento **referência**.

Vol.	0,00	0,33	0,66	1,00	1,33	1,66	2,00	2,33	2,66	3,00	3,33	3,66	4,00	6,00	8,00	10,00	12,00	24,00
1	ALIQ	8,3800	17,4200	13,9800	10,7600	8,0400	6,9200	6,0800	4,7300	3,9300	4,1700	3,7400	2,5400	3,3000	3,7200	2,9800	2,3600	1,0600
2	ALIQ	ALIQ	0,5700	0,8600	1,4200	1,4000	1,0800	3,6800	3,6300	3,3100	2,8000	1,9200	1,2700	1,6600	1,0000	0,7900	0,7700	0,6100
3	ALIQ	3,4300	8,3600	6,1400	4,8200	3,5700	2,6600	1,9900	1,7700	1,4800	1,2800	1,0900	1,4800	2,0100	0,8600	0,8800	0,5900	ALIQ
4	ALIQ	1,2400	3,7800	3,9700	4,3200	7,0500	19,3200	15,9100	11,4100	9,6100	9,0900	7,3300	5,5000	4,4000	2,9500	4,5700	2,9200	1,7200
5	ALIQ	19,3600	10,8700	10,8400	9,1400	7,0900	5,7500	4,2500	3,5900	3,2600	2,9800	2,1800	1,8300	1,4300	1,3000	1,2100	0,8900	1,0400
6	ALIQ	0,4100	1,3700	1,2600	4,5000	3,5900	2,0000	1,9800	1,8600	1,6100	1,4800	1,1000	1,3300	1,1800	0,8100	0,6400	0,4300	ALIQ
7	ALIQ	ALIQ	1,2800	2,4900	2,8100	1,7900	16,6400	19,3200	11,2100	5,6400	4,2600	3,6800	2,6800	1,2800	0,9500	0,5400	ALIQ	ALIQ
8	ALIQ	1,2000	2,0500	1,8500	5,8400	3,7200	2,0500	1,7900	1,3700	1,2200	0,9100	1,0500	0,6400	2,5700	1,1200	1,4200	1,9200	0,6400
9	ALIQ	ALIQ	1,4600	3,3300	4,6100	4,3900	6,5900	5,4700	4,7200	6,9700	4,6800	3,7900	3,1700	3,1000	1,7700	2,1600	2,4400	1,4200
10	ALIQ	ALIQ	4,4200	3,7100	3,3300	3,2100	3,1600	2,7800	2,3900	2,5400	1,6700	1,4200	1,1800	1,8600	1,3900	1,5500	0,7900	0,5700
11	ALIQ	0,5700	10,3500	8,5400	6,9900	6,7600	9,0400	7,8800	7,3100	7,1200	7,0200	6,0400	5,1300	3,8400	2,4800	2,3000	1,5200	0,6800
12	ALIQ	ALIQ	3,7700	3,1600	2,5200	2,4700	1,6600	1,7500	1,3400	1,0200	0,8800	0,6300	0,9200	0,4200	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
13	ALIQ	ALIQ	16,2200	14,0200	9,4900	7,0700	6,9200	5,4200	3,8100	2,4900	2,2500	2,1300	2,2700	2,0700	1,6800	1,3900	1,1200	0,6100
14	ALIQ	ALIQ	ALIQ	0,5800	1,4200	1,4800	1,5800	1,7600	1,3100	1,1800	1,3300	3,6800	13,8000	2,1400	0,9300	0,4500	ALIQ	ALIQ
15	ALIQ	1,1000	7,9300	4,9500	3,1800	2,5100	2,8700	3,2300	3,6000	4,2500	3,0500	2,1900	1,6100	2,2300	1,1100	0,8700	0,8500	0,6200
16	ALIQ	ALIQ	3,4500	4,1000	5,4700	5,9600	6,2300	4,6900	7,1600	6,4700	7,9400	6,9000	6,0400	2,1100	1,1600	0,5500	0,4500	ALIQ
17	ALIQ	ALIQ	0,8900	1,6800	1,3700	1,1900	1,2200	1,1800	5,7900	3,7400	3,4200	4,0800	3,3000	3,8900	3,3200	3,6900	2,5900	1,2200
18	ALIQ	2,0200	7,8600	9,2100	8,2200	6,9200	5,3000	4,3000	5,0000	4,0200	2,8100	3,2300	3,0800	3,5000	3,1500	2,6200	2,2300	1,1100
19	ALIQ	3,8500	3,6300	3,2700	2,2700	1,8300	1,7400	1,0900	1,1000	1,3400	1,3500	0,8400	0,8700	0,9900	1,0600	1,1400	1,0000	0,5000
20	ALIQ	3,1600	10,9200	6,1700	7,2200	5,0900	4,6600	3,5900	3,1000	2,8300	1,9200	2,3300	1,7700	3,0400	2,2400	2,0900	2,0600	1,5100
21	ALIQ	ALIQ	2,3600	3,9000	2,9100	2,2400	1,8900	1,4900	1,3300	1,3000	0,9500	0,8100	0,9500	1,2700	1,1600	1,3100	1,5200	0,6100
22	ALIQ	ALIQ	7,0200	2,8700	1,9200	1,6500	1,1400	1,0700	0,6200	0,9500	0,7100	0,5600	0,4700	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
23	ALIQ	2,2200	4,2800	3,4900	3,2300	2,9100	2,7900	2,5800	2,5700	2,5400	2,0800	1,7200	1,5000	2,4100	1,3400	0,9300	1,3000	0,5700
24	ALIQ	4,4300	4,6300	4,0400	5,8400	7,4500	9,3800	7,9800	4,5600	4,4100	3,6300	3,4800	2,5300	1,2300	0,6100	0,4500	0,4100	ALIQ
25*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	ALIQ	1,5600	5,6800	5,3000	4,7500	4,2500	2,7300	1,5900	1,6200	1,4200	1,0500	1,2800	0,8200	0,9400	0,6500	0,4600	0,4400	ALIQ
28	ALIQ	6,5800	9,0700	5,4700	5,4600	3,9700	2,5200	2,8800	2,2900	1,7500	1,3300	1,3400	1,4000	0,8000	0,9100	0,5900	0,6800	ALIQ
29	ALIQ	ALIQ	1,4800	7,6700	6,1200	5,4200	4,4600	3,7800	3,0000	2,3000	2,8600	1,5200	1,7000	1,5700	1,0600	0,8200	0,7100	0,4200
30	ALIQ	ALIQ	2,0400	4,8800	13,3200	17,8100	11,4400	7,1100	6,1200	3,7300	2,9800	2,8400	2,5900	1,4600	0,7800	0,6000	0,4500	ALIQ
31	ALIQ	6,9900	9,5900	8,9100	7,3000	5,8400	4,9800	4,0300	3,5000	2,8400	2,3400	2,2000	2,0100	1,4800	0,8800	0,6400	0,5600	ALIQ
32	ALIQ	ALIQ	3,1900	9,5700	8,4600	4,9300	3,9600	3,5400	2,5700	2,5000	1,6000	1,5700	1,6800	0,9500	0,5700	0,4800	0,5600	ALIQ
33	ALIQ	ALIQ	1,8600	3,5100	2,8100	2,4700	2,4100	2,4800	2,9400	9,2900	9,1400	7,0200	5,0500	3,0700	2,4400	1,7900	0,9300	ALIQ
34	ALIQ	1,3300	4,4100	5,2200	3,6500	2,8100	2,6000	2,5900	1,7800	1,7200	1,4200	1,2900	1,1200	0,9400	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
35	ALIQ	0,9900	10,4700	16,6800	8,5800	6,7600	6,4400	3,5600	3,3100	2,2700	2,6200	2,9900	2,5600	2,8300	1,6800	1,1700	0,9100	0,7100
36	ALIQ	3,1200	5,3200	6,1400	3,3300	2,3700	1,8300	1,5000	1,1900	0,9400	0,9200	0,8500	0,8300	0,7300	0,4800	0,4700	ALIQ	ALIQ
37	ALIQ	ALIQ	6,2100	4,3900	4,4300	4,3000	2,9800	2,4400	1,9200	1,9300	1,3500	1,2500	0,9900	0,4900	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
38	ALIQ	0,5400	2,8100	2,7100	2,5900	2,2900	2,0500	1,9000	1,4300	1,8100	1,8600	1,8600	1,8300	1,8600	1,3900	1,8900	1,5000	1,9300
39	ALIQ	0,5300	1,7200	2,2200	2,3100	3,2200	3,3400	2,7300	2,8200	2,5700	1,9200	2,1600	2,3700	3,1400	2,1100	1,7600	1,5100	0,6700
40	ALIQ	ALIQ	0,5400	0,7700	0,4400	0,5800	1,2300	2,9300	2,6500	2,7700	2,9200	3,8100	3,0500	4,1200	3,8000	2,6700	2,1300	0,5500
41*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	ALIQ	16,9500	15,3900	13,5100	11,5300	8,5300	4,8900	4,1400	3,5800	2,9000	2,2900	2,4200	1,8400	0,9300	0,5100	ALIQ	ALIQ	ALIQ
43	ALIQ	4,6800	5,5400	4,2400	3,0900	2,2000	2,0200	1,8800	1,6500	1,5200	1,2300	1,2600	1,1100	1,7200	0,5600	0,5400	0,7800	0,7800
44	ALIQ	6,2400	11,3900	8,8800	6,4300	4,3800	3,5500	3,2400	3,1600	2,7000	3,4400	2,6900	1,9200	1,7900	1,5800	1,0600	0,8700	0,4200

ALIQ = concentrações abaixo do LIQ (menor que 0,4 ng/mL).

Concentrações plasmáticas individuais (ng/mL) ao longo dos tempos de coleta (horas) dos 41 voluntários referentes ao medicamento teste.

Vol.	0,00	0,33	0,66	1,00	1,33	1,66	2,00	2,33	2,66	3,00	3,33	3,66	4,00	6,00	8,00	10,00	12,00	24,00
1	ALIQ	4,5500	7,3900	6,6500	6,1200	4,2700	3,7600	3,9400	4,1000	3,4800	3,6500	1,8900	3,2200	4,7600	4,3500	6,4500	4,9700	2,4100
2	ALIQ	ALIQ	ALIQ	1,0900	3,2200	3,8900	4,0200	3,7300	2,7700	2,0700	2,3000	2,7800	2,2000	1,3700	1,1700	1,2800	1,3200	1,2700
3	ALIQ	ALIQ	ALIQ	0,6900	3,9800	4,9600	4,1800	3,1300	2,5700	2,2200	2,4800	2,1100	1,3500	4,1600	3,4200	2,1100	2,0100	1,4100
4	ALIQ	6,0100	5,5000	6,9500	5,7100	5,3300	5,7800	5,5900	5,5400	4,9300	4,6700	4,6100	3,2600	2,5300	1,1700	2,1600	2,0900	1,6200
5	ALIQ	2,9700	12,7600	7,3800	6,3800	5,0700	3,5300	3,5200	2,7900	2,6900	2,8100	2,3400	1,9700	1,9200	1,8300	1,5800	1,3500	1,0500
6	ALIQ	ALIQ	0,8200	1,3700	1,1100	0,9200	0,7800	1,0000	1,0000	1,1300	2,2300	2,7900	1,5500	0,9200	0,6900	0,6400	0,6400	0,7200
7	ALIQ	1,9000	3,2000	5,8900	5,4300	3,4100	2,7900	2,6800	2,3500	1,8100	1,5500	1,2000	1,1200	1,2200	1,0500	0,8600	0,6800	0,4000
8	ALIQ	1,0900	2,4100	2,1300	3,5600	3,8500	3,1300	1,7400	1,5900	1,1300	0,9900	0,7300	0,5900	0,8300	0,4400	0,4600	0,5100	ALIQ
9	ALIQ	ALIQ	2,3200	5,3300	4,9600	3,5300	3,2200	2,8200	2,7000	3,0600	2,5900	2,2000	2,2200	2,7200	3,2700	2,9500	2,6300	2,0300
10	ALIQ	0,6900	0,7000	1,1000	1,0800	0,7700	0,6400	0,7000	0,5400	0,7300	1,0300	1,0400	1,2700	4,6400	1,9100	1,5600	1,2200	0,8400
11	ALIQ	ALIQ	4,9200	8,3500	8,8000	8,0900	6,5900	5,9300	4,9300	4,2500	3,3500	3,7700	2,9500	2,2600	1,8000	1,8900	1,6600	1,0600
12	ALIQ	0,5000	1,5700	1,8800	1,3000	1,2500	1,1200	0,9200	0,8800	0,6700	0,8800	0,8700	0,9600	0,5900	0,4300	ALIQ	ALIQ	ALIQ
13	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	0,8300	2,9200	2,4300	1,9400	2,1100	1,8200	1,3900	0,8300	1,0100	0,8500	1,1000	1,9300	1,2200
14	ALIQ	0,4600	0,8700	1,3000	1,2100	1,1800	1,0100	1,2000	1,2700	1,1900	1,2200	5,2600	20,6500	6,9200	1,8400	1,0300	0,5700	ALIQ
15	ALIQ	3,1500	5,1700	4,8800	2,7400	3,5000	2,2500	2,2700	2,1000	1,5000	1,5200	1,5300	1,3600	1,0600	0,6000	ALIQ	ALIQ	ALIQ
16	ALIQ	2,6600	4,1200	11,1600	8,9200	5,0000	4,5500	3,2900	2,8600	2,3900	1,8400	1,7000	1,3300	1,3500	0,7300	0,7000	0,6500	ALIQ
17	ALIQ	ALIQ	0,5400	0,5100	0,7600	0,6600	0,6000	0,6600	0,5500	1,8100	2,3400	1,5400	1,3100	1,7500	2,0800	4,0300	4,1100	1,7700
18	ALIQ	1,1400	2,3700	3,1600	2,7200	2,9500	2,7300	2,1300	2,2600	2,6500	2,0900	1,7800	1,9400	1,1300	0,8700	1,3000	0,7600	0,4200
19	ALIQ	1,8000	3,1000	2,5200	1,6000	1,0500	0,9000	0,7300	0,7500	0,6900	0,5100	0,5300	0,5100	0,9500	0,9300	0,8800	0,9800	1,5900
20	ALIQ	0,7200	2,2700	2,3000	2,0700	1,7200	1,4300	1,1400	1,3800	3,8900	3,1600	2,1100	1,6200	1,1600	2,8400	2,5000	2,5100	2,3300
21	ALIQ	ALIQ	0,5800	4,5800	5,2100	3,6200	3,3100	2,9600	2,7300	1,9900	1,4300	1,3400	1,3100	0,9800	0,6600	0,5700	0,7400	0,6700
22	ALIQ	1,2100	2,9500	2,0100	1,4500	0,9700	0,7600	0,6100	0,5300	0,5600	0,4900	0,6100	0,7600	0,6900	0,6400	0,4800	0,4600	ALIQ
23	ALIQ	1,8700	5,1600	4,3200	4,4500	3,9400	4,2400	3,8400	2,8800	2,3200	2,2700	1,8000	1,7400	2,1200	1,0900	0,9500	0,8700	0,7500
24	ALIQ	0,8700	4,4800	7,3700	5,9500	5,8400	5,1700	4,1400	3,8600	3,2600	3,2100	2,4500	2,0800	1,3500	0,9200	0,6400	0,7900	0,7300
25*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	ALIQ	0,9400	4,3200	3,9200	2,5200	1,9000	1,7300	1,4300	1,2200	1,2000	0,9700	0,7300	0,6400	0,5000	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
28	ALIQ	0,8300	4,2700	3,3600	3,0200	2,8900	2,3000	2,6400	2,0300	1,9000	1,4000	1,1600	0,9600	1,7400	1,0700	0,8300	0,4800	ALIQ
29	ALIQ	0,5100	4,7600	4,8400	4,2500	2,7200	2,8600	2,2000	1,1900	1,5700	1,3500	1,8200	1,5800	2,2300	1,8100	2,1100	1,7800	1,1500
30	ALIQ	0,7100	1,6200	1,6800	1,4600	1,2600	1,3800	2,3000	4,2800	3,1600	2,0600	1,8200	1,7400	0,9100	0,7200	0,4000	0,4900	ALIQ
31	ALIQ	1,7400	5,0000	6,9900	7,7800	6,7100	5,2100	4,9100	3,9400	3,5000	2,4400	2,0600	1,7600	1,0100	0,6100	0,4800	0,4100	ALIQ
32	ALIQ	ALIQ	1,4200	2,3900	2,3300	1,7300	2,1300	1,6500	1,6400	1,1900	1,1400	1,0400	0,7600	1,1000	0,7600	1,3600	1,2600	0,4900
33	ALIQ	ALIQ	ALIQ	1,4100	1,4600	1,5800	1,7300	1,4300	1,9100	1,7800	2,4700	6,0700	8,7200	2,8900	1,8000	1,6600	1,4600	0,8500
34	ALIQ	ALIQ	0,4800	1,4100	1,9400	2,9900	2,4400	2,4800	2,7800	2,7600	2,3900	2,2400	3,0500	2,0600	1,1900	0,6400	0,5100	ALIQ
35	ALIQ	0,6600	4,9500	7,5300	6,9400	5,2000	4,3600	3,6400	3,2400	3,3800	2,7600	3,0100	2,4700	3,0500	1,9700	2,3300	1,5900	2,2600
36	ALIQ	1,0500	4,3400	2,8300	2,2300	1,9000	1,4700	1,5500	1,1900	1,0700	0,7500	0,7400	0,8800	1,2300	1,2800	1,2300	1,2100	0,8000
37	ALIQ	ALIQ	1,1400	2,0500	2,2300	2,3500	2,2100	2,1100	1,8900	1,7000	1,2900	1,5200	1,4800	0,9900	1,0700	0,9100	0,7200	0,4600
38	ALIQ	0,5100	2,4000	1,6800	1,4000	1,2100	0,9600	0,9600	1,0800	1,1500	1,1200	1,1000	1,3700	2,4800	2,4800	3,3100	3,2600	2,2600
39*	ALIQ	0,4300	1,2400	0,8400	0,6300	0,7300	0,7900	0,5100	0,5300	0,5200	0,6100	0,6800	0,6600	1,7400	1,8200	2,1600	1,7800	1,3500
40	ALIQ	3,0600	8,2200	7,2500	4,9800	4,1900	3,7300	2,5200	2,3400	2,5500	2,5300	2,5300	2,1100	3,6100	1,4800	2,9800	1,9700	0,7300
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	ALIQ	ALIQ	0,6000	0,8000	0,9300	1,6800	7,2800	11,9500	12,0600	14,6500	14,8100	13,2000	12,9400	3,3500	1,4500	1,2000	0,7300	0,4600
43	ALIQ	4,3600	6,2100	6,1500	6,3500	5,9800	5,6700	4,4800	3,5700	2,9400	2,1700	2,0000	2,1000	1,9000	1,5500	1,0200	0,7800	1,0200
44	ALIQ	ALIQ	1,1200	1,9600	4,8500	3,0500	2,6200	2,3700	1,7600	1,4600	1,7000	1,5200	1,6700	1,7900	1,4900	1,2400	0,9800	1,3900

ALIQ = concentrações abaixo do LIQ (menor que 0,4 ng/mL).

ANEXO E

