



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TESE DE DOUTORADO

José Homero de Souza Filho

FATORES QUE AFETAM A BIOEQUIVALÊNCIA E METANÁLISE APLICADA A
INTERCAMBIALIDADE DE MEDICAMENTOS

Recife, 2016

JOSÉ HOMERO DE SOUZA FILHO

**FATORES QUE AFETAM A BIOEQUIVALÊNCIA E METANÁLISE APLICADA A
INTERCAMBIALIDADE DE MEDICAMENTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção
do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Coorientador: Danilo César Galindo Bedor

Recife, 2016.

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

S729f Souza Filho, José Homero de.
Fatores que afetam a bioequivalência e metanálise aplicada a intercambialidade de medicamentos / José Homero de Souza Filho. – 2016.
175 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Davi Pereira de Santana.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.

Inclui referências e apêndices.

1. Bioequivalência. 2. Metanálise. 3. Farmacocinética. 4. Intercambialidade. I. Santana, Davi Pereira de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2017-052)

JOSÉ HOMERO DE SOUZA FILHO

“Fatores que afetam a bioequivalência e metanálise aplicada a intercambialidade de medicamentos”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 12/08/2016.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Presidente e Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Leila Bastos Leal (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Noely Camila Tavares Cavalcanti Bedor (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Flávia Patrícia Moraes de Medeiros (Examinadora Externa)
Faculdade Pernambucana de Saúde

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Silvio Romero de Barros Marques

Diretor de Ciências da Saúde – CCS

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antônio Rodolfo de Faria

Vice – Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Elba Lúcia Cavalcanti Amorim

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Almir Gonçalves Wanderley

Vice - Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Rafael Matos Ximenes

*Em memória de meu avô Jerônimo Batista de Souza
e minha avó Quitéria Batista de Souza, que tanto
contribuíram e se esforçaram para me educar e para
que eu pudesse estudar. Seus ensinamentos me dão
força e coragem para lutar para ser cada dia uma
pessoa melhor que fui ontem.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela família, pelos amigos, pela saúde, disposição e coragem para enfrentar as horas difíceis, pela sabedoria para escolher os caminhos certos e por todas as bênçãos derramada na minha vida. Pois por Ele e para Ele são todas as coisas e sem Ele nada tem valor e nada tem importância.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida, pela ajuda e ensinamentos ao longo da jornada de minha vida. A minha tia Maria José, meu tio Zequinha e tio Hélio pela grande ajuda, suporte emocional e pelo o grande apoio nas horas difíceis.

Ao Prof. Davi, pela a orientação e ensinamento, na tese e principalmente na vida, pois através dele aprendi ser uma pessoa e farmacêutico melhor.

Aos meus grandes amigos, que considero como irmãos, Ellison Neves e Eduardo Kadoca.

A Danilo Bedor pela a grande ajuda na construção dessa tese e pela amizade construída durante este tempo de trabalho.

A minha esposa Patrícia pelo carinho, amor, companheirismo, paciência e ajuda nas horas difíceis.

Aos meus amigos e colegas:

Júlio Galvão, Levi Santana, Leila Leal, Giovana Damasceno, Amanda Oliveira, Gean Tomé e todos os demais que não estão aqui listados, mas não por isso sejam menos importantes.

A minha família:

Hipólito, Hugo, Glaubervânia e Gerlaine, Lúcio, Jerônimo, Tâmara, Tia Sueli, Carol, Pâmela, tia Dapaz, meu avô (Severino) e em memória de minha avó (Rita).

A todos os colaboradores das Farmácias São Jerônimo: Pedro, Guilherme, Simone, Fernanda, Águida, Elidivânia, Eduardo, Robson, Matheus, Cleyton, Anailson, Rubinho, Laura e Thalia.

*... "As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas".
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas..."*

(Clarice Lispector)

*[...] nada é fixo para aquele que alternadamente pensa e sonha [...]"
Gaston Bachelard*

RESUMO

Estudos não garantem a bioequivalência entre genéricos ou entre similares do mesmo medicamento de referência. A grande alternância de fabricante de medicamento ao longo do tratamento, está gerando preocupação dos médicos e farmacêuticos, principalmente nos países desenvolvidos, pois os estudos, atualmente, realizados e exigidos pelas agências reguladoras não garantem que essas trocas sejam seguras e que não comprometam o tratamento do paciente. Este trabalho teve o objetivo de analisar as variáveis referentes ao impacto do cronograma de coleta, do gênero da população do estudo e dos critérios de escolha dos voluntários, parâmetros farmacocinéticos, coeficientes de variação no resultado dos estudos. Adicionalmente, foi avaliado e utilizado o método estatístico de metanálise para verificação da bioequivalência entre medicamentos genéricos e/ou similares em estudos independentes. A análise do impacto do cronograma de coleta foi realizada através da análise estatística da bioequivalência do estudo com diferentes cronogramas de coleta. O estudo do gênero foi conduzido com a realização de estudo com homens e mulheres em um único grupo e depois os grupos foram separados e comparados de forma isolada. A influência da massa corporal foi estudada separando os voluntários em subgrupos, de acordo com os critérios de massa corporal e índice de massa corporal. Já a metanálise foi realizada de acordo com um protocolo previamente elaborado, onde se avaliou a bioequivalência entre diversos fabricantes dos seguintes fármacos: metildopa, lamivudina, fluconazol, da associação de sulfametoxazol e trimetoprima. As análises mostraram que um cronograma com maior quantidade de pontos gera resultados mais fidedignos, além de propiciar uma redução do coeficiente de variação e um intervalo de confiança mais estreito. As mulheres apresentaram um tempo para concentração plasmática máxima - $T_{máx}$ maior e uma meia vida plasmática e um coeficiente de variação intersujeito menor que os homens. A seleção dos voluntários com a utilização de massa corporal como critério de seleção promoveu uma redução dos coeficientes de variação. A metanálise se mostrou uma técnica eficaz e que alguns medicamentos não foram considerados bioequivalentes. Concluímos que todos os fatores analisados podem afetar os valores dos parâmetros farmacocinéticos e alterar, inclusive, o resultado do estudo, todavia, o grau do impacto varia para cada medicamento e não podemos generalizar os resultados obtidos. A metanálise pode ser utilizada para avaliar medicamentos genéricos e similares em estudos independentes, aumentando a segurança para população e reduzindo os riscos nas trocas de medicamentos, produzidos por diferentes fabricantes.

Palavras-chaves: Bioequivalência. Metanálise. Farmacocinética. Intercambialidade.

ABSTRACT

Studies do not guarantee the equivalence between generic or between similar of the same reference drug. The big alternating manufacturer of medicine throughout the treatment, is generating concern of doctors and pharmacists, especially in developed countries, because the studies currently undertaken and required by regulatory agencies do not guarantee that these exchanges are safe and that do not compromise the patient's treatment. This work had the objective of analyzing the variables concerning the impact of the collection schedule, the genre of the population of the study and the criteria of choice of the volunteers, pharmacokinetic parameters, coefficients of variation in the outcome of the studies. Additionally, was evaluated and used the method of statistical meta-analysis for verification of equivalence between generic drugs and/or similar in independent studies. The analysis of the impact of the collection schedule was held through the statistical analysis of the bioequivalence study with different collection schedules. The genre study was conducted with the study with women and men in one group and then the groups were separated and compared in isolation. The influence of body weight was studied by separating the volunteers into subgroups according to the criteria of body weight and body mass index. Already the meta-analysis was performed according to a previously developed Protocol, where he assessed the equivalence between various manufacturers of the following drugs: methyldopa, lamivudine, fluconazole, the Association of sulfamethoxazole and trimethoprim. The analysis showed that a timeline with the most amount of points generates more reliable results, in addition to providing for a reduction in the coefficient of variation and a narrower confidence interval. Women showed a time to maximum plasma concentration-greater T_{max} and a plasma half-life and a coefficient of variation intersujeito less than men. The selection of the volunteers with the use of body mass as selection criteria promoted a reduction of the coefficient of variation (CV). The meta-analysis proved an effective technique and some medicines were not considered Bioequivalent. We conclude that all the factors analyzed can affect the values of the pharmacokinetic parameters and change, including the result of the study, however, the degree of impact varies for each medicine and we cannot generalize the results. The meta-analysis can be used to assess generic medicines and the like in independent studies, increasing security for population and reducing risk in the trade in medicines, produced by different manufacturers.

Key words: Bioequivalence. Meta-analysis. Pharmacokinetics. Interchangeability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Evolução da legislação de medicamentos genéricos e similares no Brasil.....	23
Figura 2 –	Fluxo da intercambialidade de medicamento estabelecida pela legislação brasileira.....	24
Figura 3 –	Evolução do mercado de genéricos no Brasil.	25
Figura 4 –	Gráfico do sistema de classificação biofarmacêutica.	27
Figura 5 –	Representação esquemática dos principais parâmetros farmacocinéticos de um estudo de Bioequivalência.	28
Figura 6 –	Organograma de estudo de bioequivalência.	32
Figura 7 –	Organograma de realização da avaliação da influência dos dados antropométricos nos estudos de bioequivalência.	56
Figura 8 –	Fluxograma de realização da metanálises dos estudos de bioequivalência	57
Figura 9 –	Concentração plasmática versus tempo do diazepam para homens e mulheres.	61
Figura 10 –	Diferença entre os gêneros para o poder do teste para $C_{máx}$	64
Figura 11 –	Diferença entre os gêneros para o poder do teste para ASC_{0-t}	65
Figura 12 –	Gráfico mostrando a influência do cronograma de coleta no $C_{máx}$ do estudo da metildopa.....	74
Figura 13 –	Gráficos com o impacto do cronograma de coleta na ASC do estudo escitalopram.	75
Figura 14 –	Gráficos de concentração versus tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência.	77
Figura 15 –	Gráficos de concentração versus tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	78
Figura 16 –	Gráficos de concentração versus tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência.	78
Figura 17 –	Gráficos de concentração versus tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	79
Figura 18 –	Dispersão do $C_{máx}$ versus MC dos participantes de pesquisa.	87
Figura 19 –	Dispersão do $C_{máx}$ versus IMC dos participantes de pesquisa.	88
Figura 20 –	Perfil farmacocinético do medicamento de referência no estudo 01 e 02.	93
Figura 21 –	Perfil farmacocinético do medicamento de teste no estudo 01 e 02.	94

Figura 22 –	Gráfico do Intervalo de confiança (90%) dos medicamentos teste para o $C_{máx}$ e ASC_{0-t}	96
Figura 23 –	Perfil farmacocinético do medicamento de referência nos três estudos.	96
Figura 24 –	Perfil farmacocinético dos medicamentos teste nos três estudos.....	97
Figura 25 –	Gráfico do Intervalo de confiança (90%) dos medicamentos teste para o $C_{máx}$	99
Figura 26 –	Gráfico do Intervalo de confiança (90%) dos medicamentos teste para $aASC_{0-t}$	99
Figura 27 –	Perfil farmacocinético do fármaco sulfametoxazol do medicamento referência no estudo 01 e 02.	100
Figura 28 –	Perfil farmacocinético do fármaco trimetoprima do medicamento referência no estudo 01 e 02.	100
Figura 29 –	Perfil farmacocinético do medicamento de teste no estudo 01 e 02.	101
Figura 30 –	Perfil farmacocinético do medicamento de teste no estudo 01 e 02.	101
Figura 31 –	Gráfico do Intervalo de confiança (90%) dos medicamentos teste para o $C_{máx}$ e ASC_{0-t} do fármaco sulfametoxazol.....	104
Figura 32 –	Gráfico do intervalo de confiança (90%) dos medicamentos teste para o $C_{máx}$ e ASC_{0-t} do fármaco trimetoprima.	104
Figura 33 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência	166
Figura 34 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	166
Figura 35 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência	167
Figura 36 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	167
Figura 37 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência	168
Figura 38 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	168
Figura 39 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência	169
Figura 40 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	169

Figura 41 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência	170
Figura 42 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	170
Figura 43 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência	171
Figura 44 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	171
Figura 45 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência	172
Figura 46 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	172
Figura 47 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência.	173
Figura 48 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	173
Figura 49 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência.	174
Figura 50 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	174
Figura 51 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência.	175
Figura 52 –	Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.....	175

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Relação de intervalo de confiança por coeficiente de variação intrassujeito da EMA.....	29
Tabela 2 –	Parâmetros utilizados na validação do método bioanalítico (BRASIL, 2012b).	36
Tabela 3 –	Total de voluntários necessários para alcançar um poder desejado.....	39
Tabela 4 –	Dados dos estudos que participaram das análises da influência do gênero.	58
Tabela 5 –	Dados antropométricos dos participantes de pesquisa que participaram dos estudos.....	59
Tabela 6 –	Análise da variação de $C_{máx}$ de acordo com o gênero.....	60
Tabela 7 –	Análise da variação da ASC_{0-t} de acordo com o gênero.	62
Tabela 8 –	Análise da variação da $T_{máx}$ de acordo com o gênero.....	62
Tabela 9 –	Análise da variação da $T_{1/2}$ de acordo com o gênero.	63
Tabela 10 –	Coeficiente de variação intrassujeitos do $C_{máx}$ para homens e mulheres.	66
Tabela 11 –	Coeficiente de variação intersujeitos da ASC_{0-t} para homens e mulheres.	67
Tabela 12 –	Intervalo de confiança de 90% para $C_{máx}$	68
Tabela 13 –	Intervalo de confiança de 90% para ASC_{0-t}	69
Tabela 14 –	Dados dos estudos que participaram da análise da influência do cronograma de coleta.	70
Tabela 15 –	Dados dos cronogramas de coleta dos estudos analisados.....	71
Tabela 16 –	Dados dos cronogramas de coleta dos estudos analisado (continuação).	72
Tabela 17 –	Dados dos cronogramas de coleta dos estudos analisados (continuação).....	73
Tabela 18 –	Valores de $C_{máx}$ de acordo com o cronograma do estudo.	74
Tabela 19 –	Valores de ASC_{0-t} de acordo com o cronograma do estudo.	75
Tabela 20 –	Valores de $T_{máx}$ de acordo com o cronograma do estudo.	76
Tabela 21 –	Valores do $T_{1/2}$ de acordo com o cronograma do estudo.	77
Tabela 22 –	Valores dos coeficientes de variação intrassujeitos para os diferentes cronogramas de coleta	80
Tabela 23 –	Poder do teste dos parâmetros $C_{máx}$ e ASC_{0-t} para os diferentes cronogramas de coleta	80
Tabela 24 –	Intervalo de confiança de 90% para $C_{máx}$	81
Tabela 25 –	Intervalo de confiança de 90% para ASC_{0-t}	82

Tabela 26 –	Dados dos estudos que participaram das análises da influência do MC e IMC.	83
Tabela 27 –	Variação do poder do teste de acordo com o grupo analisado.....	84
Tabela 28 –	Variação do intervalo de confiança 90% para os grupos do $C_{máx}$	85
Tabela 29 –	Coeficiente de variação intrassujeitos – CV Intra do ($C_{máx}$).....	86
Tabela 30 –	Coeficiente de variação intersujeitos – CV Inter do ($C_{máx}$)	87
Tabela 31 –	Variação do poder do teste de acordo com o grupo analisado.....	89
Tabela 32 –	Variação do intervalo de confiança (90%) para os grupos da ASC_{0-t}	89
Tabela 33 –	Coeficiente de variação Inter e Intrassujeitos para ASC_{0-t}	90
Tabela 34 –	Dados dos estudos da metildopa analisados.	92
Tabela 35 –	Teste de homogeneidade dos medicamentos referência.	92
Tabela 36 –	Dados dos estudos com o fluconazol.	94
Tabela 37 –	Teste de homogeneidade dos medicamentos referência.	95
Tabela 39 –	Comparação do intervalo de confiança (90%) entre os medicamentos teste....	95
Tabela 39 –	Inclusão dos dados para realização da metanálises.....	97
Tabela 40 –	Teste de homogeneidade dos medicamentos referência.	98
Tabela 41 –	Comparação do intervalo de confiança (90%) entre os medicamentos teste....	98
Tabela 42 –	Dados transformados do $C_{máx}$ e ASC_{0-t} , erro médio e quantidade de participantes de pesquisa por sequência para o sulfametoxazol.....	102
Tabela 43 –	Dados transformados do $C_{máx}$ e ASC_{0-t} , erro médio e quantidade de participantes de pesquisa por sequência para o trimetoprima.	102
Tabela 44 –	Teste de homogeneidade dos medicamentos referência para o fármaco sulfametoxazol.	103
Tabela 45 –	Teste de homogeneidade dos medicamentos referência para a trimetoprima.	103
Tabela 46 –	Comparação do intervalo de confiança (90%) entre os medicamentos teste em estudos independentes.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC – Área Sob a Curva

BPC – Boas Práticas Clínicas

BPL – Boas Práticas de Laboratório

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CLAE-EM/EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas sequencial

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada detector de ultravioleta

CNS – Conselho Nacional de Saúde

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

D.O.U. – Diário Oficial da União

DCB – Denominação Comum Brasileira

DCI – Denominação Comum Internacional

FDA – *Food and Drug Administration*

GEPEC – Gerência de Medicamentos Novos, Pesquisa e Ensaios Clínicos

LIQ – Limite Inferior de Quantificação

NUDFAC – Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético

PA – Princípio Ativo

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução Específica

Ref – Referência

SCB – Sistema de Classificação Biofarmacêutica

DP – Desvio Padrão

SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TR – Termo de Recrutamento

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

EMA - *European Medicines Agency*

LISTA DE SÍMBOLOS

%CV – Percentual do coeficiente de variação

μg – Micrograma

$ASC_{0-\text{inf}}$ - Área sob a curva do tempo zero ao infinito

ASC_{0-t} - Área Sob a Curva do Tempo Zero ao último ponto de coleta

$C_{\text{máx}}$ – Concentração Máxima

C_p – Concentração Plasmática

C_t – Última Concentração Determinada Experimentalmente

h – Hora

IC – Intervalo de Confiança

K_e – Constante de eliminação

kg – Quilograma

L – Litro

$\ln$ – Logaritmo Natural

mg – Miligrama

min – Minuto

mL – Mililitro

N° - Número

pH – Potencial Hidrogeniônico

$t_{1/2}$ – Meia Vida de Eliminação Plasmática

$T_{\text{máx}}$ – Tempo de Concentração Máxima

λ_z – Constante de eliminação

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1.	HISTÓRICO DOS DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS	22
2.2.	ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA	25
2.2.1.	Parâmetros farmacocinéticos	27
2.2.1.1.	Concentração Máxima ($C_{máx}$).....	28
2.2.1.2.	Tempo de Concentração Máxima ($T_{máx}$).....	29
2.2.1.3.	Área sob a curva (ASC).....	30
2.2.1.4.	Meia vida ($t_{1/2}$) e constante (K_e) de eliminação do fármaco	30
2.2.2.	Etapas dos estudos de bioequivalência	31
2.2.2.1.	Etapa Clínica.....	33
2.2.2.2.	Etapa Bioanalítica.....	35
	Fonte: Adaptado da resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.....	36
2.2.2.3.	Etapa Estatística	36
2.2.3.	Parâmetros a serem considerados no planejamento dos estudos de bioequivalência / biodisponibilidade relativa	37
2.2.3.1.	Número de Voluntários	38
2.2.3.2.	Gênero dos voluntários.....	40
2.2.3.3.	Cronograma de coleta.....	41
2.2.3.4.	Influência da idade.....	42
2.2.3.5.	Influência do peso e índice de massa corporal - IMC	43
2.3.	METANÁLISE APLICADA NA AVALIAÇÃO DA INTERCAMBIALIDADE ENTRE MEDICAMENTOS DE ESTUDOS INDEPENDENTES.....	43
2.3.1.	Método de Chow e Liu para a Meta-análise	45
3.	OBJETIVOS	49
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4.	JUSTIFICATIVA	50
5.	MATERIAL E MÉTODO	51
5.1.	ETAPA CLÍNICA.....	51
5.1.1.	Considerações Gerais	51
5.1.2.	Desenho do estudo.....	51
5.1.3.	População do estudo	52
5.1.4.	Recrutamento	52
5.1.5.	Seleção.....	52
5.2.	ETAPA BIOANALÍTICA.....	53

5.2.1. Validação do método bioanalítico	53
5.2.2. Execução do método bioanalítico	54
5.3. ETAPA ESTATÍSTICA.....	54
5.3.1. Tratamento estatístico	54
5.4. AVALIAÇÃO DO GÊNERO DO VOLUNTÁRIO	55
5.5. AVALIAÇÃO DOS DADOS ANTROPOMÉTRICOS	55
5.6. METANÁLISE DOS ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA	57
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
6.1. INFLUÊNCIA DO GÊNERO	58
6.1.1. Avaliação dos parâmetros	59
6.1.2. Poder, coeficiente de variação e intervalo de confiança	64
6.2. INFLUÊNCIA DA ESCOLHA DO CRONOGRAMA DE COLETA	70
6.2.1. Cronograma de coleta	70
6.2.1.1. Parâmetros Farmacocinéticos	73
6.2.1.2. Perfil farmacocinético	77
6.2.1.3. Coeficiente de variação e poder	79
6.2.1.4. Intervalo de Confiança.....	81
6.3. INFLUÊNCIA DA MASSA CORPORAL - MC E DO ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA – IMC.....	83
6.3.1. Influência na concentração plasmática máxima ($C_{máx}$)	84
6.3.2. Influência na área sob a curva de zero até o último ponto de coleta (ASC_{0-t}).....	88
6.4. APLICAÇÃO DAS FERRAMENTAS DE METANÁLISE	91
6.4.1. Metildopa	91
6.4.2. Fluconazol	93
6.4.3. Lamivudina	96
6.4.4. SULFAMETOXAZOL + TRIMETOPRIMA.....	99
7. CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICES	118
APÊNDICE A – ARTIGO 01	119
APÊNDICE B – ARTIGO 02	141
APÊNDICE C – MODELO DE PLANILHA DE APLICAÇÃO DE METANÁLISES.....	163
APÊNDICE D – GRÁFICOS MOSTRANDO AS DIFERENÇAS ENTRE OS PERFIS FARMACOCINÉTICOS COM AS EXCLUSÃO DOS PONTOS DE COLETA.....	166

1. INTRODUÇÃO

Como atesta a Organização Mundial da Saúde em sua carta de princípios, “os programas de medicamentos genéricos têm sido reconhecidos como uma alternativa para melhorar o acesso aos medicamentos, tanto nos países em desenvolvimento como nos países industrializados (BRASIL, 2015a).

Com o intuito de assegurar a oferta de medicamentos de qualidade e baixo custo no mercado nacional e de fomentar o acesso da população a esses produtos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – (ANVISA) estabeleceu, em 1999, os medicamentos genéricos (QUENTAL, 2006) e permitiu a troca dos medicamentos de referência por seus genéricos (BRASIL, 1999). Já em 2014, a ANVISA publica a resolução da diretoria colegiada - RDC 58/2014, que permitiu a troca do medicamento de referência, também por similares, que tenham realizado estudos de biodisponibilidade relativa (BRASIL, 2014a).

É comum que os pacientes substituam não apenas medicamento de referência pelo genérico ou similar correspondente, mas também um genérico por outro genérico, ou um genérico por um similar, ou um similar por genérico, devido essa grande variedade de medicamentos no mercado e autorização da troca por parte da ANVISA (SCHRAMM, 2008).

Essas substituições, que é motivo de conquista para os governos e sociedade, está se tornando motivo de preocupação, com a qualidade, segurança e eficácia, para farmacêuticos, médicos e pesquisadores. Pois, na legislação atual, os estudos de biodisponibilidade relativa e bioequivalência realizados, demonstram que não há garantia para intercambiabilidade entre genéricos e similares, embora ambos tenham demonstrado, em estudos separados, serem bioequivalentes ao mesmo medicamento referência (LOPES e NEVES, 2010).

Além do mais, a legislação, não estabelece critérios rigorosos para condução dos estudos e existem poucos dados na literatura avaliando o processo de seleção dos voluntários, do cronograma de coleta e outros parâmetros que podem levar a falsos resultados e ao surgimento de vieses na condução do estudo de bioequivalência. Sabe-se que a escolha dos voluntários pode afetar o resultado do estudo, mas o real grau de impacto é muito pouco discutido na literatura e pouco conclusivo. Já em relação ao cronograma de coleta, existe uma divergência entre os estatísticos quanto a quantidade necessária e a forma de distribuição destes pontos, fazendo com que os pesquisadores elaborem os cronogramas de forma empírica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HISTÓRICO DOS DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS

Pode-se afirmar que a era de estudos de biodisponibilidade iniciou-se a partir de 1945, com a primeira publicação do conceito de disponibilidade biológica. No entanto, somente após o desenvolvimento de técnicas analíticas sensíveis durante a década de 1960, foi possível a quantificação de drogas e/ou metabólitos, inicialmente na urina e posteriormente no plasma. Possibilitando a avaliação e comparação da biodisponibilidade de diferentes formulações em voluntários, bem como a demonstração de que diferenças significativas entre estas podem ocorrer. Pouco tempo depois de desenvolvimento dessas técnicas, em 1962, o governo norte americano orientou o “*National Research Council of the National Academy of Sciences*” a avaliar cerca de 3 mil medicamentos (BRASIL, 2002). Este programa, juntamente com outras informações, foi analisado pelo *Food and Drugs Administration* – (FDA), órgão a editar as primeiras diretrizes para a realização de estudos de bioequivalência em 1977 (BRASIL, 2002).

A aplicação destas diretrizes foi ampliada no “*Drug Price Competition and Patent Term Restoration Act.*” de 1984, o qual concedia ao FDA poderes para autorizar a aprovação de medicamentos genéricos sem evidências clínicas de segurança ou eficácia, desde que a droga fosse bioequivalente ao produto inovador, entre outras exigências, simplificando o registro de versões genéricas de todos os medicamentos aprovados após 1962. A partir de então, foram dadas condições específicas para o crescimento da indústria de genéricos no mercado norte americano (MIDHA, 2009).

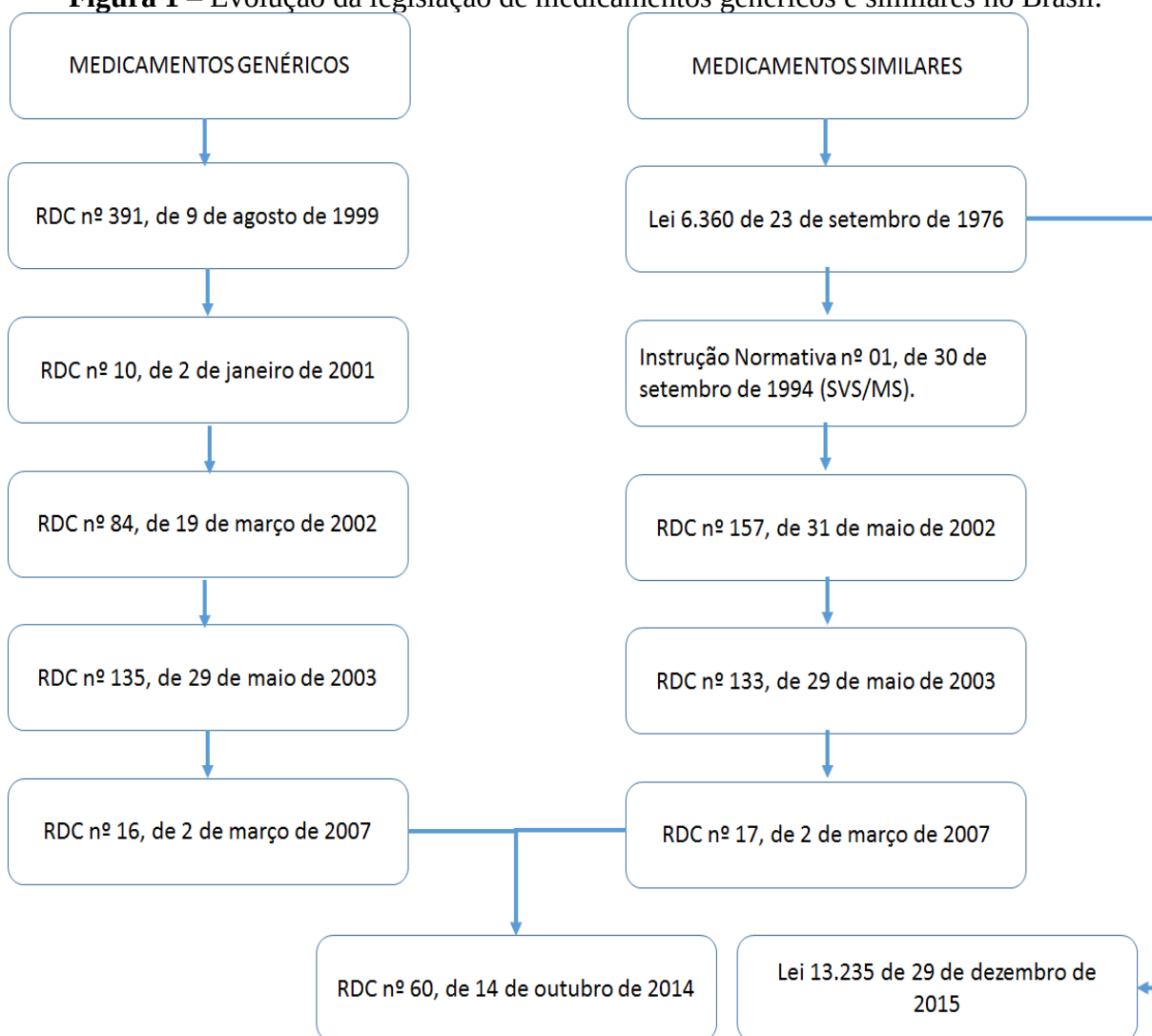
Já no Brasil, antes da lei de patentes vigorar, a cópia de medicamentos era permitida e podia ocorrer simultaneamente ao lançamento do produto no mercado internacional, sem exigência de testes de equivalência (equivalência farmacêutica e/ou terapêutica) e muito menos bioequivalência (SOUSA, 2008). Somente em 14 de maio de 1996, com a publicação da lei nº 9.279, que regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial, o Brasil começou a reconhecer e regular as patentes (MAZUQUELI, 2005; NISHIJIMA, 2014).

Em 1999, foi criado dois marcos importantíssimos para saúde no Brasil, sendo um deles com a criação da Lei nº 9.787, que institui o medicamento genérico, sendo posteriormente regulamentada pela Resolução nº 391, de agosto de 1999. E o outro marco foi a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), através da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. A Anvisa incorporou as competências da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério

da Saúde, adicionadas a novas missões: coordenação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), monitoramento de preços, registros e regulamentação do mercado farmacêutico e diversos outros itens relacionados com a saúde, entre outros (PÁDUA, 2003).

A partir da publicação destes dois marcos, houve uma evolução muito rápida das exigências e regulamentações para registro e venda de medicamentos no Brasil. Muitas resoluções foram publicadas e rapidamente atualizadas, promovendo uma transformação nas indústrias farmacêuticas nacionais. Os medicamentos similares que apresentavam resoluções menos rigorosas, foram atualizadas diversas vezes, até haver uma harmonização de suas resoluções com os medicamentos genéricos em 2014, através da RDC 60, que foi publicada em 14 de outubro (BRASIL, 2014b). Podemos observar de forma sistemática na Figura 1 a evolução da legislação de medicamentos genéricos e similares no Brasil.

Figura 1 – Evolução da legislação de medicamentos genéricos e similares no Brasil.



Fonte: Adaptado de Bedor, 2014.

No dia 16 de janeiro de 2014, o Ministro da Saúde, Alexandre Padilha, e o diretor-presidente da Anvisa, Dirceu Barbano, lançaram a consulta pública 01/2014 (BRASIL, 2014c), com proposta de que os similares sirvam de substitutos aos medicamentos de referência, como já ocorre com os produtos genéricos. Neste mesmo ano, no dia 13 de outubro, a ANVISA publica a RDC nº 58 que estabelece os procedimentos para a intercambialidade de medicamentos similares com o medicamento de referência. A medida vai representar uma ampliação da oferta ao consumidor, que terá à sua disposição medicamentos que comprovam a igualdade com os produtos de referência ou de marca, como também são conhecidos (BRASIL, 2014a). Na Figura 2 é mostrado o fluxo de como pode ser realizado a intercambialidade dos medicamentos no Brasil, de acordo com as normas da RDC 58/2014.

Figura 2 – Fluxo da intercambialidade de medicamento estabelecida pela legislação brasileira.

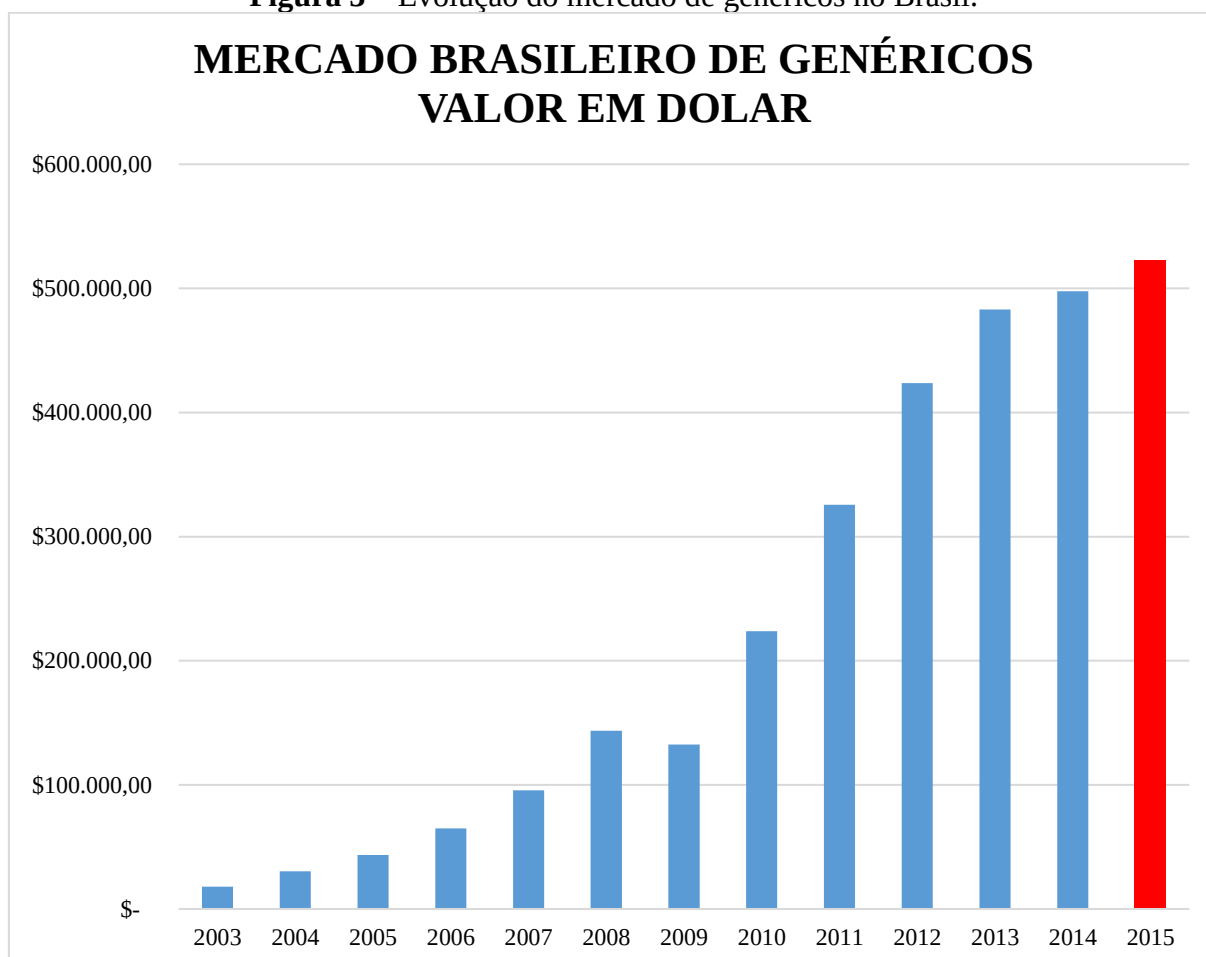


Fonte: DAVID, 2016.

Por último, em 29 de dezembro de 2015, foi sancionada pela presidente Dilma Rousseff a lei nº 13.235 que altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, para equiparar o controle de qualidade de medicamentos similares ao de medicamentos genéricos (BRASIL, 2015).

De acordo com esses fatos, o medicamento genérico trouxe inúmeros benefícios à população. Porém, a finalidade principal do governo ao instituir o medicamento genérico foi aumentar o acesso da população mais carente aos medicamentos (PÁDUA, 2003). Na Figura 3 podemos observar o crescimento do consumo dos medicamentos genéricos no Brasil entre os anos de 2003 e 2015.

Figura 3 – Evolução do mercado de genéricos no Brasil.



Fonte: IMS Health.

2.2. ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

Os estudos de biodisponibilidade, bioequivalência foram iniciados no Brasil em 1989, através do professor Gilberto de Nucci, quando idealizou neste mesmo ano, a Unidade de Farmacologia Clínica Miguel Servet (Unicamp-SP). Em 1992, a professora Elisabete Moraes iniciou às atividades da Unidade de Farmacologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (Unifac). Já em 1997, o professor Gilberto de Nucci fundou a Unidade Analítica Cartesius no Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Todavia, somente em 2000 foi publicada a Resolução - RDC nº 41, de 28 de abril, com os critérios mínimos para

aceitação das unidades que realizam estudo de bioequivalência, no entanto, as inspeções dos centros de bioequivalência pela Anvisa só foram iniciadas em 2001 (CAVALCANTI, 2005; MORAES e MORAES, 2016).

A biodisponibilidade é definida como sendo a velocidade e extensão com que um fármaco ou pró-fármaco chega a corrente sanguínea ou sitio. Avaliando assim, o processo de liberação e absorção do medicamento (KANO, 2008). Já bioequivalência é a demonstração que dois medicamentos são equivalentes farmacêuticos (isto é, apresentam a mesma forma farmacêutica, dosagem (concentração molar) e mesmo sal do medicamento referência), e sua taxa e extensão de absorção (biodisponibilidade) do fármaco ou pró-fármaco não mostram uma significativa diferença estatística quando comparado ao medicamento referência utilizado no estudo (CHOW, 2014).

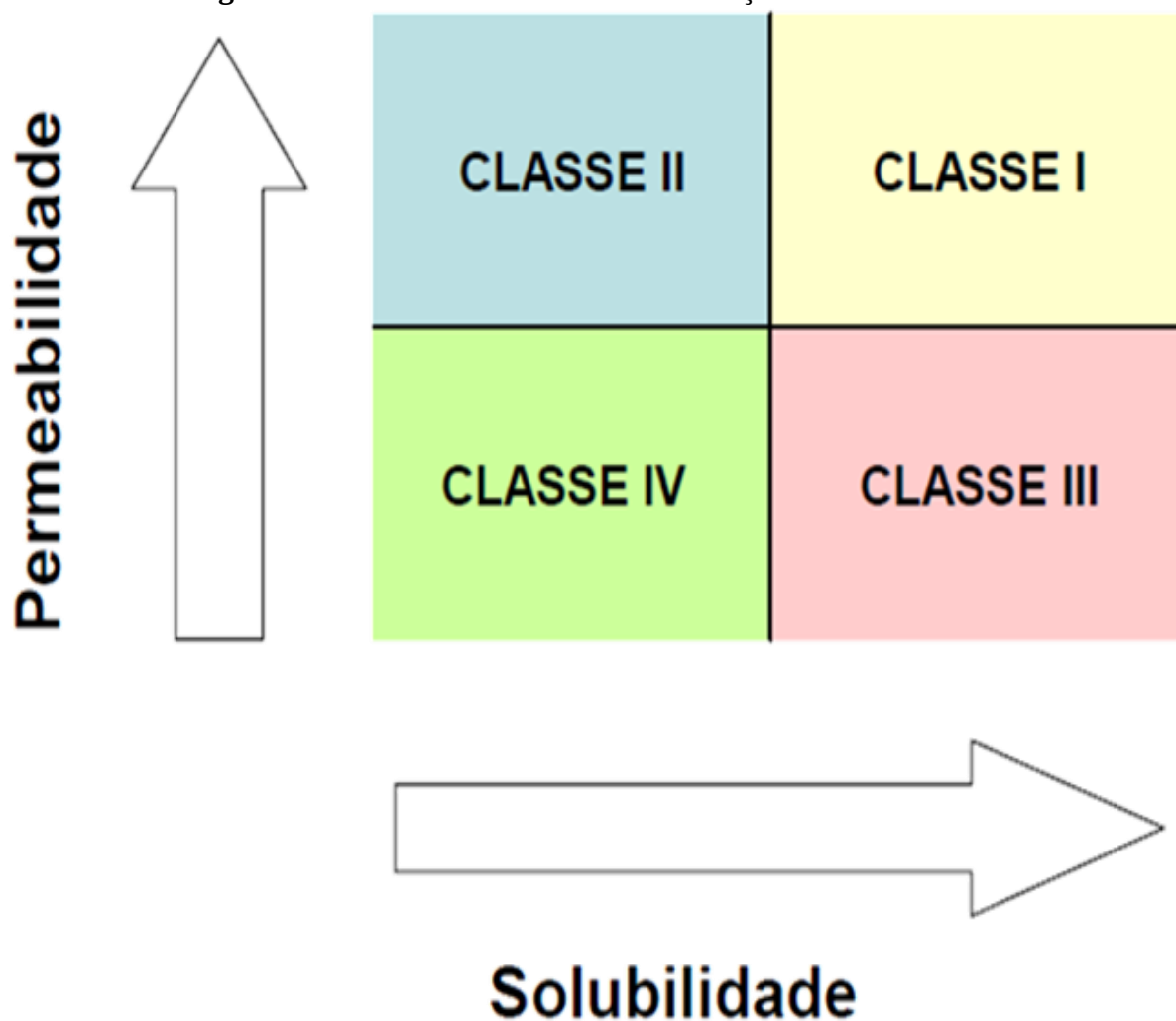
Atualmente, os estudos de bioequivalência são imprescindíveis para registro da maioria dos medicamentos genéricos e similares no Brasil, no entanto, alguns medicamentos, de acordo com suas características específicas são isentos destes estudos, ou então, tem a bioequivalência substituída por estudos farmacodinâmicos ou a realização de perfis de dissolução em aparatos especiais. A RDC Nº 37, de 3 de agosto de 2011, estabelece e separa em três, os principais critérios para isenção da bioequivalência, sendo eles: bioisenção em razão da forma farmacêutica; bioisenção para as demais dosagens; bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) (BRASIL, 2011a).

Os medicamentos isentos em razão da forma farmacêutica são as soluções aquosas ou oleosa, os pós que após reconstituição formem uma solução, os medicamentos orais que contenham fármacos de ação local no trato gastrointestinal, e por último, a formas tópicas com efeito local. Para a bioisenção em relação as demais dosagens, é realizado um estudo de bioequivalência com a maior dose e se as menores doses tiverem uma formulação proporcional e uma farmacocinética linear, ficam isentos da realização do estudo de bioequivalência. Já a bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) (Figura 4 Figura 4) é utilizada para medicamentos de alta solubilidade e tenha o nome no adendo da Instrução Normativa nº 4 de 3 de agosto de 2011 (BRASIL, 2011b).

No caso da bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica, o requerente deverá apresentar dados comprobatórios da rápida dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica, ou seja, no mínimo 85% do fármaco deverão dissolver-se em até 30 minutos, em todas as condições testadas, quando se utiliza 900 ml de meio de dissolução nos pHs 1,2; 4,5 e 6,8. Para que a isenção seja aceita, o produto teste deverá ser comparado ao produto referência, e seu perfil de dissolução, em todos os meios de dissolução testados, deverá

ser estatisticamente semelhante ao perfil de dissolução do produto de referência (BRASIL, 2011b). Para estes medicamentos, não serão necessários estudos de bioequivalência e os estudos *in vitro* (perfil de dissolução) serão utilizado como critério de determinação da bioequivalência (KANO, 2008).

Figura 4 – Gráfico do sistema de classificação biofarmacêutica.

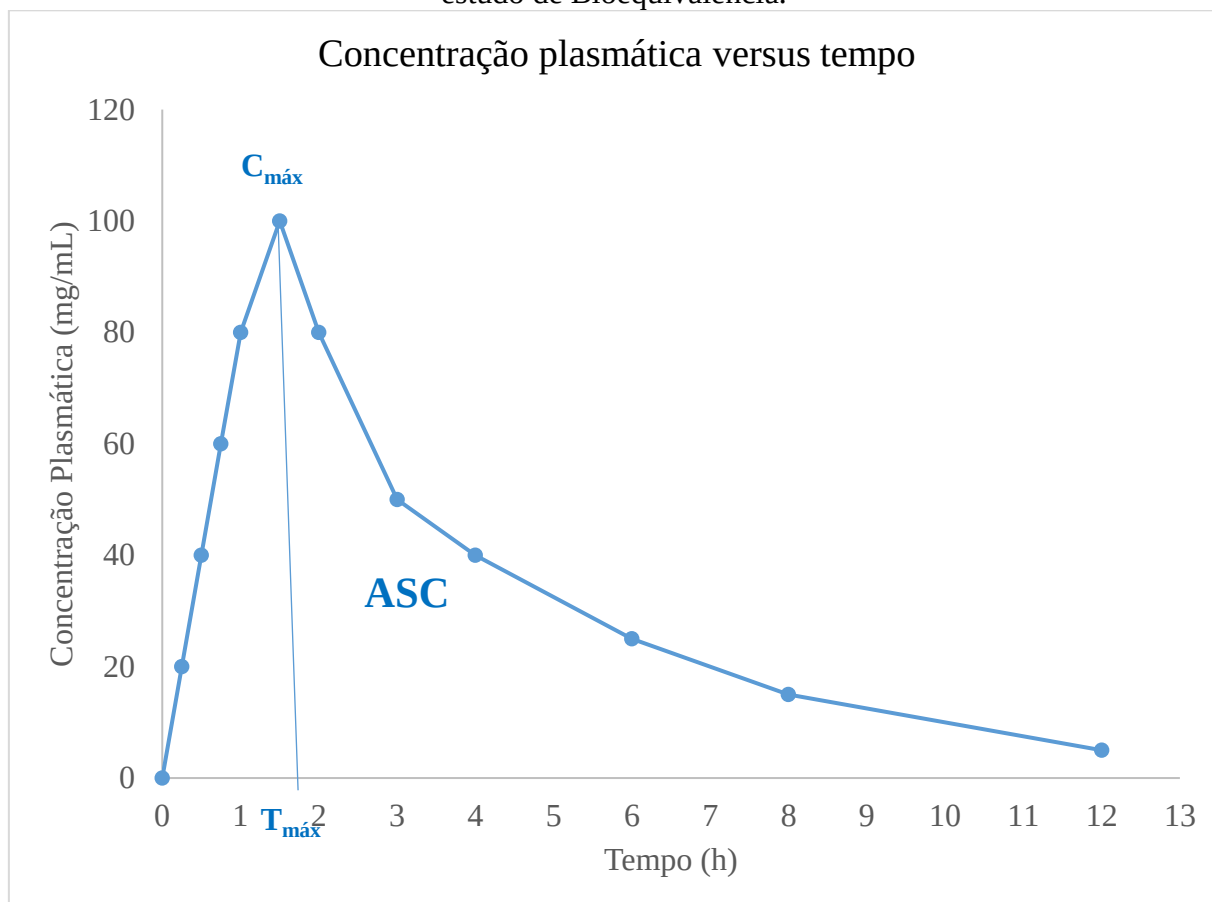


Fonte: (Adaptado de Campos, 2008)

2.2.1. Parâmetros farmacocinéticos

A bioequivalência avalia os parâmetros que melhor correlaciona o efeito terapêutico do medicamento no organismo e que são capazes de serem quantificados com precisão. No caso, os parâmetros avaliados são a concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$), a área sob a curva (ASC) e o tempo para obtenção da concentração máxima ($T_{m\acute{a}x}$) (STORPIRTIS e CONSIGLIERI, 1995; STORPIRTIS, 1999). Os parâmetros avaliados na bioequivalência são apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática dos principais parâmetros farmacocinéticos de um estudo de Bioequivalência.



Fonte: autoria própria

2.2.1.1. Concentração Máxima ($C_{máx}$)

A concentração máxima ($C_{máx}$) é o momento temporal onde é observado a maior concentração do medicamento na matriz biológica após sua administração, sendo diretamente proporcional a quantidade do fármaco absorvida. A quantidade de fármaco geralmente é expressa em termos de sua concentração relativa a um volume específico de sangue, soro ou plasma (ZAMAN, 2016).

Para que um medicamento seja considerado bioequivalente pela ANVISA, um dos critérios, é que o intervalo de confiança de 90% para o $C_{máx}$ fique entre 80 e 125%. Como este intervalo é fixo (BRASIL, 2003c), independentemente do medicamento, gera problemas potenciais para os medicamentos de alta variabilidade e para os de baixo índice terapêutico. No caso de alta variabilidade, o problema é para indústria, pois para que estes medicamentos fiquem dentro do intervalo estabelecido é necessário a realização de estudos com grande quantidade de voluntários ou a utilização de desenhos replicados (BRAGA, 2008). Porém estes

estudos são muito mais caros e não garantem que os medicamentos fiquem dentro do intervalo e muitas indústrias desistem de tentarem produzir estes medicamentos no Brasil. Já no caso de medicamentos de baixo índice terapêutico, o problema é para o paciente, pois o intervalo de 80-125% muitas vezes ultrapassa a margem de segurança/eficácia do produto, fazendo com que surja eventos adversos ou que o produto não desenvolva o efeito desejado (WARD, 2011).

Para resolver esses problemas, algumas agências saíram na frente da ANVISA e estabeleceram intervalos de confiança diferentes, de acordo com o coeficiente de variação intrassujeitos do medicamento. Para alta variabilidade, Arábia Saudita estabeleceu um intervalo fixo de 75-133% e não é necessário justificativa técnica. Nos países do sudeste asiático, que inclui Singapura e outros, o intervalo é 75-133%, mas precisa ser justificado cientificamente. Já na Europa, a *European Medicines Agency* - EMA estabeleceu um critério mais complexo e flexível (Tabela 1), onde o intervalo varia de acordo com a variabilidade do medicamento, no entanto, o fabricante precisa comprovar essa variabilidade através de estudos replicados, com 3 ou 4 períodos (TAMBOLI, 2010). No caso dos medicamentos de baixo índice terapêutico, as agências do Japão, Europa e da Arábia Saudita reduziram o intervalo de confiança para 90-111%, aumentando assim a segurança, reduzindo o risco de eventos adversos e falta de eficácia (DAVIT, 2013).

Tabela 1 – Relação de intervalo de confiança por coeficiente de variação intrassujeito da EMA.

Coeficiente de variação intrassujeito (CV%)	Limite Inferior	Limite Superior
30	80,00	125,00
35	77,23	129,48
40	74,62	134,02
45	72,15	138,59
≥50	69,84	143,19

Fonte: Adaptado de TAMBOLI, 2010.

2.2.1.2. Tempo de Concentração Máxima ($T_{m\acute{a}x}$)

O tempo de concentração máxima representa o momento temporal onde é verificado a maior concentração do fármaco na matriz biológica desejada após sua administração. Quando mais rápida for a absorção do fármaco, mais rápido será esse tempo. As formas farmacêuticas convencionais, como comprimidos ou cápsulas, a $C_{m\acute{a}x}$, normalmente ocorre em apenas um ponto, denominado $T_{m\acute{a}x}$ (PITTA, 2004). A resolução RE nº 1170, de 19 de abril de 2006, estabelece que o $T_{m\acute{a}x}$ deve ser obtido diretamente, sem interpolação dos dados, utilizando de teste não paramétricos, onde será analisado a diferença individual (= $T_{m\acute{a}x}$ (teste -

referência), construindo-se IC de 90%. No entanto, só será considerado para determinação da bioequivalência quando clinicamente relevante (BRASIL, 2006).

2.2.1.3. Área sob a curva (ASC)

A ASC é uma representação gráfica da concentração do fármaco na matriz biológica versus o tempo após a administração da dose do medicamento. Esta área é medida matematicamente, por um método conhecido por método dos trapezoides, do tempo zero ao tempo t (ASC_{0-t}), onde t é o tempo relativo à última concentração determinada experimentalmente (último ponto de coleta). O último ponto de coleta deve ser de pelo menos 3 a 5 vezes a meia vida plasmática do medicamento. No caso de fármacos que apresentam meia-vida de eliminação longa (superior a 24 horas), poderá ser utilizado um cronograma de coletas alternativo, no mínimo de 72 horas, que possibilite a determinação da área sob a curva truncada (ASC_{0-72}), ou um estudo paralelo. Este estudo onde é utilizado um cronograma alternativo até 72 horas, é chamado de estudo truncado. Calcula-se também a área sob a curva do tempo zero ao tempo infinito ($ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + Ct/Ke$), onde Ct é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente e Ke é a constante de eliminação da fase terminal. A ASC_{0-t} deve ser igual ou superior a 80% da $ASC_{0-\infty}$. Nos estudos truncados, não é necessário a realização do cálculo da $ASC_{0-\infty}$ e a determinação da ASC_{0-t} ser igual ou superior a 80% da $ASC_{0-\infty}$ (BRASIL, 2006).

2.2.1.4. Meia vida ($t_{1/2}$) e constante (Ke) de eliminação do fármaco

A meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) estabelece o período de tempo em que a concentração do fármaco na matriz biológica é reduzida à metade. Calcula-se através do logaritmo neperiano ($\ln$) de 2 ($\ln 2 = 0,693$) dividido pela constante de eliminação $t_{1/2} = \ln 2 / Ke$ (SANFELICE, 2005). A meia vida de eliminação é uma variável dependente, diretamente relacionado com o volume de distribuição e inversamente com a depuração. Já a constante de eliminação (Ke) é estimada pela inclinação da reta da regressão linear, obtida pelo método dos mínimos quadráticos, do tempo x logaritmo da concentração (GUIMARÃES, 2005). As alterações na distribuição de drogas, bem como na velocidade de eliminação podem alterar a meia vida e a constante de eliminação do fármaco (GREENBLATT, 1985). Estes parâmetros não são preditivos para determinação da bioequivalência, mas devem ser expressos nos relatórios de bioequivalência (BRASIL, 2006).

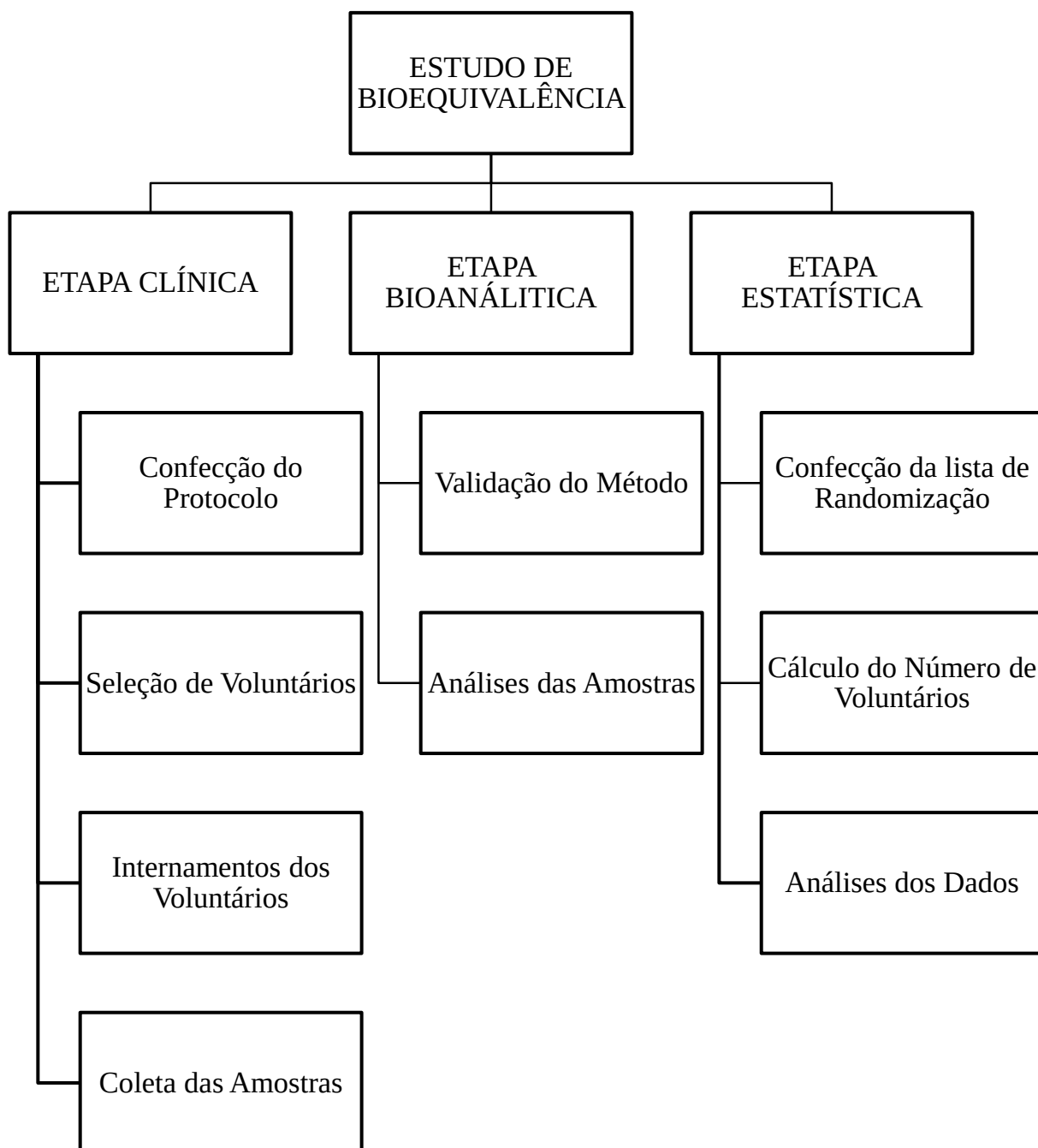
2.2.2. Etapas dos estudos de bioequivalência

Os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência devem contemplar três etapas: clínica, analítica e estatística, e devem ser planejados conforme o guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos (BRASIL, 2006). Até 2014, os centros de bioequivalência deveriam solicitar certificação a Anvisa para as três etapas acima informadas, no entanto, a partir da publicação da RDC 56/2014 ficou definido que a etapa estatística ficaria dentro da etapa clínica e a analítica seria chamada de bioanalítica. Portanto, após essa publicação, os centros responsáveis pela etapa clínica, deverão obrigatoriamente realizar a etapa estatística. Outra alteração importante estabelecida nesta resolução é a validade da certificação de boas práticas do centro, que passou de um para dois anos (BRASIL, 2014d).

Antes da realização de qualquer estudo de bioequivalência é necessário a realização e a aprovação da equivalência farmacêutica entre os medicamentos teste e referência. O perfil de dissolução, também é obrigatório, mas não é necessário a demonstração da similaridade entre os medicamentos para que a bioequivalência ocorra (BRASIL, 2006; PIOTO, 2006).

O estudo de bioequivalência é iniciado com o desenho do estudo e confecção do protocolo clínico. Para confecção deste protocolo é necessário o trabalho conjunto das três etapas do estudo, pois é necessário a determinação desde a quantidade de voluntário até a técnica analítica utilizada para quantificação das amostras (BRASIL, 2000).

Embora atualmente a etapa estatística esteja legalmente dentro da etapa clínica, esta será separada neste documento para fins didáticos. A seguir tem-se o organograma com as principais atividades de cada etapa na Figura 6.

Figura 6 – Organograma de estudo de bioequivalência.

Fonte: autoria própria

2.2.2.1. Etapa Clínica

A etapa clínica compreende desde o recrutamento dos voluntários até o último retorno para acompanhamento pós-estudo e é iniciada logo após a aprovação do protocolo clínico em um comitê de ética em pesquisa (BRASIL, 2000; BRASIL, 2012b).

O desenho convencional de um estudo clínico de bioequivalência é o aberto, aleatório, cruzado, dose única, em jejum e com voluntários sadios. Neste desenho cruzado, os voluntários são divididos em dois grupos (sequências) com quantidades iguais e de forma aleatória, sendo um grupo (sequência) TR e o outro RT. A sequência TR receberá o medicamento teste no primeiro período e o medicamento referência no segundo período. Já na sequência RT, o procedimento será invertido, ou seja, no primeiro período tomará o medicamento referência e no segundo o medicamento teste. (SOUZA FILHO, 2010; BRASIL, 2003d).

Os desenhos cruzados são os mais indicados para realização da bioequivalência e só não utilizados para medicamentos que apresentam uma meia vida muito longa ou em casos excepcionais, onde é indicado o estudo paralelo. Nos estudos cruzados cada indivíduo atua como seu próprio controle e remove a variabilidade interindividual do fármaco da comparação entre produtos, o que não acontece nos estudos paralelos. Estudos de doses múltiplas não são, geralmente, recomendados, uma vez que estudos de dose única são mais sensíveis a diferenças nas formulações. Entretanto, os estudos de dose múltipla podem ser utilizados nos casos em que, reconhecidamente, os mesmos reduzam a variabilidade intra-individual no processo de absorção do fármaco (CHOW e LIU, 2000; BRASIL, 2003d, BRASIL, 2006).

O intervalo de tempo entre os períodos é determinado pela Resolução RE nº 1170, de 19 de abril de 2006, que estabelece que deve ser o suficiente para que todo o fármaco ou metabólito ativo administrado no primeiro período tenha sido eliminado do organismo e não interfira na quantificação do período seguinte. Este tempo deve ser de no mínimo o equivalente a sete vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou metabólito ativo, e é conhecido como *washout*. O tempo de *washout* é definido como o intervalo de tempo necessário entre dois tratamentos para que o efeito de um produto administrado dentro de um período não interfira no período e tratamento seguinte. Para fármacos de elevada meia-vida de eliminação, o estudo cruzado não é o mais indicado, pois o período de *washout* poderia inviabilizar a execução do estudo. (KANO, 2008; BRASIL, 2006).

Os estudos são geralmente realizados com voluntários sadios, exceto nos casos em que o medicamento seja citotóxico ou apresente reações adversas graves. Nestes casos são utilizados pacientes portadores estáveis da patologia para a qual o medicamento é indicado. Deve-se evitar indivíduos fumantes e com histórico de abuso de álcool ou drogas. Caso sejam incluídos fumantes, os mesmos devem estar identificados (BRASIL, 2006).

Os critérios de inclusão e exclusão devem garantir que os voluntários estejam saudáveis e em perfeitas condições para fornecer seu consentimento livre e esclarecido (GONÇALVES, 2005). Neste momento, é importante que os pesquisadores usem sua experiência clínica para avaliar cuidadosamente cada um dos candidatos como um ser humano completo. Essa avaliação inicial é fundamental para se determinar se um candidato a participante da pesquisa possui realmente as condições físicas, psíquicas e sociais de participar do estudo, considerando-se que uma das principais atribuições de um investigador é ver o sujeito de forma integral e zelar por seu bem-estar (OLIVEIRA, 2002, SOUZA FILHO, 2010). Quanto mais restritivos forem os critérios de inclusão e exclusão, mais homogêneas serão os voluntários do estudo (PITTA, 2004).

No momento do internamento, os voluntários deverão seguir uma dieta padronizada e nos estudos em jejum, após 8 a 12 horas de jejum, os medicamentos são administrados e, periodicamente, são retiradas amostras sanguíneas. (BAUER, 2001). Existe, também, a possibilidade de realização de estudo alimentado, neste caso deve-se administrar os medicamentos no máximo 30 (trinta) minutos após a refeição. Devem ser realizados estudos com alimentação nos seguintes casos:

- Formas farmacêuticas orais de liberação prolongada ou controlada (adicionalmente ao estudo em jejum) (BRASIL, 2006);
- Formas farmacêuticas orais de liberação retardada, que apresentam revestimento gastrorresistente, quando houver indicação na Lista 1- Forma de Administração da RDC 1.170/2006. Caso o fármaco não conste na lista, deve ser realizada uma consulta prévia à Anvisa para verificação da necessidade do estudo com alimentos (BRASIL, 2006);
- Formas farmacêuticas orais de liberação imediata cujos fármacos tenham a absorção influenciada pela presença de alimentos, resultando em alterações clinicamente significativas e na indicação de administração do medicamento com alimentos. Deve ser verificada a Lista 1- Forma de Administração da RDC

1.170/2006 e, caso o fármaco não conste na lista, deve ser realizada uma consulta prévia à ANVISA para verificação da necessidade do estudo com alimentos. Nos casos de dúvida, o protocolo de estudo poderá ser submetido à avaliação prévia da ANVISA (BRASIL, 2006);

2.2.2.2. Etapa Bioanalítica

A etapa bioanalítica é aquela em que o fármaco é quantificado nas amostras e deve, por essa razão, ser realizada de forma a não deixar dúvidas sobre os resultados obtidos. Esta deverá ser realizada de acordo com as normas internacionais de Boas Práticas de Laboratório (BPL) e conforme o guia para validação de métodos bioanalíticos (resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012). O método bioanalítico empregado para quantificação do fármaco em líquido biológico, deve ser descrito detalhadamente na forma de protocolo ou procedimento operacional padrão (POP) e deve ser validado para sua aplicação (BRASIL, 2006). Durante o planejamento da etapa bioanalítica, devem ser estabelecidos tanto o analito a ser quantificado (fármaco inalterado, metabólito ou pró-fármaco), quanto a matriz biológica utilizada (sangue total, plasma, soro ou urina) e o método bioanalítico adequado. O método de quantificação deve ser específico para cada analito, exato e relativamente simples, de modo a minimizar erros (BRASIL, 2003c, BRASIL, 2006, BRASIL, 2012b).

A RDC 27 estabelece os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Desse modo, deve-se primeiro desenvolver, pré-validar, validar a metodologia para somente, e só, aplicá-la com segurança. Os parâmetros a serem validados, de acordo com a RDC 27/2012, estão apresentados na Tabela 2 (BRASIL, 2012b).

Tabela 2 – Parâmetros utilizados na validação do método bioanalítico (BRASIL, 2012b).

Parâmetro	Definição
Efeito matriz	Avalia as possíveis interferências causadas pela matriz biológica.
Efeito residual (carryover)	Avalia o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente
Estabilidade	Avalia a estabilidade do fármaco e do padrão interno – (PI), nas diferentes condições desde a coleta até a análise das amostras.
Exatidão	Avalia a variação entre o valor nominal do analito e o valor obtido pelo método.
Linearidade	Faixa linear da concentração plasmática onde os resultados do detector são diretamente proporcionais a concentração do fármaco.
Limite inferior de quantificação	Menor concentração do fármaco que pode ser quantificada com - precisão e exatidão.
LIQ	
Precisão	Representação do grau de repetitividade dos resultados de análises individuais, quando provenientes de uma mesma amostra homogênea: Intraensaio: variação dos resultados realizados no mesmo dia. Interensaio: variação dos resultados realizados em dias consecutivos.
Seletividade	Verificação de interferentes no tempo de retenção do analito.

Fonte: Adaptado da resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.

2.2.2.3. Etapa Estatística

A etapa estatística deve ser iniciada, antes do início do estudo, a partir do cálculo do número adequado de voluntários para o fármaco em questão e a elaboração da lista de randomização, além da definição do delineamento adequado para o estudo (capaz de identificar e isolar a variabilidade interindividual da análise dos dados). Também faz parte do planejamento da etapa estatística, a escolha do tratamento a que serão submetidos os dados gerados na etapa bioanalítica (SHARGEL e YU, 1999; BRASIL, 2003d).

Os parâmetros farmacocinéticos são obtidos das curvas de concentração plasmática do fármaco versus tempo e analisados estatisticamente para a determinação da biodisponibilidade. Esta curva de concentração do medicamento ao longo do tempo é

caracterizada pela quantificação de um determinado número de amostras biológicas, relativas a tempos de coleta previamente estabelecidos (BRASIL, 2002e e 2003d; BOLAÑOS, 2004):

A avaliação estatística é composta basicamente pelo uso de métodos estatísticos associados à avaliação da bioequivalência, considerando o critério da bioequivalência média sob delineamento experimental *crossover* 2x2. Esta etapa deve ser conduzida segundo os critérios estabelecidos na Resolução - RE nº 898, de 29 de maio de 2003.

Para análise dos parâmetros ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e $C_{m\acute{a}x}$, os mesmos são transformados em logaritmo natural - ln, uma vez que, em geral, a distribuição dos dados transformados se aproxima mais a uma distribuição normal que os dados originais. No caso de análise estatística dos dados em escala original, deve-se apresentar justificativas (BRASIL, 2003d).

Os valores obtidos para os parâmetros $ASC_{0-\infty}$, ASC_{0-t} e $C_{m\acute{a}x}$ são utilizados para a verificação dos efeitos de sequência, de voluntário dentro da sequência, período e tratamento através da análise de variância (ANOVA). Deve-se estipular um intervalo de confiança (IC) de 90% para as relações entre os valores da ASC_{0-t} e $C_{m\acute{a}x}$ dos produtos teste e referência, que devem estar compreendidos entre 80 a 125%, utilizando-se para tal as transformações logarítmicas dos valores dos referidos parâmetros (BRASIL, 2003d).

Para análise do $T_{m\acute{a}x}$ utilizam-se testes não paramétricos pela diferença individual = teste – referência (BRASIL, 2003d).

Para os estudos truncados, não é necessário o cálculo da $ASC_{0-\infty}$, devido ao longo tempo de meia vida plasmática. Outros limites de IC de 90% poderão ser aceitos, desde que apresentem justificativas científicas, estejam previamente estabelecidos no protocolo e autorizados pela ANVISA. Nestes casos, o protocolo deverá ser enviado para ser avaliado e autorizado pela ANVISA, antes do início do estudo. Quando clinicamente relevante, o $T_{m\acute{a}x}$ deverá também ser considerado (BRASIL, 2002e; BRASIL, 2003d).

2.2.3. Parâmetros a serem considerados no planejamento dos estudos de bioequivalência / biodisponibilidade relativa

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

A variabilidade na biodisponibilidade apresentada por uma determinada formulação pode fazer com que a concentração plasmática do fármaco seja muito elevada, causando efeitos colaterais, ou muito baixa, tornando-o ineficaz (SILVA, 2007).

2.2.3.1. Número de Voluntários

O número de voluntários a ser empregado em um estudo de biodisponibilidade/bioequivalência é geralmente estabelecido com base em dados encontrados na literatura científica de estudos anteriormente realizados para o mesmo fármaco. Caso não sejam encontrados dados na literatura, é realizado um estudo piloto com uma quantidade pequena de voluntário (aproximadamente 12 voluntários). O número adequado de voluntários deve assegurar poder estatístico suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de biodisponibilidade / bioequivalência (MENDES, 2007).

Com relação ao coeficiente de variabilidade intrassujeito, quanto menor o coeficiente, menor o número de voluntários a ser empregado para a avaliação estatística de bioequivalência. Os fármacos considerados de alta variabilidade, tem um coeficiente de variabilidade intrassujeito acima de 30% e os fármacos considerados com baixa variabilidade tem um coeficiente de variabilidade intrassujeito entre 5-15% (MIDHA *et al.*, 2004).

Adicionalmente, deve-se levar em consideração os seguintes critérios estabelecidos pela legislação brasileira: número mínimo de 12 voluntários para qualquer estudo de biodisponibilidade/bioequivalência e 24 voluntários na falta de dados de estudos anteriores e de revisão de literatura para o coeficiente de variação do fármaco (BRASIL, 2006).

Quanto a determinação do número de voluntários, a legislação brasileira é semelhante à dos Estados Unidos, da Europa e do Canadá. Na japonesa, não menciona quantidade mínima de voluntários. Já a mexicana estabelece que não seja utilizado menos de 24, exceto, nos casos que apresentem justificativas científicas (DAVIT *et al.*, 2013). O protocolo do estudo deve estabelecer o número suficiente de voluntários prevendo possíveis "dropouts" (BRASIL, 2006).

Caso se conheça o coeficiente de variância intraindividual do fármaco, pode-se consultar a Tabela 3 disponibilizada pela ANVISA na Resolução – RE 898/2003, onde sugere-se a quantidade necessária de voluntários para condução do estudo e obtenção de poder superior a 80% (BRASIL, 2003d). No entanto, essa tabela é pouco utilizada, pois é pouco precisa e geralmente a quantidade de voluntários necessários para condução do estudo é bem inferior ao estimado na tabela.

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. Durante a etapa de planejamento, uma das questões mais importantes é quantos voluntários são necessários para se obter um poder desejado (por exemplo, 80%) estabelecendo bioequivalência ou não, entre duas formulações, dentro dos limites clinicamente importantes (por exemplo, 20% da média do referência). Para responder essa questão, a metodologia comumente utilizada é escolher um tamanho de amostra apropriado através do cálculo da função do poder do teste, baseado numa estimativa de coeficiente de variação intraindividual obtida através da literatura ou de um estudo piloto (BRASIL, 2003d).

Tabela 3 – Total de voluntários necessários para alcançar um poder desejado.

Poder	CV(%)	$100 \times (\mu_T - \mu_R) / \mu_R$			
		0%	5%	10%	15%
80%	10	8	8	16	52
	12	8	10	20	74
	14	10	14	26	100
	16	14	16	34	126
	18	16	20	42	162
	20	20	24	52	200
	22	24	28	62	242
	24	28	34	74	288
	26	32	40	86	336
	28	36	46	100	390
	30	40	52	114	448
	32	46	58	128	508
	34	52	66	146	574
	36	58	74	162	644
	38	64	82	180	716
	40	70	90	200	794
90%	10	10	10	20	70
	12	10	14	28	100
	14	14	18	36	136
	16	16	22	46	178
	18	20	28	58	224
	20	24	32	70	276
	22	28	40	86	334
	24	34	46	100	396
	26	40	54	118	466
	28	44	62	136	540
	30	52	70	156	618
	32	58	80	178	704
	34	66	90	200	794
	36	72	100	224	890
	38	80	112	250	992
	40	90	124	276	1098

Fonte: (ANVISA, 2003d).

2.2.3.2. Gênero dos voluntários

A grande maioria dos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência é realizada em voluntários de ambos os sexos, no entanto, as normas de escolha do gênero da população utilizada pode variar entre as agências reguladoras (RIKU *et al.*, 2010). No Brasil, a ANVISA estabelece que os estudos podem ser conduzidos em voluntários do sexo masculino, feminino ou ambos, sendo que neste último caso, o número de homens e de mulheres deverá ser distribuído igualmente entre as sequências. Se o medicamento for indicado para pacientes com características específicas de idade e sexo, o estudo deverá ser integralmente realizado em voluntários com essas características. No caso de estudos com contraceptivos, o estudo deve ser realizado com mulheres em idade fértil (BRASIL, 2006). Já nos estudos com isotretinoína, retinóide que inibe a função das glândulas sebáceas e a queratinização (THIBOUTOT, 2006; GEORGALA *et al.*, 2005), deverá ser realizado em homens, devido ao potencial risco teratogênico da droga.

Essa exigência, de igualdade entre os gêneros só é observada na legislação brasileira dentre as outras pesquisadas. Na China, recomenda-se que o recrutamento seja de voluntários do sexo masculino. No entanto, a população do estudo deve ser determinada com base na situação específica para cada medicamento; se forem recrutadas voluntárias do sexo feminino, elas não podem estar grávidas (CHINA, 2005). Nos Estados Unidos, Europa, Canadá e Coréia do Sul, podem ser utilizados voluntários do sexo feminino, e/ou masculino, sem a exigência da igualdade entre os grupos quando for realizado um estudo com ambos os gêneros (ESTADOS UNIDOS, 2003; CANADÁ, 2012; EUROPA, 2010). Na legislação japonesa, não menciona o gênero dos voluntários, apenas informa que deverão ser recrutados voluntários adultos saudáveis (JAPÃO, 2012). Já no México, a legislação estabelece que seja utilizado homens ou mulheres, mas nunca ambos juntos no mesmo estudo, para evitar as diferenças farmacocinéticas relacionadas ao gênero (DAVIT *et al.*, 2013).

Existem diferenças biológicas entre homens e mulheres que podem resultar em respostas diferentes para os fármacos. Em média, os homens apresentam maior tamanho corporal que as mulheres, resultando em maior volume de distribuição e eliminação total mais rápida para a maioria dos medicamentos. A maior gordura corporal nas mulheres pode aumentar o volume de distribuição de drogas lipossolúveis. A absorção total do fármaco parece não ser afetada pelo o sexo, embora as taxas de absorção possam ser ligeiramente mais lentas em mulheres. Mudanças na biodisponibilidade relacionada ao sexo dependerão da via de

administração, do local de absorção, do transportador utilizado e do metabolismo de primeira passagem pelo o intestino e fígado. (SCHWARTZ, 2003).

2.2.3.3. Cronograma de coleta

Os pontos de coleta devem ser numerosos, ao mesmo tempo precoces e tardios. É muito importante enquadrar o $C_{\text{máx}}$ com pelo menos cinco pontos de coleta. Pelo menos quatro coletas antes e oito coletas depois do $C_{\text{máx}}$ do fármaco avaliado (LEBLANC et al., 1997).

Tempos de coleta adequados devem garantir a caracterização do perfil farmacocinético do fármaco, sendo desta forma, necessário assegurar:

- determinação mais eficiente possível do $C_{\text{máx}}$ através das coletas de amostras suficientemente próximas a região do intervalo de tempo previsto para a ocorrência do $T_{\text{máx}}$;
- coletas de amostras na fase de eliminação, geralmente, coletas entre 3 e 5 meias-vidas do fármaco;
- % $ASC_{0-\infty}$ extrapolada menor que 20% para mais de 90% dos voluntários;
- coletas de amostras que possuam níveis quantificáveis, por razões de ordem ética;

O estudo de bioequivalência convencional envolve a determinação das curvas de decaimento sanguíneo do fármaco ou metabólito ativo em função do tempo. A partir destas curvas determinam-se os parâmetros farmacocinéticos utilizados na avaliação da bioequivalência e que são, basicamente, a concentração sanguínea máxima do fármaco ou metabólito ativo ($C_{\text{máx}}$), e a área sob a curva de decaimento sanguíneo do fármaco (ASC) (BRASIL, 2006; UNITED STATES, 2004). Assim, a precisão na medida destes parâmetros determina a confiabilidade dos estudos de bioequivalência (KONG e GONIN, 2000).

A definição do cronograma de coleta de amostras biológicas depende do profundo conhecimento das características farmacocinéticos do fármaco ou metabólito ativo. A frequência de coleta deve permitir a estimativa da concentração plasmática máxima do fármaco ou metabólito ativo na corrente circulatória e da área sob a curva total. O intervalo entre as coletas deve permitir a descrição das fases de absorção e eliminação, podendo ser aumentado durante a fase de pós-absorção, mas não deve ser superior à meia-vida de eliminação do fármaco (NATION, 1994). Além disso, o cronograma de coleta de amostras deve ser idêntico nos dois períodos (UNITED STATES, 2004).

Para que o cronograma de coletas de amostras permita a descrição da fase de absorção é importante que sejam previstos, no mínimo, dois tempos de coleta, excetuando-se o tempo zero, antes de $C_{\text{máx}}$.

Um cronograma adequado de coleta de amostras deve garantir a precisão na determinação dos parâmetros farmacocinéticos utilizados na avaliação da bioequivalência. Assim, intervalos muito grandes entre as coletas podem impossibilitar a determinação do parâmetro farmacocinético $C_{\text{máx}}$, além de introduzir erros no cálculo de ASC. Por outro lado, o aumento do número de coletas expõe os voluntários a maiores riscos e desconfortos, além de resultarem em complexidade na execução da fase clínica do estudo e aumento de custos tanto para a coleta quanto para a quantificação do fármaco ou metabólito ativo nas amostras biológicas.

MARZO e MONTI (1998) sugerem que quinze a vinte amostras seriam suficientes para determinação dos parâmetros farmacocinéticos. Já KONG e GONIN (2000) desenvolveu um estudo estatístico e concluiu, a partir de simulações, que o número ideal de tempos de amostragem deve variar de seis a oito.

2.2.3.4. Influência da idade

O recém-nascido apresenta pH gástrico situado entre 6 e 8. Atinge os valores semelhantes a um adulto aos três anos de idade, mas o tempo de esvaziamento gástrico é comparável aos do adulto desde os oito meses. No idoso, o pH é mais elevado que no adulto jovem. A biodisponibilidade pode, assim, variar segundo a idade. A tobramicina e a gentamicina têm biodisponibilidade maior no recém-nascido do que no adulto, devido a essa diferença de pH (LEBLANC et al., 1997). Os recém-nascidos apresentam capacidade de excreção renal e fenômenos enzimáticos responsáveis pela biotransformação pouco desenvolvidos, e em idosos alterados, ocasionando retardo na metabolização e depuração e aumento da meia vida plasmática e biodisponibilidade de muitos medicamentos (ZANINI, 1994).

As crianças têm igualmente uma imaturidade hepática que pode ter incidência no metabolismo de primeira passagem. Por exemplo, na criança a ampicilina é menos metabolizada pelo fígado do que no adulto, apresentando uma maior biodisponibilidade (LEBLANC ET AL., 1997).

Nos idosos, conjugam-se vários fatores: aumento do pH gástrico, diminuição da superfície útil do intestino, da motilidade intestinal, do débito sanguíneo e da capacidade de

eliminação. Assim, a biodisponibilidade do clormetiazol, que é menos metabolizado pelo fígado, aumenta, enquanto que o nitrazepam, menos absorvido pelo o intestino, diminui (LEBLANC ET AL., 1997).

2.2.3.5. Influência do peso e índice de massa corporal - IMC

Em indivíduos obesos, fármacos lipofílicos apresentam maior volume de distribuição. O tecido adiposo pode servir como tecido de reserva, onde o mesmo retém o fármaco e o libera continuamente, alterando a velocidade de eliminação e o efeito terapêutico do medicamento (SCHWARTZ, 2003).

De acordo com as normas brasileiras, o IMC dos voluntários deverá estar em um limite de $\pm 15\%$ do peso considerado normal para homens e mulheres, levando-se em consideração altura e estrutura física. No caso de contraceptivos, recomenda-se que o limite de peso seja de $\pm 10\%$ (BRASIL, 2006).

No entanto, o IMC não é um critério que ajusta de forma correta a área corporal do voluntário, pois um voluntário de 2 m de altura poderá ter um IMC menor que um voluntário de 1,5 m. Por exemplo, um voluntário com 2 m e 98 kg vai ter um IMC de 24,5, já um voluntário 1,5 m e 60 kg vai ter um IMC de 27,02.

Dependendo das características físico-químicas do fármaco, o peso, a área corporal e quantidade de gordura, podem afetar significativamente na distribuição do medicamento no corpo e conseqüentemente em seus parâmetros farmacocinéticos.

2.3. METANÁLISE APLICADA NA AVALIAÇÃO DA INTERCAMBIALIDADE ENTRE MEDICAMENTOS DE ESTUDOS INDEPENDENTES

No século 17, o matemático e filósofo francês Blaise Pascal desenvolveu formas matemáticas para lidar com a probabilidade em jogos de azar, fazendo com que uma ciência que lidava quantitativamente com as observações variadas começasse a surgir. Considerando essas mesmas abordagens matemáticas foi possível determinar a melhor maneira de comparar e combinar observações feitas por diferentes astrônomos. No século 17, ainda não foi possível a distinção forte e clara entre as observações dentro de um determinado estudo como são feitas hoje, todavia, resumiu os resultados de diferentes estudos. Estas ideias foram abordadas e

aprofundadas nos séculos 18 e 19 por astrônomos e matemáticos, como Gauss e Laplace (O'ROURKE, 2007).

Mas foi somente no século 20, que os estatísticos começaram a utilizar as ferramentas de probabilidade para resumir os resultados de diferentes ensaios clínicos com desfechos semelhantes (O'ROURKE, 2007). No entanto, o termo metanálise começou a ser utilizado em 1976, por Gene Glass, para referir-se a uma combinação estatística de dois ou mais estudos primários independentes, numa abordagem quantitativa (PINTO, 2013).

A metanálise é o método estatístico que geralmente é aplicado à revisão sistemática pois integra os resultados. O termo metanálise é comumente usado para se referir às revisões sistemáticas com metanálise, mas pode ser utilizado em todos os momentos onde são analisados os resultados dos estudos primários independentes. O prefixo meta tem origem no grego e significa além, transcendência, reflexão crítica sobre. A grafia da palavra frequentemente gera discussão, podendo existir três formas distintas em português: metanálise, meta-análise e metaanálise.

A avaliação dos riscos da intercambialidade de medicamentos deve ser analisada à luz não apenas dos resultados de bioequivalência, mas também da faixa terapêutica e da variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos relacionados à biodisponibilidade. De acordo com estas características os fármacos podem ser divididos em quatro classes: A, fármacos de estreita faixa terapêutica e alta variabilidade, como a ciclosporina; B, fármacos de estreita faixa terapêutica e baixa variabilidade, como a teofilina; C, fármacos de ampla faixa terapêutica e baixa variabilidade, como a amoxicilina e a maioria dos fármacos; e D, fármacos de ampla faixa terapêutica e alta variabilidade, como a clorpromazina. Os riscos para o paciente associado à intercambialidade são maiores para os medicamentos contendo fármacos de classe A, seguidos pelos de classe B e D, os medicamentos contendo fármacos de classe C são os que apresentam menores riscos.

Os medicamentos genéricos e similares não necessitam da realização de estudos de bioequivalência / biodisponibilidade relativa entre eles. Portanto, se o medicamento de marca e seus genéricos podem ser usados alternadamente, tornou-se uma preocupação de segurança a realização deste tipo de teste. Para resolver esse problema Chow e Liu (1997) propuseram a realização de uma metanálise, que seria como uma bioequivalência da bioequivalência média. A ideia de uma metanálise é fornecer um panorama da bioequivalência entre medicamentos genéricos com base em dados de estudos de bioequivalência independentes. O objetivo é avaliar não só a bioequivalência entre medicamentos genéricos do mesmo medicamento de marca, mas também para fornecer uma ferramenta para monitorar o desempenho dos genéricos aprovados

do mesmo medicamento de marca. Chow e Liu (1997), fazem uma abordagem um pouco restritiva, pois uma forte suposição de variâncias inter e intrassujeitos são necessárias, o que limita sua utilização na prática. Para resolver este problema, Chow e Shao (1999) propõem um método alternativo para a metanálise, que desconsidera a suposição de variâncias inter e intrassujeitos. A metanálise alternativa proposta aumenta o poder estatístico quando a variabilidade interindividual não é muito grande.

2.3.1. Método de Chow e Liu para a Meta-análise

O método que foi utilizado neste trabalho, supões a existência de H estudos de bioequivalência diferentes, cada um comparando um medicamento genérico (T) com o mesmo medicamento referência (R). Para combinar esses H estudos, (Chow, 1997), foi proposta a realização de uma metanálise para se ter uma revisão sistemática da bioequivalência entre medicamentos genéricos de um mesmo fármaco de referência.

Para realizar uma metanálise combinando H estudos independentes, é necessário seguir os seguintes pré-requisitos abaixo:

1. O mesmo delineamento *crossover* 2x2 (experimento cruzado de 2 períodos e 2 sequências) ter sido utilizado com n_{h1} e n_{h2} indivíduos nas sequencias 1 e 2 respectivamente, onde $h=1,...,H$;
2. O mesmo modelo estatístico *crossover* 2x2 definido por (Chow, 1997) ter sido usado para estudar a bioequivalência baseado nos dados log-transformados;
3. As variabilidades interindividuais, ou seja, a variação entre os voluntários, ter sido equivalente em todos os estudos ($\sigma_{Sh}^2 = \sigma_S^2$ para todo h);
4. As variabilidades intra-indivíduos, ou seja, a média da variação dentro dos voluntários, ter sido equivalente para todos os estudos ($\sigma_{eh}^2 = \sigma_e^2$ para todo h).

Considere μ_{Rh} e μ_{Th} as verdadeiras médias populacionais para os medicamentos de referência e o h -ésimo medicamento de teste respectivamente ($h=1,...,H$). Denota-se por $\bar{Y}_{Rh}$ e $\bar{Y}_{Th}$ as médias dos mínimos quadrados para os produtos de referência e de teste do h -ésimo estudo de bioequivalência, respectivamente.

Essas médias diferem das médias diretas das formulações T e R a menos que $n_{h1} \neq n_{h2}$, conforme descrito abaixo:

$$\bar{Y}_{Rh} = \frac{1}{2} (\bar{Y}_{.11h} + \bar{Y}_{.22h}) \text{ e } \bar{Y}_{Th} = \frac{1}{2} (\bar{Y}_{.21h} + \bar{Y}_{.12h})$$

Onde:

- $\bar{Y}_{.11h}$: é a média do medicamento R no período 1 e na sequência 1, no h -ésimo estudo;
- $\bar{Y}_{.22h}$: é a média do medicamento R no período 2 e na sequência 2, no h -ésimo estudo;
- $\bar{Y}_{.21h}$: é a média do medicamento T no período 2 e na sequência 1, no h -ésimo estudo;
- $\bar{Y}_{.12h}$: é a média do medicamento T no período 1 e na sequência 2, no h -ésimo estudo;
- A sequência de administração 1 é RT e a sequência 2 é TR, para um delineamento *crossover* 2x2.

Para combinar dados de H estudos, primeiro deve-se testar a homogeneidade dos medicamentos de referência entre os H estudos. Para um dado estudo h , a variância da média dos mínimos quadrados do produto de referência é dada por:

$$\text{Var}(\bar{Y}_{Rh}) = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{n_{h1}} + \frac{1}{n_{h2}} \right) (\sigma_e^2 = \sigma_S^2) = C_h (\sigma_e^2 = \sigma_S^2).$$

Para testar a hipótese nula de homogeneidade do medicamento de referência entre os estudos, pode-se considerar a seguinte estatística:

$$\chi_R^2 = \sum_{h=1}^H \frac{1}{C_h} (\bar{Y}_{Rh} - \hat{\mu}_R)^2.$$

Pode ser verificado que χ_R^2 segue uma distribuição qui-quadrado com $H-1$ graus de liberdade. Logo, podemos rejeitar a hipótese nula de homogeneidade ao nível α de significância se:

$$\chi_R^2 > \chi^2(\alpha, H-1),$$

onde $\chi^2(\alpha, H-1)$, é o α -ésimo quantil superior da distribuição qui-quadrado com $H-1$ graus de liberdade. Um estimador da variância para $\hat{\mu}_R$ é dado por:

$$\hat{\text{Var}}(\hat{\mu}_R) = \frac{1}{2 \sum_{h=1}^H \left(\frac{1}{C_h} \right)} (\hat{\sigma}_e^2 = \hat{\sigma}_S^2).$$

As estimativas combinadas para as variâncias intraindividuais e interindividuais podem ser obtidas por:

$$\hat{\sigma}_S^2 = \frac{\sum_{h=1}^H (n_{h1} + n_{h2} - 2) MSR_h}{\sum_{h=1}^H (n_{h1} + n_{h2} - 2)}$$

e

$$\hat{\sigma}_S^2 = \frac{\sum_{h=1}^H (n_{h1} + n_{h2} - 2) MSE_h}{\sum_{h=1}^H (n_{h1} + n_{h2} - 2)}$$

Onde MSR_h e MSE_h são as médias dos quadrados interindividuais e média dos quadrados dos erros obtidos da tabela de análise de variância dos estudos h .

No caso de não rejeição da hipótese nula de homogeneidade (i.e., conclusão pela homogeneidade), pode-se obter um estimador combinado do efeito de droga (diferença entre tratamentos R e T) e o seu intervalo de confiança correspondente.

Seja

$$\hat{d}_h = \bar{Y}_{Th} - \bar{Y}_{Rh}, h = 1, \dots, H$$

A diferença das médias dos mínimos quadrados entre os produtos teste e referência do h -ésimo estudo. Se assumíssemos que $\mu_{Th}, = 1, \dots, H$, são as mesmas para todos os estudos (i.e. $\mu_{Th} = \mu_T$ para todo h), um estimador combinado para $\mu_T - \mu_R$ é dado pelas médias ponderadas dos $\hat{d}_h$, isto é:

$$\bar{d} = \sum_{h=1}^H \left(\frac{\frac{1}{c_h} d_h}{\sum_{h=1}^H \frac{1}{C_h}} \right)$$

Portanto, pode-se obter um intervalo de confiança $(1 - 2\alpha) \times 100\%$, denotado por (L, U) como segue:

$$(L, U) = \bar{d} \pm t \left(\alpha, \sum_{h=1}^H (n_{h1} + n_{h2} - 2) \right) \sqrt{\hat{\text{Var}}(\bar{d})}$$

Onde $t[\alpha, \sum_{h=1}^H (n_{h1} + n_{h2} - 2)]$ é o α -ésimo quantil superior da distribuição t com $\sum_{h=1}^H (n_{h1} + n_{h2} - 2)$ graus de liberdade e $\hat{\text{Var}}(\bar{d})$ é um estimador de $\text{Var}(\bar{d})$ que é dado por:

$$\widehat{\text{Var}}(\bar{d}) = \frac{\hat{\sigma}_e^2}{\sum_{h=1}^H 1/C_h}$$

De forma similar, podemos calcular a bioequivalência entre dois medicamentos genéricos provenientes de dois estudos independentes, denotados por estudos h e h' . Seja $D_{hh'} = \mu_{Th} - \mu_{Th'}$, o estimador não viesado de $D_{hh'}$ é dado por:

$$D_{hh'} = (\bar{Y}_{Th} - \bar{Y}_{Rh}) - (\bar{Y}_{Th'} - \bar{Y}_{Rh'}).$$

Como um resultado, pode-se obter um intervalo de confiança $(1 - 2\alpha) \times 100\%$ para a diferença $\mu_{Th} - \mu_{Th'}$, como segue:

$$\widehat{D}_{hh'} \pm t\left(\alpha, \sum_{h=1}^H (n_{h1} + n_{h2} - 2)\right) \sqrt{\widehat{\text{Var}}(\widehat{D}_{hh'})}$$

onde

$$\widehat{\text{Var}}(\widehat{D}_{hh'}) = \frac{1}{2} \left[\left(\frac{1}{n_{h1}} + \frac{1}{n_{h2}} \right) + \left(\frac{1}{n_{h'1}} + \frac{1}{n_{h'2}} \right) \right] \hat{\sigma}_e^2.$$

Observe que se recomenda que a variância $\hat{\sigma}_e^2$ seja usada, ao invés da variância obtida apenas dos estudos h e h' , por ser àquela obtida com base nos dados de todos os estudos. Para quaisquer duas cópias genéricas de uma mesma droga referência, o intervalo de confiança acima pode ser aplicado para calcular o quanto eles são bioequivalentes entre si e, portanto, para determinar quando eles podem ser usados intercambiáveis.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência das variáveis presentes nos estudos de bioequivalência à partir da aplicação das ferramentas metanálise visando a promoção e garantia da intercambialidade.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os parâmetros farmacocinéticos, os coeficientes de variação intra e intersujeitos e a bioequivalência média dos estudos de bioequivalência / biodisponibilidade relativa utilizando os programas Microsoft Excel e WinNonlin, respeitando-se a legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.
- Verificar a influência do gênero nos parâmetros farmacocinéticos de cada formulação, na determinação da quantidade de voluntários e seus reflexos no resultado do estudo;
- Verificar a relação entre a MC e o IMC com os parâmetros farmacocinéticos, o coeficiente de variação inter e intrassujeitos e o resultado dos estudos;
- Avaliar a influência da escolha do cronograma de coleta nos parâmetros farmacocinéticos e nos intervalos de confiança dos estudos.
- Aplicar, avaliar e desenvolver forma de fácil utilização de ferramentas de metanálise atualmente propostas para avaliar a bioequivalência e intercambialidade entre medicamentos genéricos e similares de fabricantes diferentes avaliados em estudos independentes;

4. JUSTIFICATIVA

Uma melhor exatidão na definição da quantidade de voluntários propicia custos reduzidos e propicia uma maior segurança ética, pois minimiza a exposição de voluntários a procedimentos invasivos sem necessidade. A consequência direta das premissas anteriores permite aumentar a oferta de medicamentos com menores preços a população, devido ao barateamento dos estudos.

Por outro lado, uma maior quantidade de pontos de coleta em um estudo de bioequivalência conduz a resultados mais fiéis ao perfil real dos voluntários, no entanto não adianta haver uma grande quantidade de pontos sem que estes sejam distribuídos adequadamente. Uma grande quantidade de pontos demanda um grande volume de sangue coletado e aumenta significativamente os custos e desconforto aos voluntários, portanto é necessário haver um equilíbrio na escolha e distribuição destes pontos.

É muito importante verificar se existe uma relação entre a massa corporal - MC e o índice de massa corpórea – IMC com os parâmetros farmacocinéticos, os coeficientes de variação, no número de voluntários necessários para condução do estudo e suas consequências nos resultados dos estudos de bioequivalência. Essa avaliação é extremamente importante para otimizar os critérios de seleção de voluntários e diminuição dos vieses, levando a obtenção de resultados mais seguros.

Verificar a bioequivalência entre medicamentos similares, ou entre genéricos, ou entre similares e genéricos, diminui a possibilidade de surgir eventos adversos e/ou diminuição da eficácia terapêutica quando o paciente troca de fabricante de medicamentos. A utilização de ferramentas de metanálises para avaliar a bioequivalência de medicamentos em estudos independentes aumenta a segurança na troca entre genéricos e similares de fabricantes diferentes. Essa avaliação tornou-se ainda mais importante, pois recentemente a ANVISA também permitiu a troca dos medicamentos de referência por medicamentos similares, aumentando significativamente a possibilidade de trocas de fabricante de medicamento ao longo do tratamento.

5. MATERIAL E MÉTODO

Todos os estudos apresentados neste trabalho foram codificados de acordo com os procedimentos estabelecidos pelo NUDFAC e nenhum de nome de fabricante, patrocinador, voluntário e, portanto, quaisquer informações que possam comprometer a confidencialidade dos estudos foram divulgadas.

Para garantir a segurança dos participantes de pesquisa e respeitar as normas brasileiras vigentes, os medicamentos teste e referência foram submetidos ao estudo de equivalência farmacêutica antes da realização da bioequivalência, de acordo com sua monografia inscrita na Farmacopeia Brasileira ou em outros códigos autorizados, seguindo a Resolução RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010 (ANVISA) – “DISPÕE SOBRE OS REQUISITOS PARA A REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA E DE PERFIL DE DISSOLUÇÃO COMPARATIVO, A SEREM ATENDIDOS PELOS CENTROS DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA E PATROCINADOR DO ESTUDO” (BRASIL, 2010).

5.1. ETAPA CLÍNICA

5.1.1. Considerações Gerais

Todos os estudos foram conduzidos segundo protocolos clínicos previamente aprovados por comitês de ética em pesquisa e de acordo com a declaração de Helsinque (1965) e as revisões do Japão (1975), Itália (1983), Hong Kong (1989), África do Sul (1996), Escócia (2000) e Coréia do Sul (2008) além da Resolução 251/97 da CNS-MS. Aqueles que tiveram protocolo submetidos anteriormente a 2013 foram conduzidos segundo as normas da resolução 196/96 do CNS-MS, já aqueles submetidos à partir de 2013, foram realizados de acordo a resolução 466/2012 (BRASIL, 2012b).

5.1.2. Desenho do estudo

Os estudos seguiram o delineamento convencional de biodisponibilidade relativa / bioequivalência, do tipo aberto, aleatório, cruzado (*crossover* 2x2). Os participantes de pesquisa receberam na Fase I o medicamento teste, na Fase II receberam o medicamento referência e vice-versa. A administração obedeceu uma lista de randomização, confeccionada em Microsoft

Excel, em esquema de dose única e sob condições de jejum ou alimentado, de acordo com as normas da ANVISA.

Foi determinado o período mínimo de *washout* multiplicando a meia-vida plasmática máxima encontrado na literatura por 7 (sete), como recomendado na Resolução RE nº 1170, de 19 de abril de 2006.

5.1.3. População do estudo

Os estudos foram conduzidos com participantes de pesquisa saudáveis, adultos com idade entre 18 a 50 anos, com peso dentro da faixa de normalidade do IMC entre 18,5 e 28,90, levando-se em consideração altura e estrutura física. O recrutamento foi realizado entre indivíduos da região metropolitana do Recife e pessoas já cadastradas no centro de realização do estudo. Além dos participantes de pesquisa que participaram efetivamente do estudo, foram selecionados outros participantes de pesquisa, que ficaram à disposição do centro para serem incluídos em casos de desistência antes da administração do medicamento na fase I (BRASIL, 2006).

5.1.4. Recrutamento

Os candidatos a voluntários do estudo receberam durante entrevista um termo de recrutamento, que explicou sobre a realização dos exames clínicos e laboratoriais a que foram submetidos. Também foi esclarecido sobre os critérios de inclusão e exclusão do estudo, podendo assim, de acordo com a análise dos exames clínicos e das observações feitas pelos responsáveis do estudo, ser incluídos ou não na seleção.

5.1.5. Seleção

A seleção dos participantes de pesquisa foi realizada através de consulta médica, além de realização de exames laboratoriais. Somente foram aceitos nos estudos, os participantes de pesquisa que foram considerados saudáveis na avaliação clínica e nos exames laboratoriais que antecedem o início do estudo.

Os participantes de pesquisa selecionados foram confinados em local apropriado que foi previamente credenciado pela ANVISA e atendeu às Boas Práticas Clínicas (BPC), sob a responsabilidade de profissional médico.

Os mesmos receberam uma explanação da natureza e dos objetivos do estudo em linguagem acessível. Foi enfatizado que o estudo tem a finalidade de pesquisa, sem benefícios terapêuticos. Foram informados também sobre a duração, o método, os constrangimentos e os riscos previsíveis. Também entenderam que ficariam livres para se retirar a qualquer momento do estudo sem que isto cause qualquer tipo de constrangimento e sem a necessidade de fornecer explicações. Foi solicitado que cada voluntário, caso concordasse, assinasse o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, previamente aprovado pelo o CEP, para participar no estudo. Após a assinatura o voluntário recebeu uma via assinada do TCLE com todas as informações fornecidas.

5.2. ETAPA BIOANALÍTICA

5.2.1. Validação do método bioanalítico

Todas as etapas do estudo foram realizadas de acordo com as normas internacionais de Boas Práticas de Laboratório (BPL) sendo os métodos bioanalíticos dos estudos realizados até 2012 validados conforme a RDC N° 899/2003 e aqueles realizados depois de 2012 em conformidade com a RDC N° 27/12. Os testes realizados na matriz (plasma) foram:

- a. Seletividade;
- b. Linearidade;
- c. Exatidão, precisão;
- d. Efeito matriz.

Além de estudos para determinação da estabilidade do fármaco inalterado na matriz (plasma), como:

- e. Estabilidade de longa duração;
- f. Estabilidade de curta duração;
- g. Estabilidade de congelamento e descongelamento;
- h. Estabilidade de Solução;
- i. Efeito matriz;
- j. Estabilidade de Pós-processamento.

5.2.2. Execução do método bioanalítico

O método bioanalítico foi realizado segundo a RE N° 1170/06 e a RDC N° 899/03 ou a RDC N° 27/12, de acordo com a data de realização do estudo, e a determinação da concentração plasmática do fármaco inalterado em questão foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM/EM) ou acoplada ao detector de ultravioleta (CLAE-UV). O processo de extração (purificação) das amostras foi realizado pela técnica de precipitação ou extração em fase sólida, do plasma dos participantes de pesquisa.

5.3. ETAPA ESTATÍSTICA

5.3.1. Tratamento estatístico

A Etapa Estatística foi conduzida de acordo com a RE N° 898, de 29 de maio de 2003 que dispõe sobre o “Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa / Bioequivalência”.

Parâmetros farmacocinéticos tais como: concentração máxima atingida (dose normalizada $C_{\text{máx}}$), tempo para atingir a concentração máxima ($T_{\text{máx}}$) e área sobre a curva (dose normalizada ASC) foram calculados e testes estatísticos paramétricos e não paramétricos foram realizados para a avaliação de possíveis diferenças significativas entre as duas preparações estudadas.

Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos das curvas de concentração plasmáticas do fármaco versus tempo, e foram analisados estatisticamente para avaliação da bioequivalência.

Para avaliação da biodisponibilidade foram empregados os parâmetros $ASC_{(0-t)}$, $ASC_{(0-\infty)}$, $C_{\text{máx}}$ e $T_{\text{máx}}$. Para os estudos truncados, a $ASC_{0-\infty}$, não foi considerado para o cálculo da biodisponibilidade.

- A área sob a curva da concentração plasmática versus tempo foi calculada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao tempo t (ASC_{0-t});
- Foi realizada análise de variância (ANOVA) dos parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e $C_{\text{máx}}$ transformados para avaliar os efeitos de sequência, de voluntário dentro da sequência, período e tratamento;

- Foi construído um intervalo de confiança (IC) de 90% para a diferença das médias dos dados transformados dos medicamentos teste e referência, para os parâmetros ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e $C_{m\acute{a}x}$.
- O método de detecção de outliers que foi utilizado neste estudo encontra-se descrito no livro “*Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*” (procedimento LD) de CHOW, 2000.

A análise foi realizada através dos softwares: WinNonLin Professional Network Edition version 5.3 e Microsoft Excel Version 7.0.

5.4. AVALIAÇÃO DO GÊNERO DO VOLUNTÁRIO

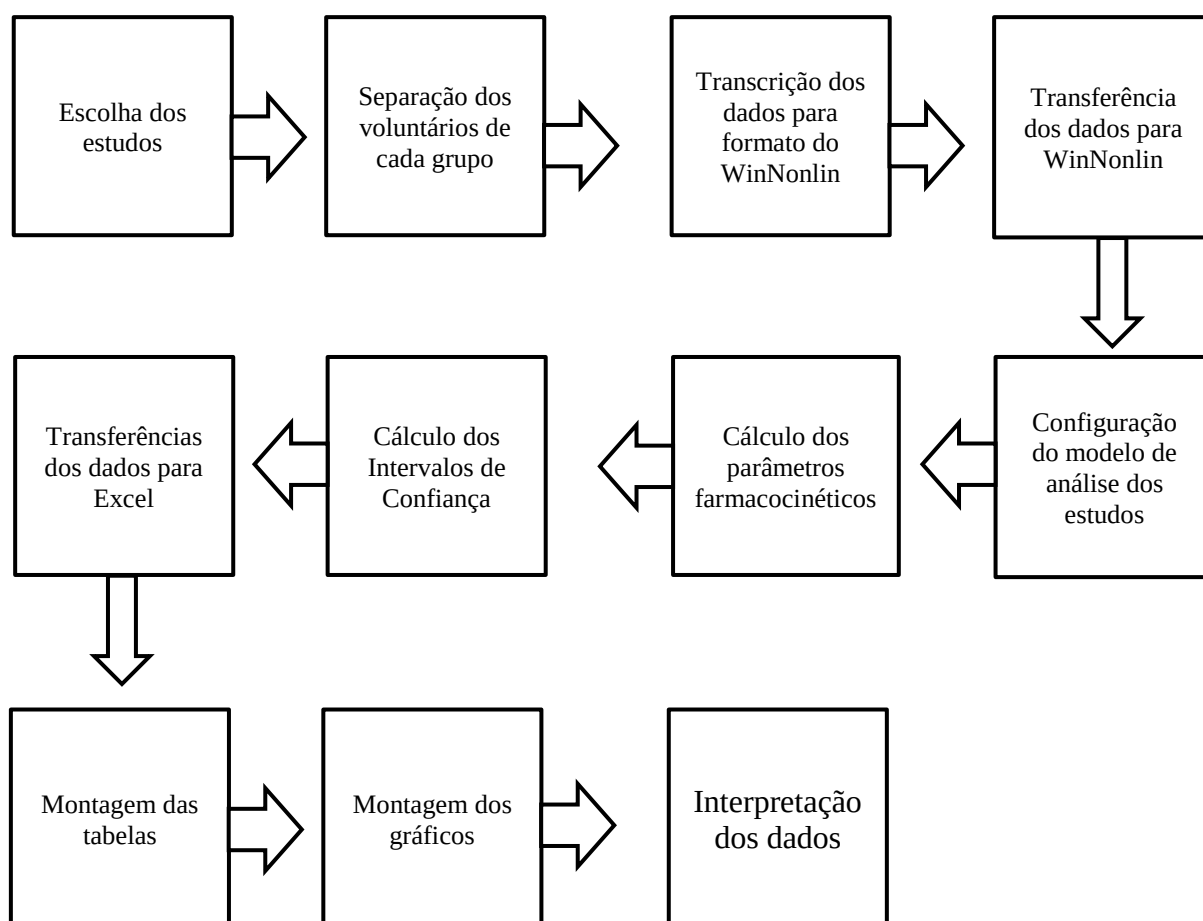
Foram escolhidos, estudos mistos (com homens e mulheres) realizados pelo NUDFAC entre os anos de 2010 e 2014. Cada estudo foi separado em dois grupos, sendo um com os participantes de pesquisa do gênero masculino e outro do gênero feminino. Realizou-se os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos e da bioequivalência média para cada grupo com o auxílio do software estatístico WinNonlin Professional versão 5.0 (Pharsight Corporation, Mountain View, California, Estados Unidos). Os resultados foram analisados para verificar se as formulações apresentam comportamentos biofarmacêuticos diferentes para cada gênero e se essa diferença pode afetar o coeficiente de variação inter e intrassujeitos e consequentemente na determinação da quantidade de participantes de pesquisa e o resultado final do estudo. A análise de variância (ANOVA) para verificar as diferenças estatísticas entre os grupos, os gráficos e as tabelas foram confeccionadas com o auxílio do software Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Estados Unidos).

5.5. AVALIAÇÃO DOS DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Foram escolhidos todos os estudos de bioequivalência realizados pelo NUDFAC, entre os anos de 2010 e 2014. Então foram separados os participantes de pesquisa de cada estudo em três grupos, sendo eles: grupo MC, grupo IMC e grupo TODOS. O grupo MC (massa corporal) é composto pelos participantes de pesquisa que ficaram dentro da variação de mais ou menos 15 % da média de massa corporal do estudo. O grupo IMC (índice de massa corporal) é composto pelos participantes de pesquisa que ficaram dentro da variação de mais ou menos 15 % da média do índice de massa corporal – IMC do estudo. Já o grupo TODOS é composto por todos os participantes de pesquisa do estudo e reflete o resultado real do estudo.

Após o estabelecimento dos grupos MC e IMC foram calculados os parâmetros farmacocinéticos- PF, os intervalos de confiança – IC da bioequivalência média e os coeficientes de variação intrassujeitos e intersujeitos com o auxílio do software estatístico WinNonlin Professional versão 5.0 (Pharsight Corporation, Mountain View, California, Estados Unidos). Depois foram confeccionados as tabelas e os gráficos com auxílio do software Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Estados Unidos). Na Figura 7 podemos visualizar o organograma detalhado da avaliação da influência da MC e IMC nos resultados dos estudos.

Figura 7 – Organograma de realização da avaliação da influência dos dados antropométricos nos estudos de bioequivalência.

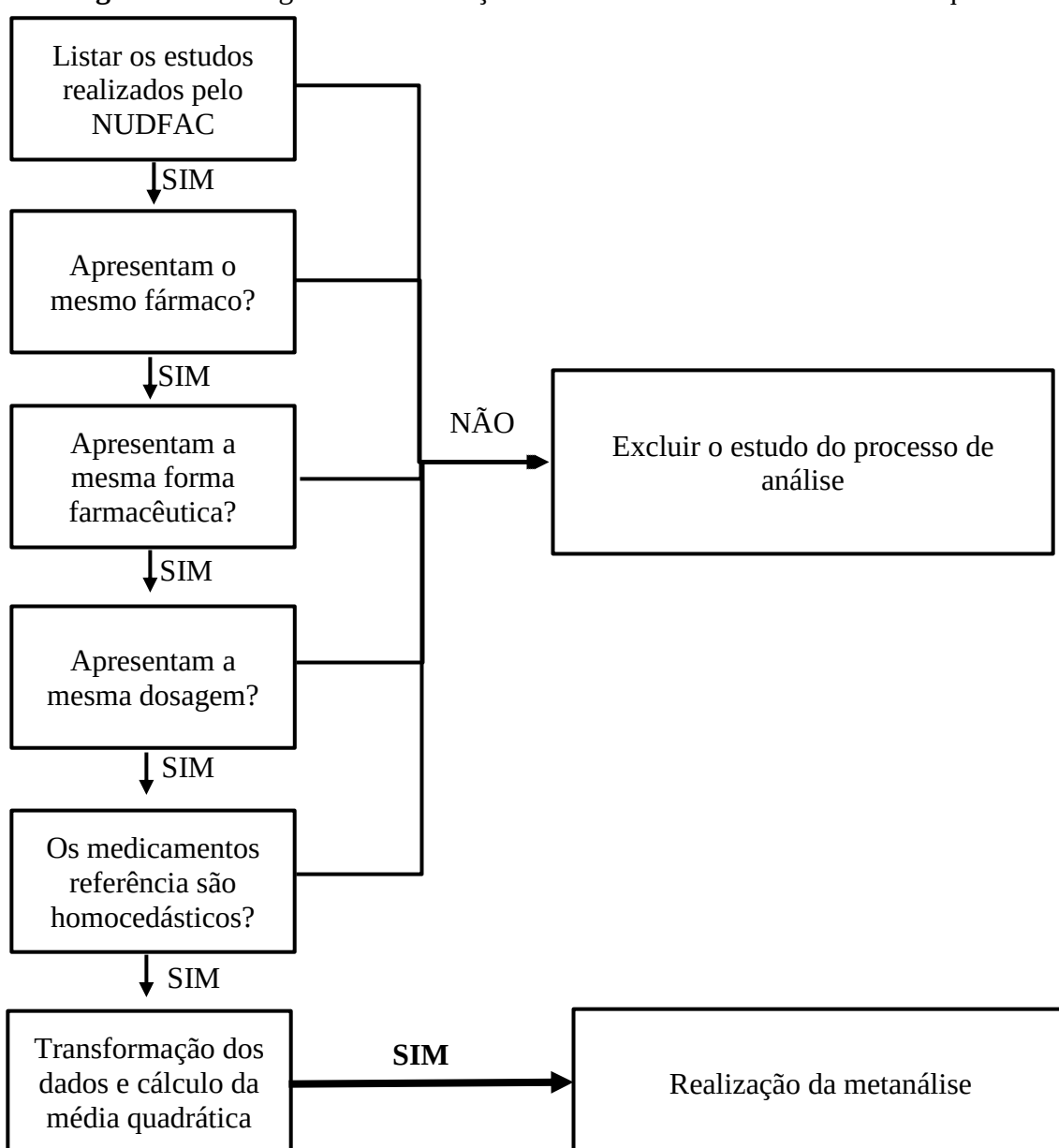


Fonte: autoria própria.

5.6. METANÁLISE DOS ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

Foi aplicado e desenvolvido uma planilha com base no método proposto por Chow e Liu, 1997 para realização de meta-análises nos estudos de bioequivalência. Após o desenvolvimento da planilha, os estudos foram selecionados de acordo com o fluxo mostrado na Figura 8. A planilha foi validada com base no exemplo de meta-análises para estudo de bioequivalência estabelecido, na terceira edição do livro *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*, New York: Marcel Dekker, 2000.

Figura 8 – Fluxograma de realização da metanálises dos estudos de bioequivalência



Fonte: autoria própria.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. INFLUÊNCIA DO GÊNERO

Foram analisados treze estudos com um total de 448 participantes de pesquisa (224 homens e 224 mulheres) mostrados na Tabela 4. Sendo dois estudos com o fluconazol, com fabricante de medicamento teste diferente e mesmo medicamento de referência. Dois estudos com o tenofovir, sendo um com administração em jejum e outro alimentado, ambos com mesmo medicamento teste e referência. Os demais fármacos foram realizados apenas um estudo de cada.

De acordo com a legislação brasileira (RE nº 1170, de 19 de abril de 2006), estudos podem ser realizados com homens, com mulheres, ou com ambos (misto), todavia, os mistos devem ser realizados com quantidade iguais de homens e mulheres, porém, se durante o estudo houver desistência ou exclusão de algum deles, o estudo pode ser finalizado com quantidades diferentes, portanto, os estudos relatados com diferença entre os grupos, foi devido a desistência ou exclusão de participantes de pesquisa.

Tabela 4 – Dados dos estudos que participaram das análises da influência do gênero.

FÁRMACO	FORMA / DOSE	CÓDIGO	NÚMERO DE PARTICIPANTES DE PESQUISA		
			HOMENS	MULHERES	TODOS
LORATADINA	Comprimido 10 MG	NUD_01_11	24	24	48
CITALOPRAM	Comprimido revestido 20 MG	NUD_02_11	13	14	27
DIAZEPAM	Comprimido 10 MG	NUD_02_12	17	16	33
CLONAZEPAM	Comprimido 2 MG	NUD_03_11	17	19	36
LAMIVUDINA	Comprimido revestido 150 MG	NUD_04_12	14	13	27
METILDOPA	Comprimido revestido 250 MG	NUD_05_12	16	18	34
ESCOPOLAMINA	Comprimido revestido 10 MG	NUD_06_12	30	28	58
FLUCONAZOL	Cápsula 150 MG	NUD_26_10	14	14	28
TENOFOVIR (JEJUM)	Comprimido revestido 300 MG	NUD_29_10	18	18	36
TENOFOVIR (ALIMENTADO)	Comprimido revestido 300 MG	NUD_30_10	17	18	35
ESCITALOPRAM	Comprimido revestido 20 MG	NUD_31_10	13	11	24
MIDAZOLAM	Comprimido revestido 15 MG	NUD_32_10	17	18	35
FLUCONAZOL	Cápsula 150 MG	NUD_35_10	14	13	27
		MÉDIA	17.23	17.23	34.46
DESVIO PADRÃO			4.81	4.69	9.41
TOTAL			224	224	448

Visando melhor avaliar a influência do sexo dos participantes de pesquisa sobre os parâmetros farmacocinéticos e bioequivalência, montamos a Tabela 5 com os dados

antropométricos dos participantes de pesquisa separados por gênero, pois existe a possibilidade desses parâmetros também afetarem a farmacocinética e o resultado dos estudos, o que será estudado mais adiante neste trabalho.

Em média, as mulheres apresentaram MC 25,13% e IMC 6,8% menores que os homens, sendo, então, estatisticamente diferentes de acordo com a análise de variância – ANOVA realizada e com obtenção dos valores de P de 0,00001 e 0,00008, respectivamente para MC e IMC.

Tabela 5 – Dados antropométricos dos participantes de pesquisa que participaram dos estudos.

FÁRMACO	CÓDIGO	IDADE (anos)		MC (kg)		ALTURA (m)		IMC (kg/m ²)	
		H	M	H	M	H	M	H	M
LORATADINA	NUD_01_11	25.58	24.96	74.25	58.33	1.76	1.61	24.06	22.39
CITALOPRAM	NUD_02_11	33.00	30.93	73.85	60.36	1.76	1.59	23.66	23.91
DIAZEPAM	NUD_02_12	26.71	25.50	75.87	61.62	1.74	1.61	24.91	23.72
CLONAZEPAM	NUD_03_11	31.29	29.58	73.47	58.88	1.76	1.62	23.69	22.44
LAMIVUDINA	NUD_04_12	25.29	25.92	74.73	60.05	1.76	1.62	24.10	22.92
METILDOPA	NUD_05_12	25.19	27.22	76.06	59.39	1.76	1.61	24.57	22.77
ESCOPOLAMINA	NUD_06_12	27.37	25.13	79.35	61.65	1.78	1.63	25.07	23.29
FLUCONAZOL	NUD_26_10	25.21	23.29	69.34	58.16	1.76	1.63	22.43	22.50
TENOFOVIR (JEJUM)	NUD_29_10	25.06	25.50	75.61	56.11	1.75	1.60	24.52	21.79
TENOFOVIR (ALIMENTADO)	NUD_30_10	24.56	23.17	74.50	58.44	1.74	1.64	24.54	21.75
ESCITALOPRAM	NUD_31_10	24.23	24.36	72.58	59.57	1.76	1.64	23.34	22.10
MIDAZOLAM	NUD_32_10	22.06	19.89	68.00	54.47	1.72	1.62	23.01	20.59
FLUCONAZOL	NUD_35_10	30.48	29.04	74.14	61.50	1.74	1.67	24.32	22.05

Legenda: H: Homens; M: Mulheres.

6.1.1. Avaliação dos parâmetros

Os cálculos do $C_{\text{máx}}$ e ASC_{0-t} dos grupos de participantes de pesquisa (homens e mulheres) estão apresentados na Tabela 6 e 7, respectivamente.

Os valores do $C_{\text{máx}}$ dos medicamentos da Tabela 6 deveria ser todos maiores nas mulheres que nos homens, visto que existem diferenças biológicas entre homens e mulheres que podem resultar em diferenças nas respostas às drogas, tanto farmacocinéticas como farmacodinâmicas. De acordo com a Tabela 5, em média, os homens apresentam valores de MC, IMC e altura maiores que as mulheres que deveria resultar em um maior volume de distribuição e um clearance total mais rápido da maioria dos medicamentos. Além do mais, a metabolização das drogas administradas por via oral nas mulheres, principalmente as que são

substratos do citocromo P450 CYP3A (Mangoni e Jackson, 2003), como o caso da loratadina e do midazolam, é menor, produzindo $C_{\text{máx}}$ um pouco mais elevado. Enquanto os homens apresentam, geralmente, fígado mais volumoso e também maior perfusão hepática, fazendo com que as metabolizações dos fármacos sejam mais intensas. E ainda, as mulheres secretam menos ácido gástrico, o que resulta num ambiente mais básico que pode potencialmente levar a um aumento da absorção de fármacos alcalinos no estômago.

Além disso, as mulheres apresentam taxas de esvaziamento gástrico mais lento, que deveria fazer com que os medicamentos tenham mais tempo para serem absorvidos e tenham ASC ligeiramente mais elevadas, como pode-se ver na Tabela 7.

Às vezes, o trânsito no cólon, também, é prolongado nas mulheres, o que permite que os compostos passem mais tempo para serem absorvidos em um ambiente em que o pH favorece a absorção de bases fracas.

Tabela 6 – Análise da variação de $C_{\text{máx}}$ de acordo com o gênero.

CÓDIGO	UNIDADE	$C_{\text{máx}}$ (média do medicamento teste e referência)		
		HOMENS	MULHERES	VARIAÇÃO
LORATADINA	ng/mL	5.248	8.216	36%
CITALOPRAM	ng/mL	21.433	26.344	19%
DIAZEPAM	ng/mL	408.279	279.439	-46%
CLONAZEPAM	ng/mL	11.973	12.062	1%
LAMIVUDINA	µg/mL	1.634	2.039	20%
METILDOPA	ng/mL	624.638	1222.593	49%
ESCOPOLAMINA	pg/mL	75.501	110.174	31%
FLUCONAZOL	µg/mL	2.870	3.626	21%
TENOFOVIR (JEJUM)	ng/mL	255.608	345.489	26%
TENOFOVIR (ALIMENTADO)	ng/mL	281.771	340.486	17%
ESCITALOPRAM	ng/mL	23.878	28.417	16%
MIDAZOLAM	ng/mL	91.868	98.268	7%
FLUCONAZOL	µg/mL	3.005	4.244	29%

A única exceção, nos estudos analisados foi o diazepam, que apresentou $C_{\text{máx}}$ (Tabela 6) e ASC (Tabela 7) significativamente maior nos homens que nas mulheres. Já o midazolam, apresentou apenas a ASC (Tabela 7) menor nas mulheres que nos homens. Ambos os casos precisam ser estudados de forma mais aprofundada, pois, também não foram encontradas justificativas para tais fatos. O gráfico com a concentração plasmática versus do tempo do diazepam encontra-se na Figura 9, mostrando claramente as diferenças entre os dois grupos. O diazepam é intensamente metabolizado no fígado por várias enzimas, entre elas a CYP3A (Soldin e Mattison, 2009), portanto, a metabolização de primeira passagem deveria ter

um sido significativamente maior nos homens que dispõem de fígado mais volumoso e com maior fluxo sanguíneo, fazendo com que seu $C_{m\acute{a}x}$ (Tabela 6) e ASC (Tabela 7) fosse maior, no entanto, não foi o observado, pelo contrário, pois na Tabela 9, vemos que a meia vida plasmática nas mulheres que menor que nos homens. Todavia, a diferença da meia vida não justifica completamente a diferença dos valores de $C_{m\acute{a}x}$ entre os grupos e não foi encontrado dados na literatura, portanto, são necessários maiores estudos para elucidar completamente o mecanismo da diferença do $C_{m\acute{a}x}$.

Figura 9 – Concentração plasmática versus tempo do diazepam para homens e mulheres.

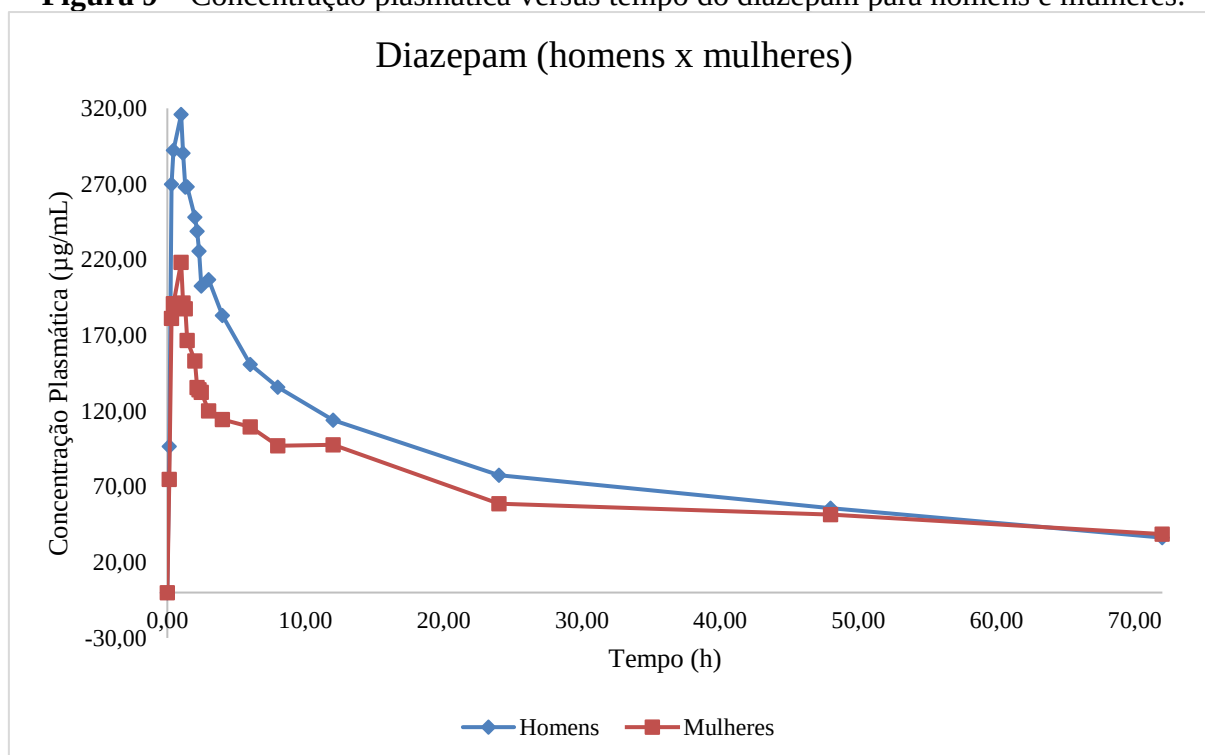


Tabela 7 – Análise da variação da ASC_{0-t} de acordo com o gênero.

CÓDIGO	UNIDADE	ASC _{0-t} (média do medicamento teste e referência)		
		HOMENS	MULHERES	VARIAÇÃO
LORATADINA	ng*h/mL	15.714	26.389	40%
CITALOPRAM	ng*h/mL	555.115	717.441	23%
DIAZEPAM	ng*h/mL	5897.134	4749.393	-24%
CLONAZEPAM	ng*h/mL	376.333	356.634	-6%
LAMIVUDINA	µg/mL	5.584	7.298	23%
METILDOPA	ng*h/mL	1949.100	4718.685	59%
ESCOPOLAMINA	pg*h/mL	566.421	771.150	27%
FLUCONAZOL	µg*h/mL	92.046	106.916	14%
TENOFOVIR (JEJUM)	ng*h /mL	1838.354	2411.480	24%
TENOFOVIR (ALIMENTADO)	ng*h /mL	2772.732	3264.083	15%
ESCITALOPRAM	ng*h/mL	628.983	647.665	3%
MIDAZOLAM	ng*h/mL	246.284	217.123	-13%
FLUCONAZOL	µg*h/mL	100.547	134.591	25%

Já o T_{máx} deveria ser mais demorado nas mulheres, justamente por causa do maior tempo de esvaziamento gástrico que persiste mesmo após a menopausa e é acentuado pelos estrogênios e progesteronas exógenos, encontrados nos anticoncepcionais. No entanto, como podemos observar na Tabela 8, quatro (diazepam, metildopa, tenofovir alimentado e fluconazol) dos treze estudos analisados apresentaram comportamentos opostos, ou seja, o T_{máx} foi mais curto. No caso do tenofovir, o alimento pode ter inferido neste processo, visto que retarda o T_{máx} em ambos os gêneros.

Tabela 8 – Análise da variação da T_{máx} de acordo com o gênero.

CÓDIGO	T _{máx} (média do medicamento teste e referência)		
	HOMENS (h)	MULHERES (h)	VARIAÇÃO (%)
LORATADINA	1.175	1.885	38
CITALOPRAM	3.615	3.768	4
DIAZEPAM	1.137	0.974	-17
CLONAZEPAM	1.976	2.679	26
LAMIVUDINA	1.045	1.106	6
METILDOPA	2.928	2.829	-3
ESCOPOLAMINA	3.630	3.773	4
FLUCONAZOL	3.696	3.857	4
TENOFOVIR (JEJUM)	0.811	0.910	11
TENOFOVIR (ALIMENTADO)	2.384	1.997	-19
ESCITALOPRAM	2.785	2.818	1
MIDAZOLAM	0.860	0.813	-6
FLUCONAZOL	3.188	2.635	-21

A maior metabolização nos homens, decorrente de seu maior fígado e circulação hepática associado a uma maior quantidade de gordura em mulheres que pode aumentar a reserva e retenção de fármacos lipofílicos, pode justificar a meia vida plasmática mais curta nos homens em alguns fármacos (Tabela 9), como loratadina ($\log P = 5,2$), midazolam ($\log P = 3,9$) e clonazepam ($\log P = 2,41$). Porém a grande parte dos medicamentos, que são na sua maioria pouco lipofílicos, exceto o diazepam e escitalopram, apresentaram meia vida plasmática menores nas mulheres.

A população feminina apresentou na maioria dos casos uma menor meia vida plasmática quando comparado com os homens, no entanto, esse resultado não era esperado, pois como já informado, os homens deveriam apresentar maior metabolização devido a tamanho maior do fígado e da circulação porta-hepática.

Tabela 9 – Análise da variação da $T_{1/2}$ de acordo com o gênero.

FÁRMACO	$T_{1/2}$ (média do medicamento teste e referência)		
	HOMENS (h)	MULHERES (h)	VARIAÇÃO (%)
LORATADINA	9.202	15.000	39%
CITALOPRAM	33.742	32.524	-4%
DIAZEPAM	47.350	42.060	-13%
CLONAZEPAM	38.591	46.426	17%
LAMIVUDINA	5.620	4.167	-35%
METILDOPA	1.941	1.779	-9%
ESCOPOLAMINA	6.421	5.710	-12%
FLUCONAZOL	59.501	32.616	-82%
TENOFOVIR (JEJUM)	16.940	16.828	-1%
TENOFOVIR (ALIMENTADO)	18.564	20.742	11%
ESCITALOPRAM	25.136	24.231	-4%
MIDAZOLAM	3.189	3.806	16%
FLUCONAZOL	32.773	30.375	-8%

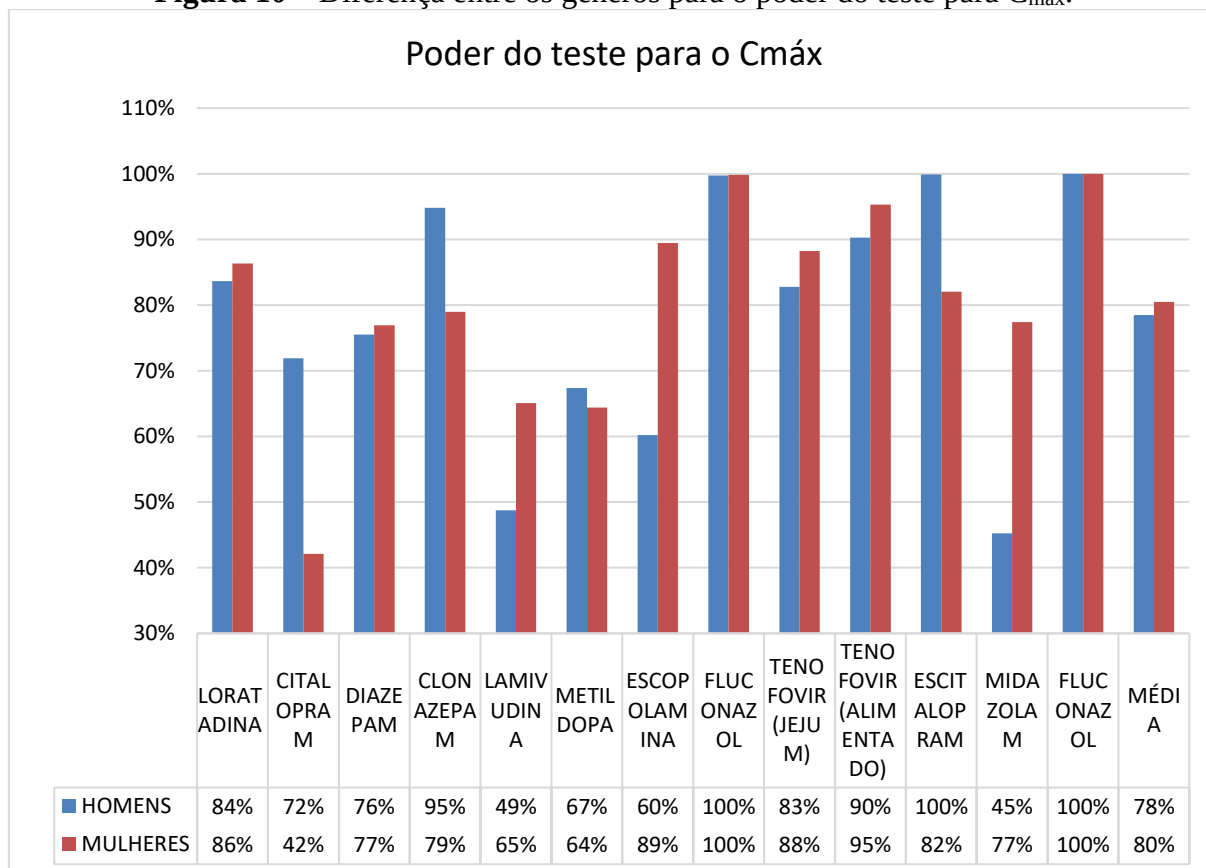
Com a análise das diferenças dos parâmetros farmacocinéticos entre homens e mulheres, verificamos que de modo geral o $C_{\text{máx}}$ e a ASC das mulheres são maiores que nos homens, portanto, caso façam-se estudos com medicamentos com baixa concentração plasmática e a utilização equipamentos com baixa sensibilidade, seria mais indicado a utilização da população feminina.

6.1.2. Poder, coeficiente de variação e intervalo de confiança

Embora o poder do teste tenha apresentado média geral semelhante entre os grupos, se observam-se de forma individual cada estudo poderemos verificar valores bem discrepantes entre homens e mulheres (Figura 10). O citalopram apresentou uma diferença entre os grupos de 30%, sendo os homens 72% e 42% mulheres. Já o midazolam apresentou uma diferença de 32%, com 77 % para as mulheres e 45% para os homens. Um fato importante para se analisar é que houve similaridade dos dados entre os estudos realizados com o mesmo fármaco (NUD_29_10 e NUD_30_10, tenofovir), mostrando que embora tenha sido realizado em condições diferentes (jejum e alimentado) a diferença de 5% do poder do teste entre os sexos se manteve constante.

O poder do teste, informa o quanto a quantidade de participantes de pesquisa foi representativa para garantir segurança no resultado do estudo e de acordo com a exigência da ANVISA, é necessário um poder mínimo de 80%. Quanto mais homogênea for a farmacocinética do medicamento, menor será a quantidade de participantes de pesquisa necessário para condução do estudo (BRASIL, 2003d).

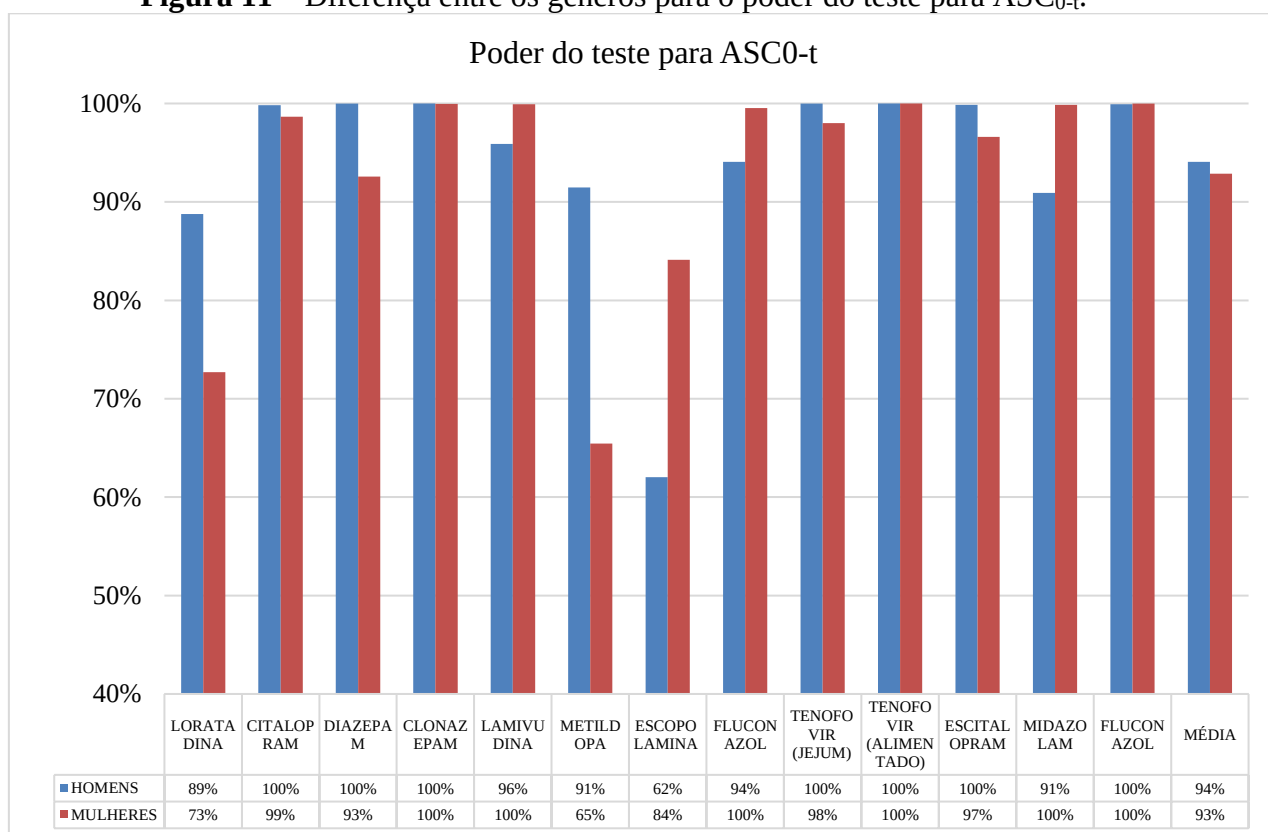
Figura 10 – Diferença entre os gêneros para o poder do teste para $C_{m\acute{a}x}$.



Na maioria dos estudos conseguiu-se um poder do teste de 100% ou bem próximo para a ASC, pois a variação deste parâmetro entre os participantes de pesquisa é bem menor que o $C_{máx}$. A média geral para o poder do teste para a ASC_{0-t} , também apresentou semelhança entre os grupos (Figura 11), todavia, alguns estudos apresentaram valores bem destoantes entre homens e mulheres, como os estudos da loratadina, da metildopa e da escopolamina.

Geralmente o poder do teste da ASC_{0-t} é bem maior que do $C_{máx}$ e quando fazemos o planejamento do estudo, nos preocupamos com o parâmetro mais críticos, no caso o $C_{máx}$, portanto, determinamos a quantidade de participantes de pesquisa do estudo à partir do coeficiente de variação do $C_{máx}$. Como podemos observar na Figura 11, mesmo separando os participantes de pesquisa do estudo em dois grupos, ou seja, reduzindo pela metade o espaço amostral do estudo, apenas três dos treze estudos ficaram com o poder abaixo de 80%, exigido pela ANVISA.

Figura 11 – Diferença entre os gêneros para o poder do teste para ASC_{0-t} .



Como os medicamentos apresentam propriedades físico-químicas e farmacocinéticas diferentes é difícil generalizar se existe um aumento ou redução do poder do

teste para homens e mulheres, portanto, as diferenças entre os grupos devem ser analisadas caso a caso, para desenho de um estudo adequado.

O CV Intra (Tabela 10) mede a variação que existe quando uma mesma pessoa toma o mesmo medicamento, não é utilizado como parâmetro para determinar o resultado da bioequivalência, mas, nos desenhos cruzados, é um dos valores mais importante, pois sem ele, não temos como estimar a quantidade de participantes de pesquisa necessários para determinar a bioequivalência com um poder superior a 80%.

O estudo do citalopram (Tabela 10) foi o que apresentou maior diferença (20%) entre os grupos, no caso, as mulheres apresentaram um CV Intra significativamente maior que os homens. Já os estudos da escopolamina e do midazolam apresentaram CV Intra significativamente maior nos homens. Caso tivesse que escolher a melhor população para estes estudos, escolheríamos masculina para os fármacos escopolamina e midazolam e feminina para o citalopram. Embora não possamos generalizar a escolha da população mais indicada para condução do estudo, pois varia de acordo com as propriedades do medicamento, certamente pode-se confirmar que a realização de estudo misto (com homens e mulheres) não são indicados. Na legislação mexicana, é a única das pesquisadas que já prever essa variação entre os grupos e proíbe que seja realizado estudos de bioequivalência com homens e mulheres, devemos escolher um dos grupos dependendo do medicamento.

Tabela 10 – Coeficiente de variação intrassujeitos do $C_{\text{máx}}$ para homens e mulheres.

FÁRMACO	CV Intra ($C_{\text{máx}}$)			CV Intra (ASC_{0-t})		
	H (%)	M (%)	CV H-M (%)	H (%)	M (%)	CV H-M (%)
LORATADINA	20.32	20.36	-0.04	26.40	33.99	-7.58
CITALOPRAM	34.37	54.47	-20.10	10.23	13.78	-3.55
DIAZEPAM	26.86	26.33	0.53	10.07	20.01	-9.95
CLONAZEPAM	18.52	26.95	-8.43	7.20	11.50	-4.30
LAMIVUDINA	34.81	26.33	8.47	16.16	9.67	6.49
METILDOPA	28.78	32.37	-3.59	19.73	31.92	-12.20
ESCOPOLAMINA	45.85	28.18	17.67	44.63	31.04	13.59
FLUCONAZOL	11.43	10.96	0.47	17.17	12.14	5.03
TENOFOVIR (JEJUM)	24.35	22.16	2.19	10.36	16.48	-6.12
TENOFOVIR (ALIMENTADO)	20.79	18.65	2.14	9.11	9.36	-0.25
ESCITALOPRAM	9.78	18.14	-8.37	10.15	12.95	-2.80
MIDAZOLAM	41.59	27.08	14.51	20.81	12.67	8.14
FLUCONAZOL	8.08	3.58	4.50	8.77	8.16	0.61

Legenda: CV H-M: Diferença dos coeficientes de variação entre homens e mulheres; H: homens; M: mulheres.

Tabela 11 – Coeficiente de variação intersujeitos da ASC_{0-t} para homens e mulheres.

FÁRMACO	CV Inter ($C_{máx}$)			CV Inter (ASC_{0-t})		
	H (%)	M (%)	CV H-M (%)	H (%)	M (%)	CV H-M (%)
LORATADINA	138.20	93.48	44.72	143.06	106.02	37.04
CITALOPRAM	19.00	23.55	-4.55	25.77	32.45	-6.68
DIAZEPAM	22.26	35.18	-12.92	29.25	34.69	-5.44
CLONAZEPAM	29.07	14.40	14.66	23.91	18.43	5.48
LAMIVUDINA	26.54	18.60	7.94	25.40	11.93	13.48
METILDOPA	67.91	37.33	30.58	79.49	46.16	33.33
ESCOPOLAMINA	89.59	76.77	12.83	146.75	102.54	44.21
FLUCONAZOL	23.30	12.06	11.24	19.24	9.45	9.78
TENOFOVIR (JEJUM)	24.76	25.56	-0.80	17.95	32.83	-14.88
TENOFOVIR (ALIMENTADO)	10.81	24.91	-14.09	15.22	21.62	-6.41
ESCITALOPRAM	16.64	36.93	-20.29	25.05	36.44	-11.39
MIDAZOLAM	28.37	54.18	-25.81	37.81	27.65	10.15
FLUCONAZOL	11.66	11.61	0.06	18.70	15.00	3.70

Legenda: CV H-M: Diferença dos coeficientes de variação entre homens e mulheres; H: homens; M: mulheres.

O CV Inter (Tabela 11) é um parâmetro que identifica a variação que existe quando mais de uma pessoa toma o mesmo medicamento, e é muito importante para os estudos paralelos, mas com pouca relevância para os desenhos cruzados. A média de CV inter foi ligeiramente maior nos homens que nas mulheres, no entanto, são necessários maiores estudos, pois o CV Inter varia de fármaco para fármaco e não pode ser generalizado.

Nas Tabelas 12 e 13 podemos ver os valores do intervalo de confiança para os parâmetros $C_{máx}$ e ASC_{0-t} , respectivamente. É importante observar a relação entre o CV Intra e a variação do intervalo, pois quanto maior o CV Intra, maior a quantidade de participantes de pesquisa necessários para se conseguir colocar os parâmetros do estudo dentro da margem de aceitação da ANVISA, por isso a preocupação tão grande em tentar reduzir o CV Intra dos estudos de bioequivalência.

Tabela 12 – Intervalo de confiança de 90% para $C_{\text{máx}}$.

FÁRMACO	HOMENS		Variação	MULHERES		
	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Lim. Inf.	Lim. Sup.	Variação
LORATADINA	86.18	114.52	28.34	88.51	116.13	27.62
CITALOPRAM	71.92	100.29	28.37	78.17	129.81	51.64
DIAZEPAM	79.38	109.10	29.72	83.37	113.89	30.52
CLONAZEPAM	91.37	114.36	22.99	87.49	118.43	30.94
LAMIVUDINA	56.55	89.20	32.65	84.29	121.53	37.24
METILDOPA	99.82	142.24	42.42	80.25	115.89	35.64
ESCOPOLAMINA	94.41	139.07	44.66	86.89	112.09	25.20
FLUCONAZOL	107.03	124.80	17.77	109.15	126.47	17.32
TENOFOVIR (JEJUM)	69.77	92.92	23.15	81.51	105.87	24.36
TENOFOVIR (ALIMENTADO)	93.68	120.46	26.78	87.00	108.50	21.50
ESCITALOPRAM	87.59	100.54	12.95	76.79	102.89	26.10
MIDAZOLAM	81.90	132.53	50.63	94.83	129.25	34.42
FLUCONAZOL	101.79	114.70	12.91	102.41	107.71	5.30

O estudo da loratadina foi o que apresentou maior CV Intra para mulheres e o que apresentou maior variação do intervalo. Mostrando, neste caso, a relação direta entre coeficiente de variação e largura do intervalo de confiança. Os estudos da escopolamina e do midazolam apresentaram comportamento inverso, com maior CV Intra nos homens e, também, maior largura do intervalo. Caso consigamos identificar a população ideal para cada fármaco, conseguiremos reduzir significativamente o CV Inter e consequentemente a quantidade de participantes de pesquisa necessários para condução do estudo.

Tabela 13 – Intervalo de confiança de 90% para ASC_{0-t} .

CÓDIGO	HOMENS		Variação	MULHERES		
	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Lim. Inf.	Lim. Sup.	Variação
NUD_01_11	78.88	102.14	23.26	95.16	132.23	37.07
NUD_02_11	88.33	102.04	13.71	87.87	105.72	17.85
NUD_02_12	97.59	110.15	12.56	91.29	115.91	24.62
NUD_03_11	98.54	107.60	9.06	91.30	104.09	12.79
NUD_04_12	77.09	95.72	18.63	97.85	112.14	14.29
NUD_05_12	107.67	137.60	29.93	79.12	113.71	34.59
NUD_06_12	95.77	139.75	43.98	89.58	118.46	28.88
NUD_26_10	90.93	114.41	23.48	100.96	118.84	17.88
NUD_29_10	89.19	100.90	11.71	89.81	109.20	19.39
NUD_30_10	95.49	106.71	11.22	97.08	108.54	11.46
NUD_31_10	91.24	105.28	14.04	82.07	101.21	19.14
NUD_32_10	73.66	94.40	20.74	86.30	99.95	13.65
NUD_35_10	90.78	103.34	12.56	92.71	104.03	11.32
MÉDIA	90.397	109.234	18.84	90.854	111.079	20.23

Legenda: Lim. Inf.: Limite Inferior; Lim. Sup.: Limite Superior

O parametro ASC apresentou variações menos perceptíveis entre os generos, ou seja, o gênero não influencia de forma significativa a ASC como influência o $C_{máx}$.

De modo geral, podemos aferir que o gênero influencia no resultado do estudo, mas de forma diferente para cada fármaco, portanto, não podemos generalizar, mas precisamos estudar cada fármaco de forma isolada e a partir desta análise escolher a população ideal para condução do estudo.

6.2. INFLUÊNCIA DA ESCOLHA DO CRONOGRAMA DE COLETA

Para determinação da influência do cronograma, foram escolhidos os estudos contidos na Tabela 14, todos realizado pelo NUDFAC entre os anos 2010 e 2014. Tendo um total de 390 participantes de pesquisa participantes e 424 (212 por fase) pontos de coleta de sangue venoso. Os estudos realizados pelo NUDFAC tiveram em média 18 pontos, os que foram excluídos 20%, 14 pontos, e os que foram excluídos 40 % dos pontos, 11 pontos, por fase.

Tabela 14 – Dados dos estudos que participaram da análise da influência do cronograma de coleta.

CÓDIGO DO ESTUDO	FÁRMACO / DOSE	PARTICIPANTES DE PESQUISA	PONTOS RESTANTES		
			TODOS	- 20%	-40%
NUD_01_11	LORATADINA 10 MG	48	16	13	10
NUD_02_11	CITALOPRAM 20 MG	27	17	14	10
NUD_02_12	DIAZEPAM 10 MG	33	12	10	7
NUD_03_11	CLONAZEPAM 2 MG	36	17	14	10
NUD_04_12	LAMIVUDINA 150 MG	27	20	16	12
NUD_05_12	METILDOPA 250 MG	34	18	14	11
NUD_26_10	FLUCONAZOL 150 MG	28	16	13	10
NUD_29_10	TENOFOVIR 300 MG	36	22	18	13
NUD_30_10	TENOFOVIR 300 MG	35	22	18	13
NUD_31_10	ESCITALOPRAM 20 MG	24	20	16	12
NUD_32_10	MIDAZOLAM 15 MG	35	15	12	9
NUD_35_10	FLUCONAZOL 150 MG	27	17	14	10
MÉDIA		32.50	18	14	11
DESVIO PADRÃO		6.49	2.93	2.35	1.76
TOTAL		390	212	169.60	127

6.2.1. Cronograma de coleta

O cronograma de coleta é um dos itens mais importante no planejamento de um estudo de bioequivalência, sendo regulamentado pela Resolução RE nº 1170, de 19 de abril de 2006, da Anvisa, no entanto, não existe na legislação brasileira uma determinação de quantidade mínima de pontos e como deve ser distribuído, apenas informa que pode ser finalizado em 72 horas quando os medicamentos apresentarem meia vida plasmática superior a 24 horas, formando os denominados estudos truncados. Já nos estudos onde os medicamentos apresentam meia vida inferior a 24 horas, os quais chamamos de estudos normais, o cronograma de coleta

deve ser capaz de determinar que a ASC_{0-t} seja maior que 80% da área sob a curva de zero a infinito – $ASC_{0-\infty}$ (BRASIL, 2006).

Tabela 15 – Dados dos cronogramas de coleta dos estudos analisados.

Nº	LORATADINA			CITALOPRAM			DIAZEPAM			CLONAZEPAM		
	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.25	0.25		0.50	0.50		0.15	0.15		0.30	0.30	
3	0.50	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00	0.30	0.30	0.30	1.00	1.00	1.00
4	0.75	0.75		1.50	1.50		0.45	0.45	0.45	1.30	1.30	1.30
5	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	2.00	1.00			2.00		
6	1.25	1.25	1.25	2.50	2.50	2.50	1.15	1.15	1.15	2.30		
7	1.5	1.5		3.00	3.00	3.00	1.30	1.30	1.30	3.00	3.00	3.00
8	1.75	1.75	1.75	3.50	3.50	3.50	1.45	1.45		3.30	3.30	3.30
9	2.00	2.00	2.00	4.00	4.50		2.00			4.00	4.00	4.00
10	3.00	3.00	3.00	4.50			2.15	2.15	2.15	4.30	4.30	
11	4.00	4.00	4.00	5.00			2.30			5.00	5.00	5.00
12	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	2.45	2.45	2.45	6.00		
13	8.00			8.00			3.00	3.00		8.00	8.00	
14	12.0			12.0	12.0	12.0	4.00	4.00	4.00	12.0	12.0	
15	23.0			23.0	23.0		6.00	6.00	6.00	23.0	23.0	23.0
16	47.0	47.0	47.0	47.0	47.0	47.0	8.00			47.0	47.0	47.0
17				71.0	71.0	71.0	12.0	12.0	12.0	71.0	71.0	71.0
18							24.0	24.0	24.0			
19							48.0	48.0				
20							72.0	72.0	72.0			

Nas Tabela 15, Tabela 16 e Tabela 17 mostramos os cronogramas completos de todos os estudos analisados e os cronogramas gerados após a exclusão aleatória de 20 % e 40 % dos pontos de coleta do estudo. Mesmo com a exclusão dos pontos, todos os estudos continuaram de acordo com a legislação em vigor, pois o primeiro e o último ponto de coleta não foram excluídos dos cronogramas secundários gerados.

Tabela 16 – Dados dos cronogramas de coleta dos estudos analisado (continuação).

Nº	LAMIVUDINA			METILDOPA			FLUCONAZOL			TENOFIVIR		
	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%
1	0.00	0.00	0.00	00.00	00.00	00.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.25			00.30	00.30	00.30	1.00	1.00	1.00	0.15		
3	0.50	0.50	0.50	01.00	01.00		1.50	1.50	1.50	0.30	0.30	0.30
4	0.75	0.75	0.75	01.30			2.00			0.45		
5	1.00	1.00		01.45	01.45	01.45	2.50	2.50	2.50	1.00	1.00	1.00
6	1.25			02.00	02.00	02.00	3.00	3.00		1.15		
7	1.50	1.50	1.50	02.15	02.15	02.15	3.50	3.50	3.50	1.30	1.30	1.30
8	1.75	1.75	1.75	02.30	02.30		4.00	4.00		1.45		
9	2.00			02.45			4.50	4.5	4.50	2.00	2.00	2.00
10	2.25	2.25	2.25	03.00	03.00	03.00	6.00			2.15		
11	2.50	2.50	2.50	03.30	03.30	03.30	8.00	8.00	8.00	2.3	2.30	2.30
12	2.75			04.00			10	10.0	10.0	2.45	2.45	
13	3.00	3.00	3.00	05.00	05.00		12			3.00	3.00	3.00
14	3.50	3.50		06.00	06.00	06.00	24	24.0		3.30	3.3	
15	4.00	4.00		07.00	07.00	07.00	48	48.0	48.0	4.00	4.00	4.00
16	6.00	6.00		08.00			72	72.0	72.0	5.00	5.00	
17	8.00	8.00	8.00	10.0	10.0	10.0				6.00	6.00	6.00
18	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0				8.00	8.00	
19	24.0	24.0	24.0							12.0	12.0	12.0
20										23.0	23.0	23.0
21										47.0	47.0	
22										71.0	71.0	71.0

Para se fazer um planejamento adequado de um cronograma de coleta e consigamos identificar com certa precisão a concentração máxima e a área sob a curva do medicamento, precisa-se conhecer alguns dados do fármaco e formulação, como: meia vida, $t_{máx}$, forma farmacêutica, tipo de liberação.

Tabela 17 – Dados dos cronogramas de coleta dos estudos analisados (continuação).

Nº	TENOFIVIR			ESCITALOPRAM			MIDAZOLAM			FLUCONAZOL		
	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.15	0.15	0.15	1.00	1.00	1.00	0.25	0.25	0.25	1.00	1.00	.00
3	0.30	0.30		2.00	2.00	2.00	0.50	0.50		1.50	1.50	1.50
4	0.45			2.20	2.20		0.75	0.75	0.75	2.00		
5	1.00	1.00	1.00	2.40	2.40	2.40	1.00	1.00	1.00	2.50	2.50	2.50
6	1.15	1.15		3.00	3.00	3.00	1.25			3.00		
7	1.30	1.30	1.30	3.20	3.20		1.50	1.50	1.50	3.50	3.50	3.50
8	1.45	1.45		3.40	3.40	3.40	1.75	1.75	1.75	4.00	4.00	
9	2.00	2.00	2.00	4.00	4.00		2.00	2.00	2.00	4.5	4.50	4.50
10	2.15	2.15	2.15	4.20			3.00	3.00		5.00		
11	2.30			4.40	4.40	4.40	4.00			6.00	6.00	6.00
12	2.45	2.45	2.45	5.00			6.00	6.00	6.00	8.00	8.00	8.00
13	3.00	3.00	3.00	5.30	5.30	5.30	8.00			10.0	10.0	10.0
14	3.30			6.00	6.00		10.0	10.0		12.0	12.0	
15	4.00	4.00	4.00	8.00			12.0	12.0	12.0	23.0	23.0	23.0
16	5.00			12.0	12.0	12.0				47.0	47.0	
17	6.00	6.00	6.00	23.0	23.0	23.0				71.0	71.0	71.0
18	8.00	8.00		47.0								
19	12.0	12.0		71.0	71.0	71.0						
20	23.0	23.0	23.0	95.0	95.0	95.0						
21	47.0	47.0	47.0									
22	71.0	71.0	71.0									

6.2.1.1. Parâmetros Farmacocinéticos

Os estudos analisados, tiveram em média, seu $T_{m\acute{a}x}$, de 2,17 h (0,84-3,78) (Tabela 20), portanto, os pontos excluídos entre 1 e 4 horas afetaram principalmente na concentração plasmática máxima e seus resultados. Já os pontos excluídos após esse período influenciaram os valores da área sob a curva.

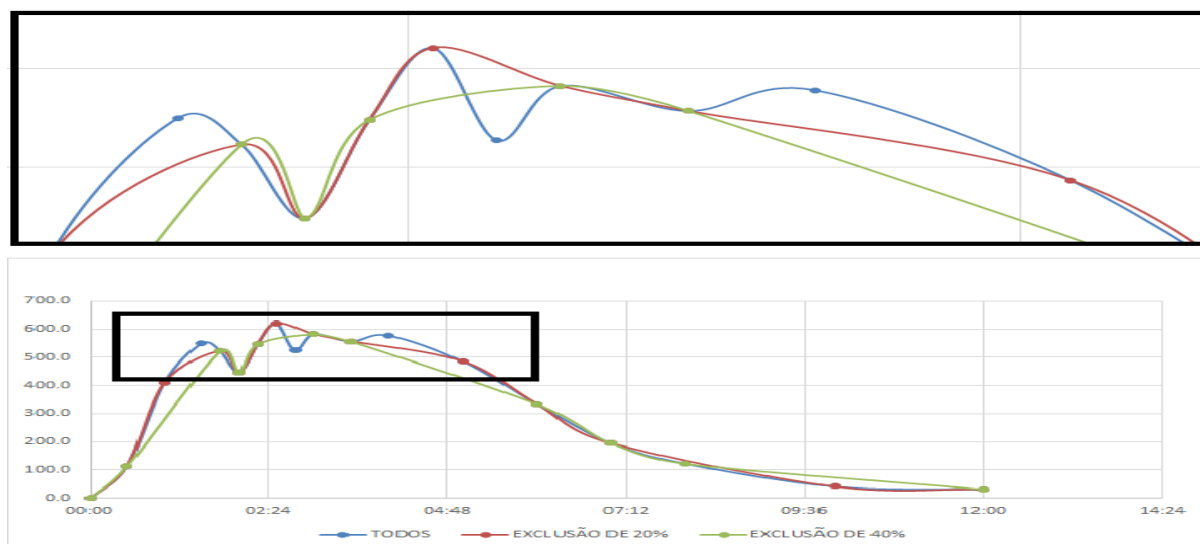
Notamos através da Tabela 18 que quanto mais reduzimos a quantidade de pontos de coleta menor fica os valores do $C_{m\acute{a}x}$, este fato se dar devido à redução da capacidade do cronograma de coleta em captar com precisão o tempo onde é atingido o $C_{m\acute{a}x}$. Não existe um único ponto onde todos os participantes de pesquisa apresentam o $C_{m\acute{a}x}$, mas este tempo flutua bastante devido à quantidade e complexidade dos fatores que interfere no processo de absorção

de um medicamento. Esta redução é mais marcante quando são excluídos os pontos próximos ao tempo onde se localiza o $C_{\text{máx}}$, como podemos observar na Figura 12.

Tabela 18 – Valores de $C_{\text{máx}}$ de acordo com o cronograma do estudo.

FÁRMACO	UNIDADE	$C_{\text{máx}}$ (média do medicamento teste e referência)		
		TODOS	20%	40%
LORATADINA 10 MG	ng/mL	6.50	6.50	6.13
CITALOPRAM 20 MG	ng/mL	23.98	23.33	23.20
DIAZEPAM 10 MG	ng/mL	343.86	323.74	323.74
CLONAZEPAM 2 MG	ng/mL	12.02	11.92	11.92
LAMIVUDINA 150 MG	µg/mL	1.84	1.81	1.75
METILDOPA 250 MG	ng/mL	923.62	888.64	830.12
FLUCONAZOL 150 MG	µg/mL	3.25	3.19	3.12
TENOFOVIR 300 MG	ng/mL	300.55	283.17	283.29
TENOFOVIR 300 MG	ng/mL	311.13	300.53	292.29
ESCITALOPRAM 20 MG	ng/mL	26.15	25.94	25.36
MIDAZOLAM 15 MG	ng/mL	95.07	93.64	83.87
FLUCONAZOL 150 MG	µg/mL	3.62	3.60	3.57

Figura 12 – Gráfico mostrando a influência do cronograma de coleta no $C_{\text{máx}}$ do estudo da metildopa.



O processo de determinação da influência da redução dos pontos de coleta na ASC é mais complexo, pois depende muito do local onde o ponto foi excluído, no entanto, o impacto geral é pequeno com leve tendência de aumento com a redução do cronograma de coleta.

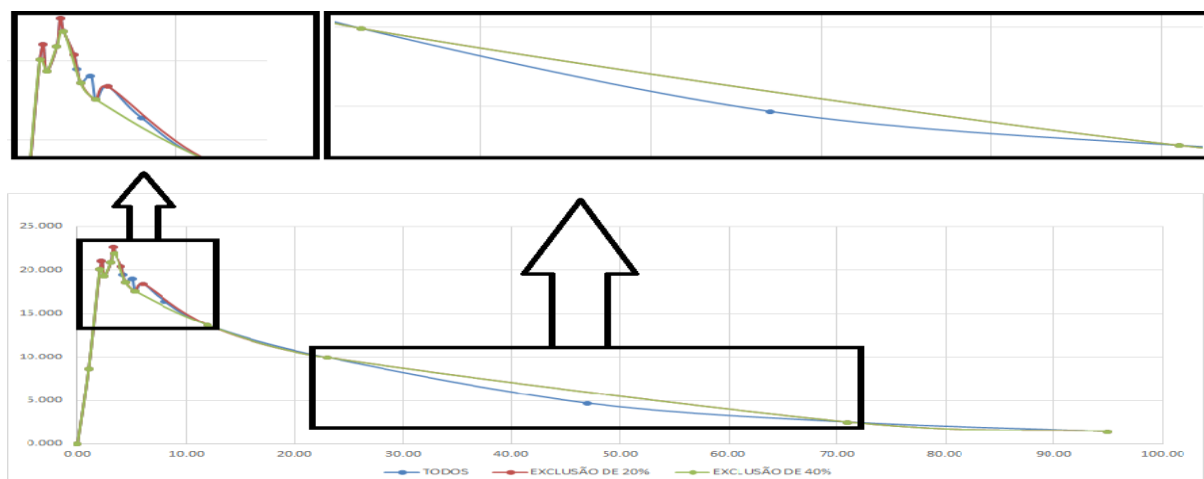
Os pontos do começo do cronograma de coleta não afetam muito a ASC, pois os tempos entre eles são curtos, já os pontos no final do cronograma exercem uma influência maior

devido aos maiores espaços entre as coletas, como podemos ver na Figura 13. Quando retiramos estes pontos, os gráficos tendem a ficarem mais lineares e a área sob o gráfico consequentemente fica maior. Na Tabela 19, pode-se ver os dados da ASC de todos os estudos e suas alterações com a redução do cronograma de coleta.

Tabela 19 – Valores de ASC_{0-t} de acordo com o cronograma do estudo.

FÁRMACO	UNID.	ASC _{0-t} (média do medicamento teste e referência)		
		TODOS	20%	40%
LORATADINA 10 MG	ng*h/mL	20.44	26.76	26.79
CITALOPRAM 20 MG	ng*h/mL	639.28	642.72	661.87
DIAZEPAM 10 MG	ng*h/mL	5323.26	5310.33	5328.13
CLONAZEPAM 2 MG	ng*h/mL	366.48	366.59	372.50
LAMIVUDINA 150 MG	ng/mL	6440.00	6580.00	6880.00
METILDOPA 250 MG	ng*h/mL	3333.89	3445.97	3350.94
FLUCONAZOL 150 MG	µg*h/mL	99.48	99.99	104.71
TENOFOVIR 300 MG	ng*h /mL	2124.92	1911.54	2118.29
TENOFOVIR 300 MG	ng*h /mL	3018.41	3026.67	3137.49
ESCITALOPRAM 20 MG	ng*h/mL	638.32	663.85	659.75
MIDAZOLAM 15 MG	ng*h/mL	231.70	240.39	243.25
FLUCONAZOL 150 MG	µg*h/mL	117.57	118.16	116.01

Figura 13 – Gráficos com o impacto do cronograma de coleta na ASC do estudo escitalopram.



Estão apresentados na Tabela 20 os dados do $T_{\text{máx}}$ dos estudos com suas alterações de acordo com o cronograma e como podemos observar os valores são bem similares entre os cronogramas de coleta. Como nesta tabela é mostrado os dados da média do $T_{\text{máx}}$ de todos os participantes de pesquisa do estudo, não valores individuais, e a influência da retirada do ponto de coleta é anulada pela flutuação do perfil farmacocinético que existe entre cada voluntário,

ou seja, quanto maior a quantidade de participantes de pesquisa do estudo, menor será a variação do $T_{\text{máx}}$.

Tabela 20 – Valores de $T_{\text{máx}}$ de acordo com o cronograma do estudo.

FÁRMACO	$T_{\text{máx}}$ (h) (média do medicamento teste e referência)		
	TODOS	20%	40%
LORATADINA 10 MG	1.60	1.59	1.63
CITALOPRAM 20 MG	3.69	3.47	3.51
DIAZEPAM 10 MG	1.06	1.05	1.05
CLONAZEPAM 2 MG	2.33	2.41	2.42
LAMIVUDINA 150 MG	1.08	1.06	1.13
METILDOPA 250 MG	2.88	2.84	3.00
FLUCONAZOL 150 MG	3.78	3.63	4.46
TENOFOVIR 300 MG	0.86	0.90	0.90
TENOFOVIR 300 MG	2.19	2.24	2.31
ESCITALOPRAM 20 MG	2.80	2.76	2.81
MIDAZOLAM 15 MG	0.84	0.84	0.96
FLUCONAZOL 150 MG	2.91	3.00	3.04

A meia vida plasmática (Tabela 21) apresentou alterações significativas nos estudos loratadina e escitalopram, todavia, nos demais estudos a variação foi pequena. A meia vida é inversamente proporcional a inclinação da reta na fase final do cronograma de coleta, ou seja, quanto maior a inclinação da reta, menor a meia vida. Então, como os pontos do final do cronograma são os que mais afetam esta inclinação, também, serão os que mais afetarão o valor da meia vida do medicamento.

Tabela 21 – Valores do $T_{1/2}$ de acordo com o cronograma do estudo.

FÁRMACO	$T_{1/2}$ (h) (média do medicamento teste e referência)		
	TODOS	20%	40%
LORATADINA 10 MG	12.40	6.41	6.45
CITALOPRAM 20 MG	33.11	32.65	31.37
DIAZEPAM 10 MG	44.88	44.63	44.63
CLONAZEPAM 2 MG	42.51	42.63	41.75
LAMIVUDINA 150 MG	4.89	4.97	4.96
METILDOPA 250 MG	1.86	2.15	2.22
FLUCONAZOL 150 MG	46.06	45.60	41.00
TENOFOVIR 300 MG	16.88	15.06	16.89
TENOFOVIR 300 MG	19.65	19.64	19.11
ESCITALOPRAM 20 MG	24.68	12.26	24.92
MIDAZOLAM 15 MG	3.50	3.40	2.97
FLUCONAZOL 150 MG	31.57	31.57	33.15

6.2.1.2. Perfil farmacocinético

No caso do estudo da loratadina (Figura 14 e 15) foram retirados os últimos três pontos de coleta da curva, que fez com que a reta ficasse bem mais inclinada e o valor da meia vida fosse reduzida. Todos os dados da meia vida plasmática dos estudos estão descritos na Tabela 21.

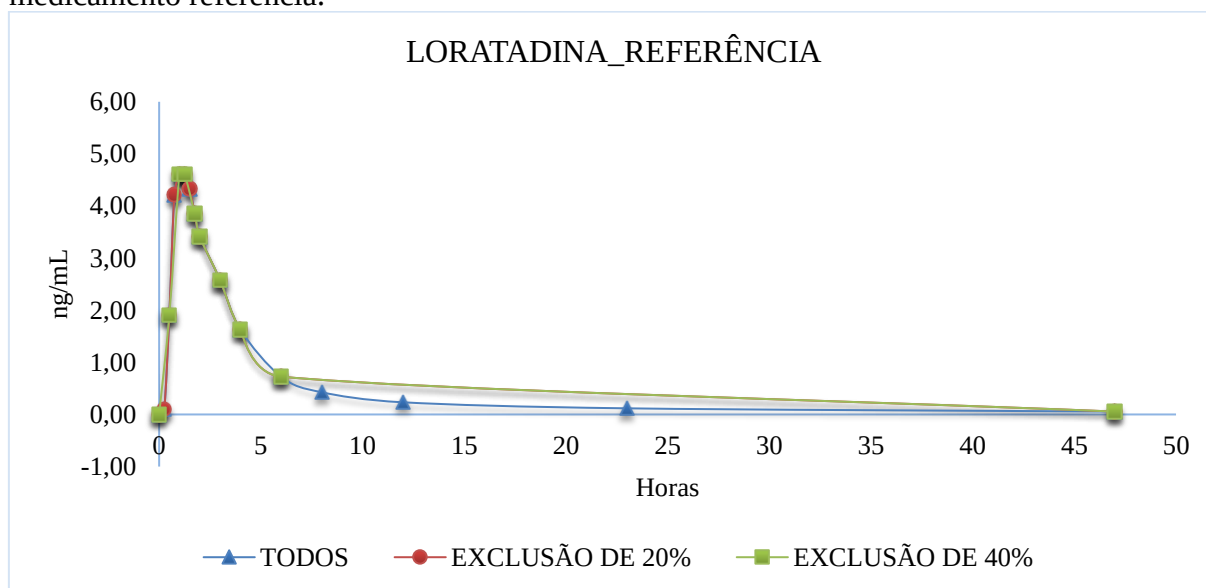
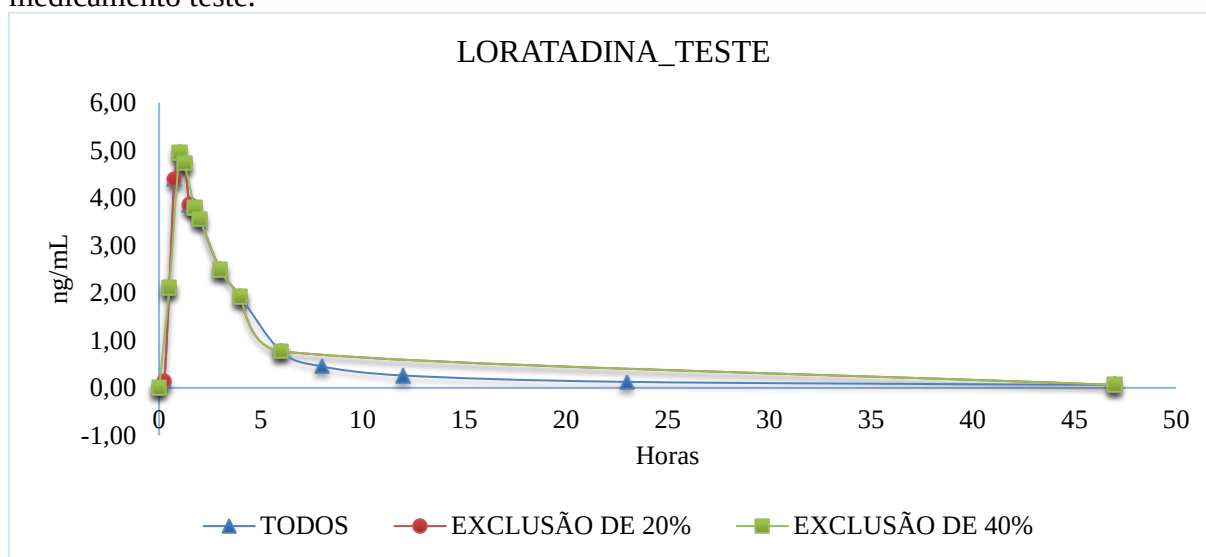
Figura 14 – Gráficos de concentração versus tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência.

Figura 15 – Gráficos de concentração versus tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.



Como podemos observar nas Figura 16 e Figura 17, as exclusões dos pontos de coleta afeta o perfil farmacocinético do medicamento. Nas Figura 14 e 15 a exclusão dos pontos aumentou a ASC do estudo da loratadina. Neste caso, os medicamentos teste e referência sofreram alterações semelhantes com a exclusão dos pontos de coleta, não afetando o resultado do estudo. Nas Figura 17 e 17 observamos que o $C_{m\acute{a}x}$ do medicamento referência foi afetado, ao contrário do medicamento teste, pois se excluiu o ponto onde se localizava o $C_{m\acute{a}x}$ do medicamento referência. Com a exclusão o $C_{m\acute{a}x}$ ficou menor, fazendo com que os perfis dos medicamentos ficassem mais similares e o intervalo de confiança menor para o $C_{m\acute{a}x}$.

Figura 16 – Gráficos de concentração versus tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência.

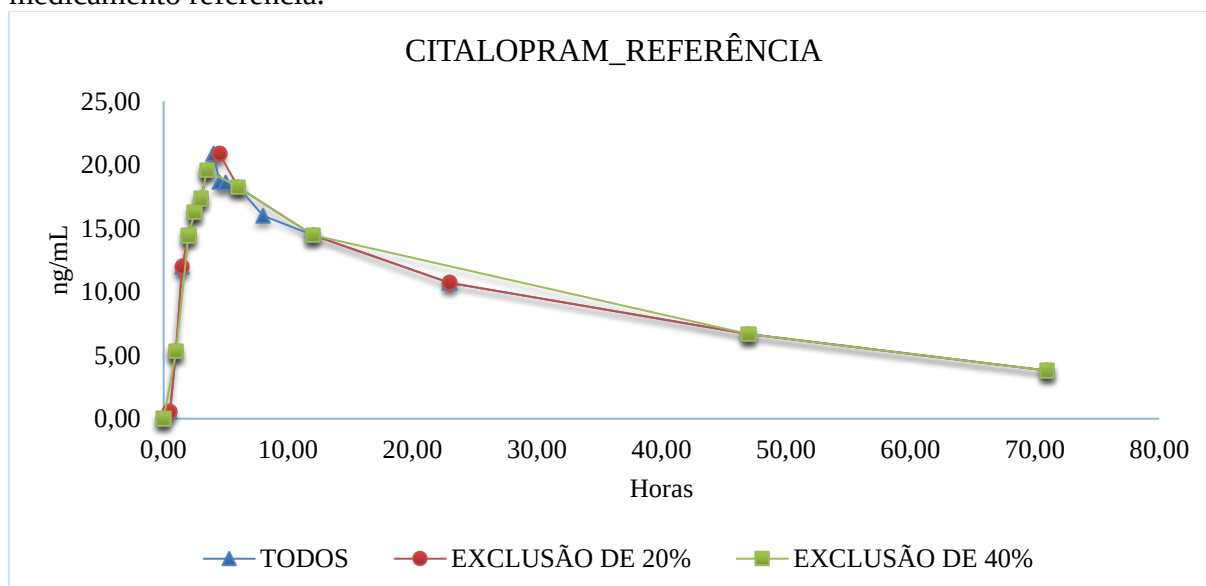
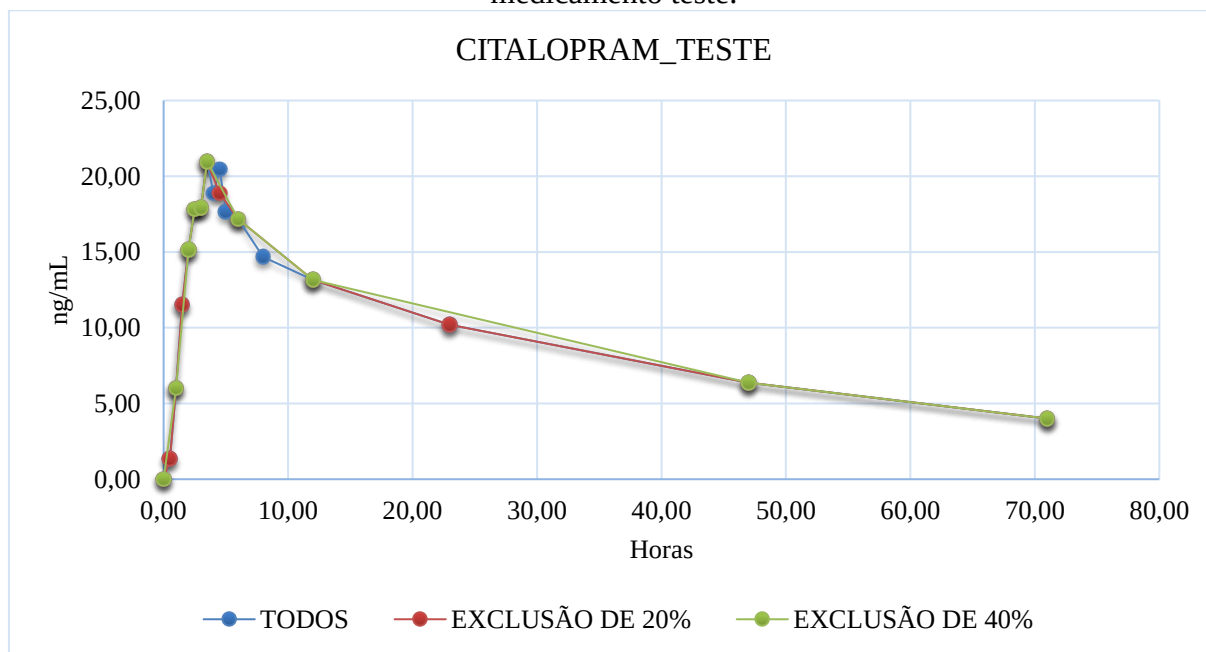


Figura 17 – Gráficos de concentração versus tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.



Todos os demais perfis farmacocinéticos mostrando o impacto da alteração do cronograma de coleta no $C_{máx}$ e ASC estão no Apêndice C. O efeito da exclusão do ponto de coleta no resultado do estudo irá depender do local onde o ponto foi excluído, mas é certo que o cronograma de coleta afeta o resultado do estudo de forma drástica e deveria ser mais controlado pela agência reguladora.

6.2.1.3. Coeficiente de variação e poder

Observa-se na Tabela 22 que o CV intra foi pouco afetado quando se analisa o $C_{máx}$, mas mesmo com pouca alteração, quando se reduz os pontos de coleta o CV Intra aumenta. No CV Intra da ASC foram obtidos resultados semelhantes, no entanto, houve uma relação maior entre o aumento dos pontos de coleta e a redução do CV Intra, ou seja, quando aumentamos os pontos de coleta, consegue-se aferir o resultado do estudo utilizando uma menor quantidade de participantes de pesquisa.

Como era de se esperar, o poder do teste se comportou de forma inversa ao observado no CV Intra, ou seja, quanto maior a quantidade de pontos de coleta, menor o poder do teste. Neste caso, a ANVISA estabelece que para ser considerado válido o resultado do estudo, o poder deve ser superior a 80% (BRASIL, 2003d).

Tabela 22 – Valores dos coeficientes de variação intrassujeitos para os diferentes cronogramas de coleta

FÁRMACO	CV Intra ($C_{m\acute{a}x}$)			CV Intra (ASC_{0-t})		
	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%
LORATADINA 10 MG	44.76%	44.76%	43.48%	31.40%	34.41%	34.70%
CITALOPRAM 20 MG	19.53%	19.27%	18.55%	11.79%	11.51%	11.79%
DIAZEPAM 10 MG	26.38%	26.39%	26.46%	15.38%	15.42%	16.79%
CLONAZEPAM 2 MG	22.63%	22.67%	22.68%	9.69%	9.63%	9.17%
LAMIVUDINA 150 MG	33.76%	33.89%	35.05%	15.24%	15.41%	16.75%
METILDOPA 250 MG	31.05%	36.01%	43.88%	27.70%	29.90%	35.47%
FLUCONAZOL 150 MG	12.28%	11.71%	12.81%	14.54%	5.48%	16.87%
TENOFOVIR 300 MG	28.47%	29.72%	29.76%	28.25%	35.27%	28.31%
TENOFOVIR 300 MG	19.19%	20.41%	18.23%	9.50%	9.43%	8.83%
ESCITALOPRAM 20 MG	14.72%	14.68%	15.50%	11.67%	14.15%	13.86%
MIDAZOLAM 15 MG	33.92%	34.85%	37.33%	17.01%	18.13%	21.28%
FLUCONAZOL 150 MG	5.99%	5.73%	5.52%	8.26%	8.25%	21.65%
MÉDIA	24.39%	25.01%	25.77%	16.70%	17.25%	19.62%

O resultado encontrado com a análise do poder do teste (Tabela 23) ratifica o encontrado na análise do CV Intra, que indica que o aumento da quantidade de pontos de coleta favorece a redução do CV Intra, o aumento do poder do teste e consequentemente a redução da quantidade de participantes de pesquisa necessários para condução do estudo.

Tabela 23 – Poder do teste dos parâmetros $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-t} para os diferentes cronogramas de coleta

FÁRMACO	Poder ($C_{m\acute{a}x}$)			Poder (ASC_{0-t})		
	TODOS	20%	40%	TODOS	20%	40%
LORATADINA 10 MG	80.81%	80.81%	82.61%	96.72%	94.05%	93.75%
CITALOPRAM 20 MG	99.09%	99.20%	99.45%	100.00%	100.00%	100.00%
DIAZEPAM 10 MG	96.30%	96.29%	96.22%	99.99%	99.99%	99.97%
CLONAZEPAM 2 MG	99.22%	99.21%	99.20%	100.00%	100.00%	100.00%
LAMIVUDINA 150 MG	78.03%	77.77%	75.45%	99.95%	99.94%	99.82%
METILDOPA 250 MG	90.40%	82.19%	68.80%	94.90%	92.08%	83.14%
FLUCONAZOL 150 MG	100.00%	100.00%	100.00%	99.98%	99.98%	99.85%
TENOFOVIR 300 MG	98.97%	99.54%	99.57%	100.00%	98.64%	100.00%
TENOFOVIR 300 MG	99.88%	99.75%	99.94%	100.00%	100.00%	100.00%
ESCITALOPRAM 20 MG	99.90%	99.90%	99.81%	100.00%	99.94%	99.95%
MIDAZOLAM 15 MG	86.77%	85.24%	81.02%	99.97%	99.93%	99.51%
FLUCONAZOL 150 MG	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	96.94%
MÉDIA	94.11%	93.33%	91.84%	96.72%	94.05%	93.75%

6.2.1.4. Intervalo de Confiança

De modo geral, o intervalo de confiança de 90% do $C_{\text{máx}}$ apresentou variação muito pequena com a exclusão de pontos de coleta, todavia, podemos observar uma tendência de aumento da variação do intervalo de confiança com a redução dos pontos de coleta. Resultado semelhante foi observado no estudo de Kano, 2008. No estudo da metildopa, ocorreu um afastamento do limite estabelecido pela ANVISA (80-125%) à medida que alguns pontos foram excluídos. O estudo do tenofovir alimentado não foi considerado bioequivalente com o cronograma de coleta completo, porém, quando pontos de coleta foram excluídos, os limites foram alterados e o intervalo ficou dentro do intervalo de 80-125%. Já no estudo do midazolam, ocorreu um fato interessante, quando excluímos 20% dos pontos, o estudo saiu do intervalo, quando excluímos mais 20%, o estudo voltou para o limite estabelecido. Os estudos cujos fármacos apresentavam menor meia vida plasmática foram mais afetados pela redução do cronograma de coleta, como podemos observar nos estudos da metildopa e do midazolam.

Tabela 24 – Intervalo de confiança de 90% para $C_{\text{máx}}$.

FÁRMACO	TODOS			20%			40%		
	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Variação	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Variação	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Variação
LORATADINA	80.2	107.5	27.3	80.2	107.5	27.3	83.5	111.0	27.5
CITALOPRAM	91.7	109.8	18.1	89.6	106.9	17.4	90.8	107.8	16.9
DIAZEPAM	85.5	105.9	20.4	85.9	106.4	20.5	85.6	106.0	20.4
CLONAZEPAM	90.2	109.7	19.4	93.1	111.3	18.2	93.1	111.3	18.2
LAMIVUDINA	71.9	97.6	25.7	71.9	97.8	25.9	71.7	98.4	26.7
METILDOPA	94.2	121.0	26.7	94.5	125.9	31.5	95.5	134.9	39.4
FLUCONAZOL	110.2	123.2	13.0	111.1	123.5	12.5	110.6	124.3	13.6
TENOFOVIR JEJUM	78.3	94.1	15.7	80.3	95.2	14.8	80.4	95.2	14.7
TENOFOVIR ALIMENTADO	94.5	110.1	15.5	93.3	109.7	16.3	95.4	110.2	14.8
ESCITALOPRAM	85.7	99.4	13.6	85.5	99.1	13.5	84.4	98.5	14.1
MIDAZOLAM	93.9	122.7	28.8	98.4	129.4	31.0	92.2	123.5	31.3
FLUCONAZOL	103.3	109.6	6.2	103.6	109.5	5.9	103.3	108.9	5.7
MÉDIA	90.0	109.2	19.2	90.6	110.1	19.6	90.5	111.0	20.3

Legenda: Lim. Inf.: Limite Inferior; Lim. Sup.: Limite Superior

O resultado da análise do intervalo de confiança de 90% para ASC_{0-t} (Tabela 25) foi bem similar ao encontrado no $C_{\text{máx}}$, no entanto, o aumento da variação do intervalo de confiança com a redução dos pontos de coleta foi maior que a observada no $C_{\text{máx}}$.

Tabela 25 – Intervalo de confiança de 90% para ASC_{0-t}.

CÓDIGO	TODOS			20%			40%		
	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Variação	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Variação	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Variação
NUD_01_11	90.92	112.18	21.26	87.16	109.63	22.47	87.79	110.62	22.83
NUD_02_11	90.66	101.13	10.47	90.41	100.59	10.18	88.43	98.65	10.22
NUD_02_12	96.97	109.98	13.01	97.03	110.09	13.06	95.27	109.29	14.02
NUD_03_11	96.11	103.89	7.78	96.46	104.14	7.68	97.60	104.99	7.39
NUD_04_12	87.89	101.20	13.31	87.38	100.77	13.39	86.58	101.07	14.49
NUD_05_12	95.47	119.41	23.94	96.68	123.02	26.34	100.86	133.90	33.04
NUD_26_10	98.95	112.91	13.96	98.90	112.83	13.93	94.13	109.66	15.53
NUD_29_10	91.83	102.16	10.33	87.73	105.96	18.23	91.70	101.87	10.17
NUD_30_10	98.64	106.38	7.74	98.55	106.23	7.68	99.48	106.72	7.24
NUD_31_10	89.90	101.06	11.16	89.44	103.04	13.60	89.48	102.80	13.32
NUD_32_10	82.32	94.39	12.07	84.90	98.21	13.31	81.04	96.09	15.05
NUD_35_10	93.81	101.63	7.82	93.79	101.59	7.80	83.12	102.31	19.19
MÉDIA	92.79	105.53	12.74	92.37	106.34	13.97	91.29	106.50	15.21

Legenda: Lim. Inf.: Limite Inferior; Lim. Sup.: Limite Superior

Nestas análises, observou-se que o cronograma de coleta pode influenciar os resultados dos estudos, gerando resultados tanto falsos positivos com também falsos negativos. Os fármacos que apresentam meia vida plasmática curta devem ter seus cronogramas de coleta elaborados de forma mais cuidadosa, pois são mais sensíveis as alterações nos seus cronogramas, já que em curto espaço de tempo ocorre uma variação significativa na concentração plasmática.

Uma maior quantidade de pontos faz com que os resultados sejam mais confiáveis, o CV Intra seja reduzido e a variação do intervalo de confiança seja menor, no entanto, a quantidade não pode ser excessiva, uma vez que aumenta o desconforto dos participantes de pesquisa e os custos dos estudos.

6.3. INFLUÊNCIA DA MASSA CORPORAL - MC E DO ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA – IMC

Neste item foi avaliado o impacto do processo de seleção, quanto aos critérios de massa corporal – MC e índice de massa corporal IMC nos parâmetros farmacocinéticos, no índice de variação intrassujeitos e nos intervalos de confiança da bioequivalência média para os parâmetros $C_{máx}$ e ASC_{0-t} . Foram escolhidos os estudos realizados pelo NUDFAC, entre os anos de 2010 e 2014. Quatorze estudos, com um total de 476 participantes de pesquisa foram escolhidos, destes, 176 foram excluídos para avaliação da influência da MC, tendo-se como amostra final apenas 300 participantes de pesquisa. Já na avaliação do IMC, foram excluídos 89 participantes de pesquisa e sobraram 387. Na Tabela 26, pode-se ver os dados de todos os estudos que participaram das análises da influência do MC e IMC. Por se tratar de um critério mais seletivo, o grupo MC teve uma quantidade significativamente maior de participantes de pesquisa excluídos. Neste caso, a legislação brasileira (RE nº 1170, de 19 de abril de 2006) estabelece apenas que o peso dos voluntários deverá estar em um limite de $\pm 15\%$ do peso considerado normal para homens e mulheres, levando-se em consideração altura e estrutura física. No caso de contraceptivos, recomenda-se que o limite de peso seja de $\pm 10\%$ (BRASIL, 2006).

Tabela 26 – Dados dos estudos que participaram das análises da influência do MC e IMC.

CÓDIGO DO ESTUDO	FÁRMACO / DOSE	QUANTIDADE		
		IMC	MC	TODOS
NUD_01_11	LORATADINA 10 MG	42	32	48
NUD_02_11	CITALOPRAM 20 MG	18	15	27
NUD_02_12	DIAZEPAM 10 MG	22	19	34
NUD_03_11	CLONAZEPAM 2 MG	31	19	36
NUD_04_12	LAMIVUDINA 150 MG	23	15	27
NUD_05_12	METILDOPA 250 MG	26	21	34
NUD_06_12	ESCOPOLAMINA 10 MG	49	31	60
NUD_26_10	FLUCONAZOL 150 MG	21	24	28
NUD_28_10	QUETIAPINA 25 MG	25	22	26
NUD_29_10	TENOFOVIR 300 MG	29	19	36
NUD_30_10	TENOFOVIR 300 MG	31	31	36
NUD_31_10	ESCITALOPRAM 20 MG	22	15	24
NUD_32_10	MIDAZOLAM 15 MG	27	21	35
NUD_35_10	FLUCONAZOL 150 MG	21	16	25
MÉDIA		28	21	34
DESVIO PADRÃO		9	6	10
TOTAL		387	300	476

6.3.1. Influência na concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$)

Foi calculado o poder do teste de todos os estudos para os grupos MC e IMC, conforme a Tabela 27, o grupo MC apresentou o menor poder. O poder do teste é uma variável que é proporcional a quantidade de participantes de pesquisa e inversamente proporcional o coeficiente de variação, ou seja, quanto maior a quantidade de participantes de pesquisa, maior é o poder do teste (BRASIL, 2003d). Portanto, o grupo MC que apresentou a menor quantidade de voluntário também apresentou o menor poder do teste.

Tabela 27 – Variação do poder do teste de acordo com o grupo analisado.

FÁRMACO / DOSE	PODER ($C_{\text{máx}}$)		
	IMC N= 387	MC N=300	TODOS N=476
LORATADINA 10 MG	74%	67%	81%
CITALOPRAM 20 MG	91%	80%	99%
DIAZEPAM 10 MG	93%	92%	96%
CLONAZEPAM 2 MG	97%	86%	99%
LAMIVUDINA 150 MG	71%	73%	78%
METILDOPA 250 MG	81%	71%	90%
ESCOPOLAMINA 10 MG	88%	72%	94%
FLUCONAZOL 150 MG	100%	100%	100%
QUETIAPINA 25 MG	95%	92%	96%
TENOFOVIR 300 MG	95%	91%	99%
TENOFOVIR 300 MG	100%	100%	100%
ESCITALOPRAM 20 MG	100%	98%	100%
MIDAZOLAM 15 MG	73%	63%	87%
FLUCONAZOL 150 MG	100%	100%	100%
MÉDIA	90%	85%	94%
DP	11%	13%	7%

O intervalo de confiança de 90% da bioequivalência média (Tabela 28) apresentou variações menores para os grupos com quantidades maiores de participantes de pesquisa. No caso, o grupo com todos os participantes de pesquisa apresentou menor intervalo que o grupo IMC, que por sua vez apresentou menor intervalo que o grupo MC. Quando aumentamos a quantidade de participantes de pesquisa de um grupo que se distribui de forma normal, a variação tende a ser reduzida e consequentemente seu intervalo de confiança

Tabela 28 – Variação do intervalo de confiança 90% para os grupos do $C_{máx}$.

FÁRMACO	Limite Inferior (%)			Limite Superior (%)			Intervalo (LS-LI) (%)		
	IMC	MC	TODOS	IMC	MC	TODOS	IMC	MC	TODOS
LORATADINA	81.1	88.3	80.2	111.8	126.0	107.5	30.7	37.7	27.3
CITALOPRAM	90.2	87.5	91.7	115.3	118.3	109.8	25.1	30.8	18.1
DIAZEPAM	81.4	78.5	85.6	102.8	100.1	106.0	21.4	21.6	20.4
CLONAZEPAM	92.7	89.2	93.3	113.8	117.1	111.5	21.1	28.0	18.2
LAMIVUDINA	68.2	61.5	71.9	95.4	85.7	97.7	27.2	24.9	25.7
METILDOPA	90.8	88.54	94.3	121.9	123.9	121.0	31.1	35.4	26.7
ESCOPOLAMINA	92.6	83.9	94.9	120.3	117.0	119.2	27.8	33.1	24.2
FLUCONAZOL	110.9	110.2	110.2	126.0	127.2	123.2	15.1	17.1	13.0
QUETIAPINA	101.3	102.9	100.9	127.1	131.3	125.5	25.8	28.3	24.7
TENOFOVIR JEJUM	78.03	76.2	78.3	97.5	97.6	94.1	19.5	21.4	15.7
TENOFOVIR ALIMENTADO	96.4	97.4	94.5	114.1	113.6	110.0	17.7	16.2	15.5
ESCITALOPRAM	83.7	83.2	84.5	97.2	100.9	100.9	13.5	17.7	16.4
MIDAZOLAM	88.6	82.3	93.9	123.1	119.4	122.7	34.5	37.1	28.8
FLUCONAZOL	102.6	102.4	103.4	109.9	111.6	109.6	7.3	9.2	6.2
MÉDIA	89.7	88.3	91.0	110.0	113.3	110.7	22.3	25.0	19.7
DP	11.5	12.9	10.7	11.0	13.6	10.0	7.8	8.8	6.6

Legenda: LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior; DP: Desvio Padrão

O coeficiente de variação intrassujeito – CV Intra é um dos dados mais importantes que se deve conhecer para realização de um planejamento adequado de estudo de bioequivalência cruzado. O CV Intra, informa, neste caso, a variabilidade do $C_{máx}$ quando o mesmo voluntário toma mais de uma dose de um determinado medicamento. No método proposto por Chow, 2000, e atualmente adotado pela ANVISA, para realização da análise da bioequivalência média nos desenhos cruzados, o mesmo voluntário toma o medicamento teste e o referência, então, cada voluntário é controle dele mesmo, portanto é eliminado a influência da variação intersujeito no resultado do estudo.

Na Tabela 29, pode-se ver os dados encontrados dos coeficientes de variação intrassujeitos para os grupos IMC, MC e TODOS. Os resultados mostram que a exclusão dos participantes de pesquisa que estão com IMC e MC fora da margem de 15% da média do estudo não interfere no CV Intra, ou seja, nos desenhos cruzados, a massa e o índice de massa corporal não influenciam nos resultados dos estudos ou na quantidade de participantes de pesquisa necessários para condução do mesmo. Embora, as legislações de alguns países sejam mais restritivas que a brasileira quanto o IMC dos participantes de pesquisa que podem ser recrutados para estudos de bioequivalência, os resultados desta análise mostram que não existe impacto

nos resultados dos estudos. Essas restrições, muitas vezes, apenas aumenta o trabalho e os custos dos estudos. Podendo refletir no custo final de medicamentos imprescindíveis para a população.

Tabela 29 – Coeficiente de variação intrassujeitos – CV Intra do ($C_{\text{máx}}$)

FÁRMACO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO INTRASSUJEITOS ($C_{\text{máx}}$)		
	IMC	MC	TODOS
LORATADINA	45.83%	43.47%	44.76%
CITALOPRAM	21.29%	23.12%	19.53%
DIAZEPAM	22.60%	21.02%	26.38%
CLONAZEPAM	24.13%	24.48%	22.63%
LAMIVUDINA	33.92%	26.00%	33.76%
METILDOPA	31.79%	32.28%	31.05%
ESCOPOLAMINA	39.28%	39.99%	37.85%
FLUCONAZOL	12.90%	13.54%	12.28%
QUETIAPINA	37.14%	39.54%	36.71%
TENOFOVIR JEJUM	25.14%	21.86%	23.28%
TENOFOVIR ALIMENTADO	19.36%	12.66%	22.88%
ESCITALOPRAM	14.20%	14.92%	14.72%
MIDAZOLAM	36.28%	35.56%	33.92%
FLUCONAZOL	6.40%	6.87%	5.99%
MÉDIA	26.45%	25.38%	26.12%
DESVIO PADRÃO	11.33%	11.38%	10.89%

O coeficiente de variabilidade intersujeito – CV Inter informa a variabilidade entre participantes de pesquisa diferentes quando tomam o mesmo medicamento. Não é um valor importante para os desenhos cruzados, mas extremamente importante para desenhos paralelos. Na Tabela 30, pode-se verificar os valores do CV Inter para os grupos analisados. Neste caso, a exclusão dos participantes de pesquisa que apresentavam MC com variação maior que 15% da média do estudo se mostrou mais eficiente na redução do CV Inter que os outros grupos. Embora a MC e o IMC não sejam motivos de tanta preocupação em estudos cruzados, nos estudos paralelos, o aumento do rigor na seleção dos participantes de pesquisa, quanto a esses parâmetros, pode reduzir significativamente os vieses e aumentar a qualidade e fidedignidade dos estudos.

Tabela 30 – Coeficiente de variação intersujeitos – CV Inter do ($C_{m\acute{a}x}$)

FÁRMACO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO INTERSUJEITOS ($C_{m\acute{a}x}$)		
	IMC	MC	TODOS
LORATADINA	125.21%	119.61%	122.31%
CITALOPRAM	18.12%	6.62%	23.34%
DIAZEPAM	34.50%	20.75%	35.57%
CLONAZEPAM	19.57%	17.69%	20.92%
LAMIVUDINA	25.83%	21.23%	24.80%
METILDOPA	57.09%	56.55%	69.57%
ESCOPOLAMINA	86.47%	76.51%	87.11%
FLUCONAZOL	23.64%	15.83%	22.63%
QUETIAPINA	37.14%	39.54%	36.71%
TENOFOVIR JEJUM	24.34%	24.86%	28.48%
TENOFOVIR ALIMENTADO	20.23%	12.66%	20.15%
ESCITALOPRAM	26.31%	26.52%	27.39%
MIDAZOLAM	40.46%	36.16%	41.54%
FLUCONAZOL	19.65%	18.14%	21.56%
MÉDIA	39.90%	35.19%	41.58%
DESVIO PADRÃO	30.83%	30.62%	30.47%

Busca-se verificar, também, se existe alguma relação linear, exponencial ou logarítmica entre a MC e o IMC com o $C_{m\acute{a}x}$, no entanto, nenhuma correlação foi encontrada, conforme observamos nas Figura 18 e 19.

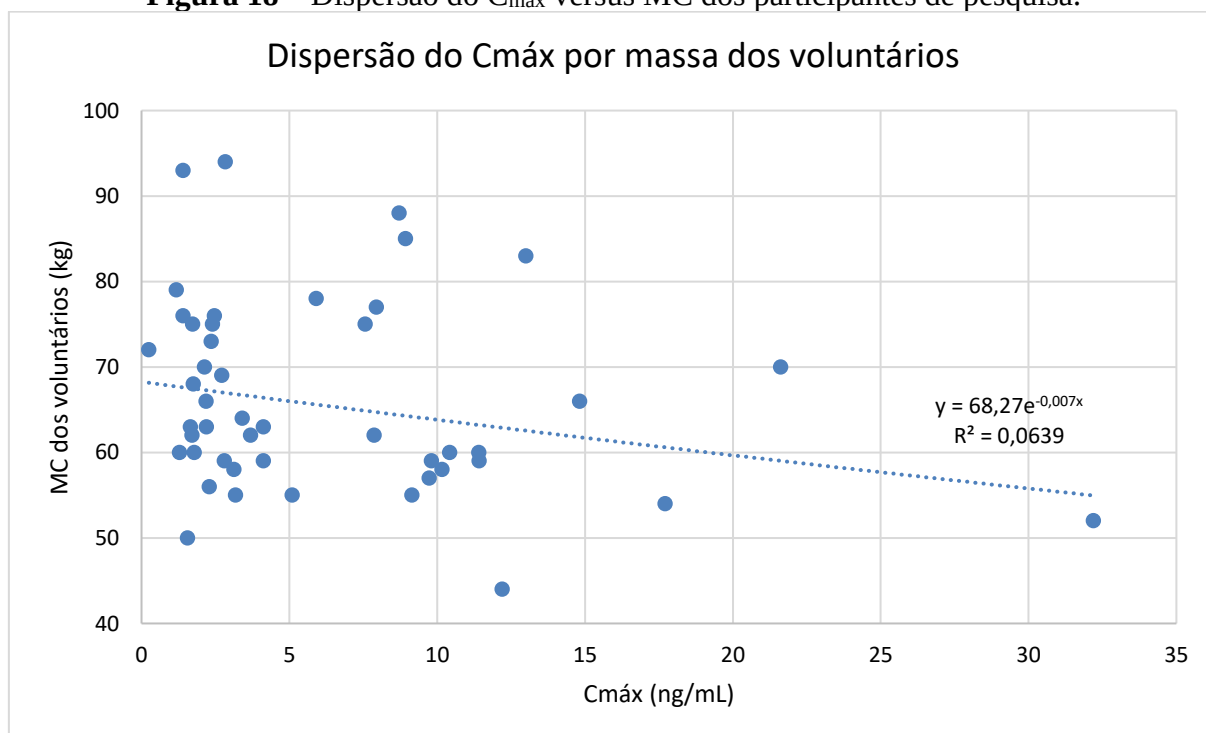
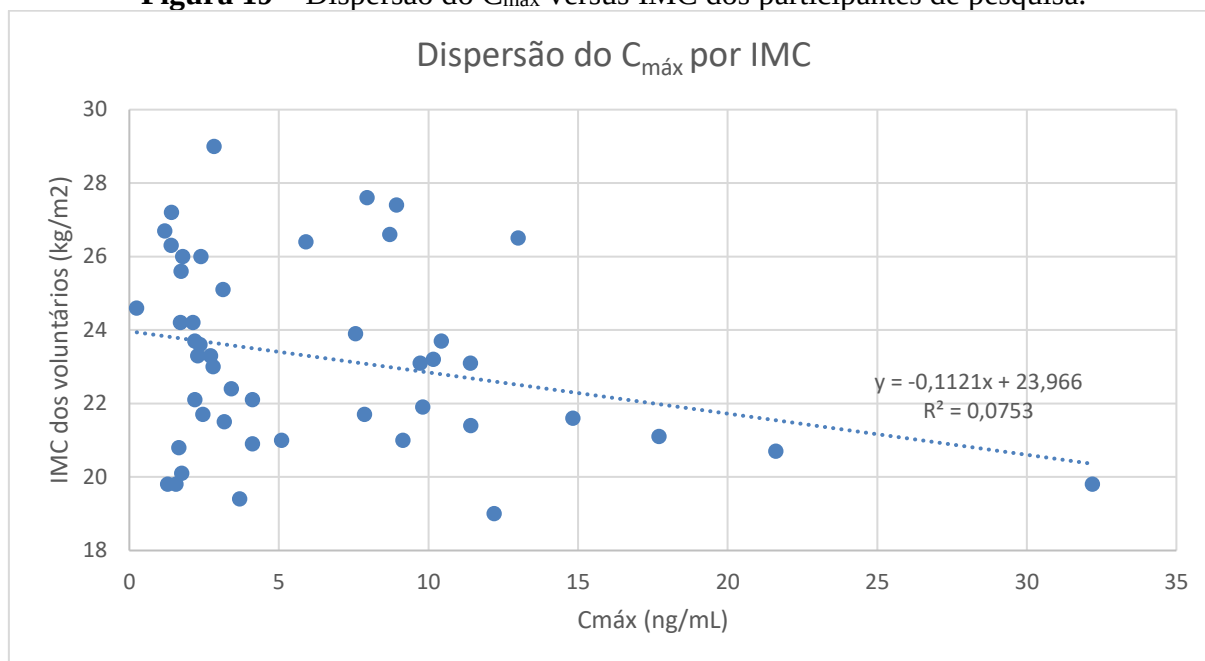
Figura 18 – Dispersão do $C_{m\acute{a}x}$ versus MC dos participantes de pesquisa.

Figura 19 – Dispersão do $C_{m\acute{a}x}$ versus IMC dos participantes de pesquisa.

6.3.2. Influência na área sob a curva de zero até o último ponto de coleta (ASC_{0-t})

Foi calculado o poder do teste da ASC_{0-t} de todos os estudos para os grupos MC, IMC e TODOS, conforme a Tabela 31. O grupo MC apresentou o menor poder, no entanto, a diferença entre os grupos foi menor que a observada no $C_{m\acute{a}x}$. Quando se fez o planejamento dos estudos se buscou o maior CV Intra, que geralmente é do $C_{m\acute{a}x}$ e a quantidade de participantes de pesquisa excede a necessária para se obter um poder de teste de 100% para a ASC_{0-t} . Por isso, quando se reduziu uma pequena quantidade de participantes de pesquisa o poder do teste da ASC_{0-t} sofre pouco ou nenhum impacto, como podemos observar na Tabela 31.

O intervalo de confiança de 90% da bioequivalência média (Tabela 32) apresentou intervalos menores para os grupos com quantidades maiores de participantes de pesquisa. No caso, o grupo com todos os participantes de pesquisa apresentou menor intervalo que o grupo IMC, que por sua vez apresentou menor intervalo que o grupo MC.

Tabela 31 – Variação do poder do teste de acordo com o grupo analisado.

FÁRMACO	PODER (ASC_{0-t})		
	IMC	MC	TODOS
LORATADINA	92%	84%	97%
CITALOPRAM	100%	99%	100%
DIAZEPAM	100%	97%	100%
CLONAZEPAM	100%	100%	100%
LAMIVUDINA	100%	100%	100%
METILDOPA	88%	78%	95%
ESCOPOLAMINA	89%	75%	94%
FLUCONAZOL	100%	100%	100%
QUETIAPINA	95%	89%	95%
TENOFOVIR JEJUM	100%	99%	100%
TENOFOVIR ALIMENTADO	100%	100%	100%
ESCITALOPRAM	100%	100%	100%
MIDAZOLAM	99%	97%	100%
FLUCONAZOL	100%	100%	100%
MÉDIA	97%	94%	99%
DESVIO PADRÃO	4%	9%	2%

Tabela 32 – Variação do intervalo de confiança (90%) para os grupos da ASC_{0-t}.

FÁRMACO	Limite Inferior (%)			Limite Superior (%)			Intervalo (LS-LI) (%)		
	IMC	MC	TODOS	IMC	MC	TODOS	IMC	MC	TODOS
LORATADINA	89.6	92.7	90.9	113.9	122.6	112.2	24.3	29.9	21.3
CITALOPRAM	86.4	85.5	90.7	98.6	102.4	101.1	12.2	16.9	10.5
DIAZEPAM	95.6	90.5	96.9	107.6	111.7	110.0	12.0	21.2	13.0
CLONAZEPAM	97.2	90.6	96.5	104.6	102.8	104.2	7.4	12.2	7.7
LAMIVUDINA	87.0	83.8	87.9	100.6	94.6	101.2	13.6	10.8	13.3
METILDOPA	93.2	87.7	95.5	120.8	119.1	119.4	27.7	31.4	23.9
ESCOPOLAMINA	95.9	85.7	97.9	123.9	117.6	123.1	28.0	32.0	25.2
FLUCONAZOL	96.9	98.1	98.9	112.8	115.8	112.9	15.9	17.8	14.0
QUETIAPINA	99.0	98.2	100.8	123.7	126.8	125.7	24.7	28.6	24.9
TENOFOVIR JEJUM	90.0	87.3	91.8	102.8	103.8	102.2	12.8	16.5	10.3
TENOFOVIR ALIMENTADO	97.7	98.1	98.6	107.0	107.1	106.4	9.3	9.0	7.7
ESCITALOPRAM	88.7	86.6	88.8	100.4	102.1	102.3	11.6	15.5	13.5
MIDAZOLAM	79.5	75.1	82.3	94.4	91.9	94.4	14.8	16.8	12.1
FLUCONAZOL	92.7	95.6	93.8	102.0	104.5	101.6	9.3	8.8	7.8
MÉDIA	92.1	89.7	93.7	108.1	108.8	108.3	16.0	19.1	14.7
DESVIO PADRÃO	5.5	6.6	5.2	9.5	10.4	9.3	7.1	8.2	6.4

Legenda: LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior

Na Tabela 33 podemos ver os dados encontrados dos coeficientes de variação intrassujeitos para os grupos IMC, MC e TODOS mostrando que a exclusão dos participantes de pesquisa que estão com IMC e MC fora da margem de 15% da média do estudo não interfere no CV Intra, da mesma forma que não interfere no CV Intra do $C_{máx}$. Portanto, a MC e o IMC não são fatores importantes no processo de seleção para estudos cruzados e dificilmente afetará o resultado do estudo.

Tabela 33 – Coeficiente de variação Inter e Intrassujeitos para ASC_{0-t}

FÁRMACO	CV Intra			CV Inter		
	IMC	IMC	MC	TODOS	MC	TODOS
LORATADINA	33.50%	33.50%	33.52%	136.25%	134.89%	135.32%
CITALOPRAM	11.36%	11.36%	13.73%	25.65%	13.73%	31.74%
DIAZEPAM	11.37%	11.37%	18.17%	27.40%	27.22%	34.25%
CLONAZEPAM	8.52%	8.52%	11.20%	19.55%	19.16%	21.73%
LAMIVUDINA	14.38%	14.38%	9.37%	28.23%	20.76%	25.76%
METILDOPA	27.90%	27.90%	29.23%	72.97%	70.77%	87.34%
ESCOPOLAMINA	38.27%	38.27%	37.99%	128.55%	113.65%	129.88%
FLUCONAZOL	15.37%	15.37%	15.67%	17.58%	17.77%	16.95%
QUETIAPINA	53.71%	53.71%	54.36%	53.71%	54.36%	52.23%
TENOFOVIR JEJUM	14.92%	14.92%	15.24%	28.91%	24.12%	28.25%
TENOFOVIR ALIMENTADO	18.64%	18.64%	14.94%	18.64%	14.94%	22.88%
ESCITALOPRAM	11.66%	11.66%	12.72%	25.72%	28.21%	29.99%
MIDAZOLAM	18.44%	18.44%	18.94%	34.88%	30.61%	32.13%
FLUCONAZOL	8.99%	8.99%	7.04%	20.02%	20.54%	22.62%
MÉDIA	20.50%	20.50%	20.87%	45.6%	42.2%	47.9%
DESVIO PADRÃO	13.20%	13.20%	13.26%	40%	38%	40%

Já o CV Inter (Tabela 33) foi reduzido com a exclusão dos participantes de pesquisa, ou seja, quanto mais somos criteriosos no processo de recrutamento dos participantes de pesquisa quanto a MC e IMC, menor será o CV Inter do estudo. Embora o CV Inter não afete os resultados dos estudos cruzados este poderá influenciar os estudos paralelos.

Tentamos também verificar, se existe alguma relação linear, exponencial ou logarítmica entre a MC e o IMC dos participantes de pesquisa com ASC_{0-t} , no entanto, nenhuma relação foi encontrada, pois o coeficiente de correlação (R^2) encontrado foi muito baixo em todas as relações avaliadas.

6.4. APLICAÇÃO DAS FERRAMENTAS DE METANÁLISE

Inicialmente, foram selecionados 61 estudos realizados pelo NUDFAC, no entanto, após a aplicação dos critérios de exclusão estabelecidos no protocolo da metanálise restaram os seguintes fármacos: fluconazol, lamivudina, sulfametoxazol e trimetoprima.

Para que possamos fazer a metanálise precisou-se dos dados transformados em logaritmo natural - $\ln$ do $C_{\text{máx}}$ e ASC dos medicamentos teste e referência e do erro médio quadrático do estudo. Esses dados foram calculados através do software estatístico WinNonlin e transferidos para planilha do Microsoft Excel para realização dos cálculos da metanálise.

Antes de realizar a metanálise destes fármacos, precisamos verificar a homocedasticidade dos medicamentos referência, conforme a exigência da técnica proposta por Chow. Esta análise verifica justamente se existe semelhanças entre os valores de $C_{\text{máx}}$ e ASC dos medicamentos referência. O teste de homocedasticidade é realizado através do método do χ^2 (qui-quadrado) com nível de significância de 5%.

O estudo com a metildopa, embora não tenha obedecido os critérios de inclusão da metanálise, por não ser aprovado no teste de homocedasticidade dos medicamentos referências, foi apresentado para mostrar o rigor deste teste. Pequenas variações dos parâmetros farmacocinéticos do medicamento referência pode inviabilizar a realização desta técnica. Por outro lado, não pode-se comparar dois ou mais medicamentos teste em estudos independentes se nem mesmo os medicamentos referência são semelhantes.

6.4.1. Metildopa

As análises com o fármaco metildopa foram realizadas com três estudos de fabricantes diferentes, sendo utilizado a forma de comprimido revestido de 500 mg e o medicamento referência foi o Aldomet® da Aspen Pharma em todos os estudos. Os dados analisados estão disponíveis na Tabela 34. Os estudos 1, 2 e 3 foram conduzidos com 34, 25 e 36 participantes de pesquisa, respectivamente. Sendo que o número 2 foi realizado somente com homens e os demais com ambos os gêneros.

Foi verificado com avaliação da homogeneidade dos medicamentos referência (Tabela 35) que eles eram estatisticamente diferentes, pois o valor de P é inferior a 0,05, inviabilizando a continuação da realização da metanálise. Fizemos também os cálculos para verificar se os valores de $C_{\text{máx}}$ e ASC do medicamento referência eram homogêneos entre os

estudos 1 e 3, pois os valores observados no estudo 1 são visivelmente inferiores aos demais, no entanto, os dados não foram considerados homogêneos.

Tabela 34 – Dados dos estudos da metildopa analisados.

ESTUDO	1		2		3	
PARÂMETROS	C _{máx}	ASC _{0-t}	C _{máx}	ASC _{0-t}	C _{máx}	ASC _{0-t}
Média Transformada do Medicamento Referência - (ln)	6.60048	7.82513	0.43157	1.98726	7.75142	9.25348
Média Transformada do Medicamento Teste - (ln)	6.66630	7.89065	0.41985	1.98476	7.92030	9.40381
Erro médio quadrático	0.09207	0.07392	0.05646	0.04831	0.09524	0.07078
Número de Voluntário da sequência RT	17		12		18	
Número de Voluntário da sequência TR	17		13		18	

Tabela 35 – Teste de homogeneidade dos medicamentos referência.

PARÂMETROS	C _{máx}	ASC _{0-t}
Número de estudos	3	
$\bar{W}$	31.65333333	
Grand Mean "R"	5.415	6.832
χ^2_R	864.174201	830.472332
P- valor	0.0000	0.0000
$\bar{d}$	0.084508693	0.079792102
σ_e^2	0.08407884	0.066102481
$Var(\bar{d})$	0.000885413	0.000696109

Com os dados obtidos nos estudos da metildopa, observou-se que ferramenta de metanálise empregada apresenta algumas limitações para avaliação da bioequivalência de medicamentos em estudos independentes. Uma delas é a dificuldade na obtenção de homogeneidade dos valores de C_{máx} e ASC dos medicamentos referência. Os valores de C_{máx}

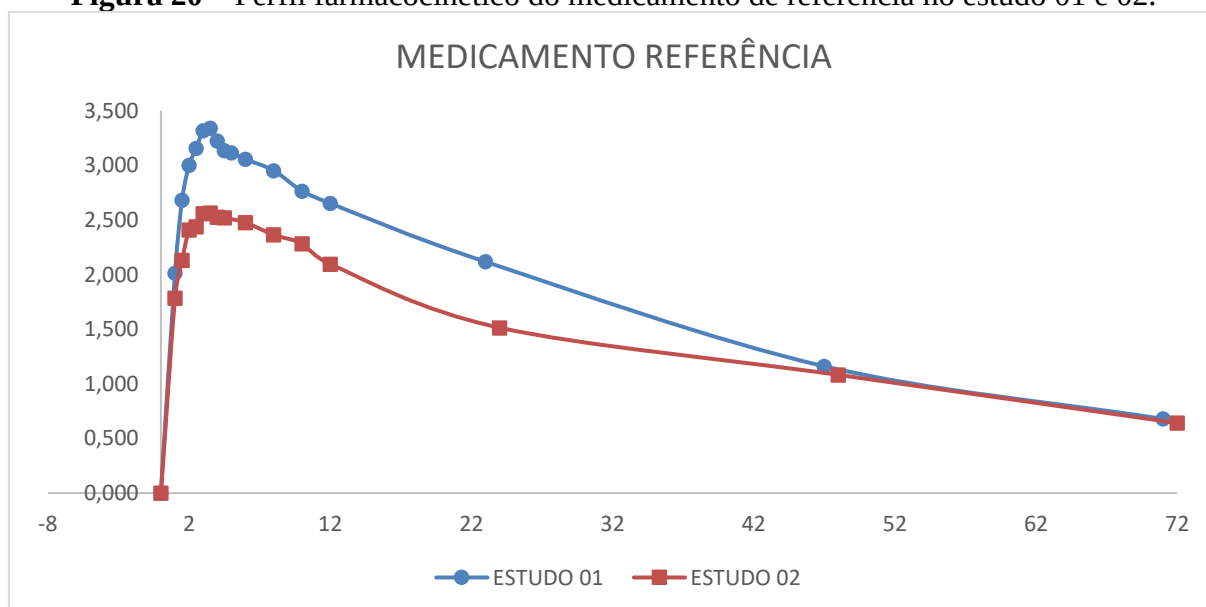
e ASC podem sofrer a influência da população empregada, do cronograma de coleta e até da coleta e do processamento das amostras durante o estudo.

6.4.2. Fluconazol

Foi realizado a metanálise com dois estudos de diferentes patrocinadores com o fluconazol, nos quais o medicamento referência utilizado foi o Zoltec® da Pfizer e a forma farmacêutica sendo a cápsula de 150 mg. Os estudos foram realizados com participantes de pesquisa saudáveis de ambos os gêneros e tiveram cronograma de coleta bem semelhantes. O estudo 01 teve o cronograma 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 8, 10, 12, 23, 47 e 71 horas, e o estudo 02 o seguinte 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 6, 8, 10, 12, 23, 47 e 72 horas.

Na Figura 20, pode-se observar que o medicamento referência apresentou o seu perfil de absorção e eliminação visualmente diferentes entre estudos independentes, no entanto, essa alteração não foi estatisticamente diferente quanto utilizamos o teste do χ^2 (qui-quadrado) proposto pelo método de análise da metanálise. É imprescindível que o medicamento referência seja estatisticamente semelhante entre os estudos independentes, pois seria difícil comparar os medicamentos teste, se nem mesmo o perfil do medicamento referência é semelhantes entre os estudos.

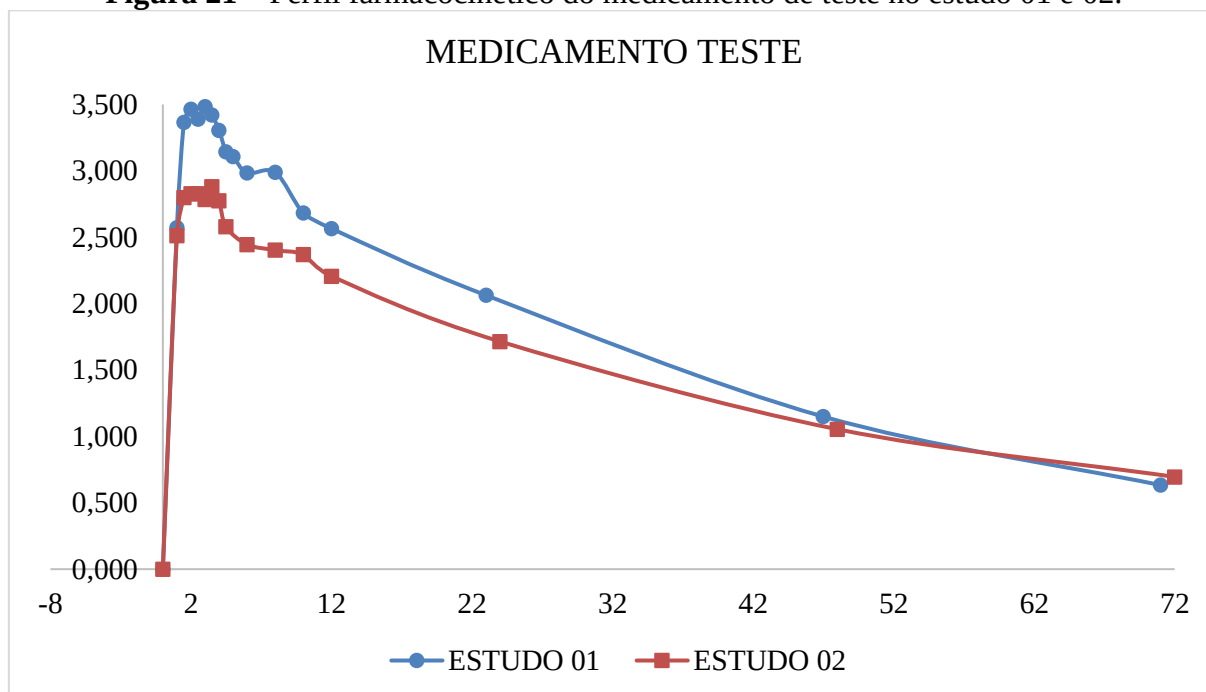
Figura 20 – Perfil farmacocinético do medicamento de referência no estudo 01 e 02.



Já na Figura 21, pode-se observar o gráfico com o perfil farmacocinético dos medicamentos teste, neste caso, medicamentos diferentes (teste 1 e teste 2) em estudos

independentes. Embora os medicamentos teste apresentem perfis diferentes, estes são semelhantes aos seus pares de medicamento referência nos estudos independentes.

Figura 21 – Perfil farmacocinético do medicamento de teste no estudo 01 e 02.



Os dados transformados do $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-t} dos medicamentos teste e referência, são observados na Tabela 36.

Tabela 36 – Dados dos estudos com o fluconazol.

ESTUDO	1		2	
PARÂMETROS	$C_{m\acute{a}x}$	ASC_{0-t}	$C_{m\acute{a}x}$	ASC_{0-t}
Média Transformada do Medicamento Referência - (ln)	1.06798	4.54940	1.24129	4.74771
Média Transformada do Medicamento Teste - (ln)	1.22025	4.60483	1.30366	4.72164
Erro médio quadrático	0.01497	0.20930	0.00358	0.00038
Número de Voluntário da sequência RT	14		12	
Número de Voluntário da sequência TR	14		13	

Após a realização do teste do χ^2 (qui-quadrado) encontramos um valor de P para o $C_{m\acute{a}x}$ de 0.5290 e de 0.4713 para ASC_{0-t} (Tabela 37), todos superiores a 0.05, informando que o medicamento referência é estatisticamente semelhante entre os dois estudos.

Tabela 37 – Teste de homogeneidade dos medicamentos referência.

PARÂMETROS	$C_{\text{máx}}$	ASC_{0-t}
Número de estudos	2	
$\bar{W}$	26.48	
Grand Mean "R"	1.150	4.643
χ^2_R	0.396348	0.518993
P- valor	0.5290	0.4713
$\bar{d}$	0.109901568	0.017019239
σ_e^2	0.009624269	0.111233388
$Var(\bar{d})$	0.000181727	0.002100328

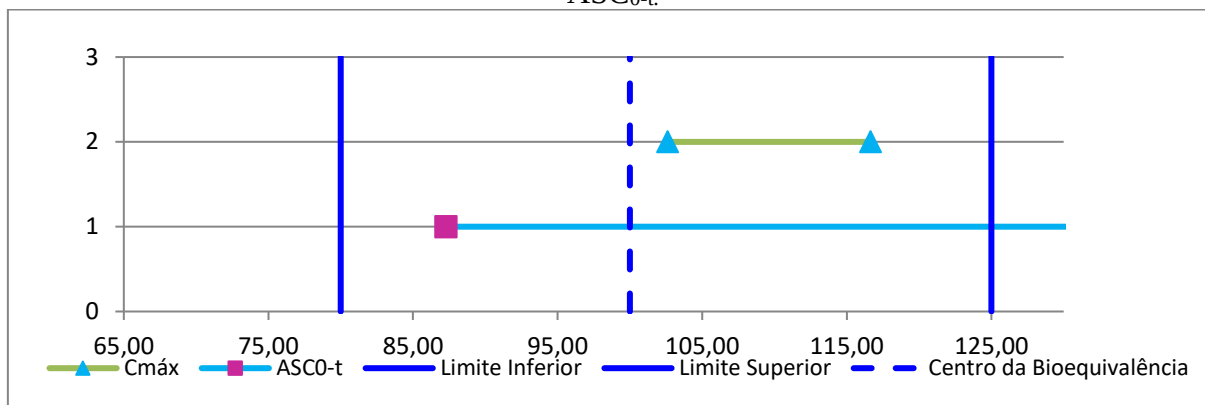
Após a realização da metanálise obtivemos os resultados mostrados na Tabela 38 e na Figura 22. O intervalo de confiança (90%) para o $C_{\text{máx}}$ ficou entre 80 e 125%, dentro do estabelecido pela legislação brasileira para determinação da bioequivalência, ou seja, pode-se confirmar que o $C_{\text{máx}}$ do medicamento “teste 1” é equivalente ao “teste 2”. Já quando analisamos a ASC_{0-t} encontramos valores fora do intervalo necessário para considerar os medicamentos bioequivalentes.

Se adotarmos os critérios estabelecidos pela ANVISA, podemos informar que o medicamento “teste 1” não é bioequivalente ao medicamento “teste 2”, pois os valores de ASC_{0-t} ficam fora do intervalo de 80-125%.

Tabela 38 – Comparação do intervalo de confiança (90%) entre os medicamentos teste.

PARÂMETROS	INTERVALO DE CONFIANÇA			
	$C_{\text{máx}}$		ASC_{0-t}	
Teste 1 versus Teste 2	102.62	116.64	87.26	134.89

Figura 22 – Gráfico do Intervalo de confiança (90%) dos medicamentos teste para o $C_{\text{máx}}$ e ASC_{0-t} .

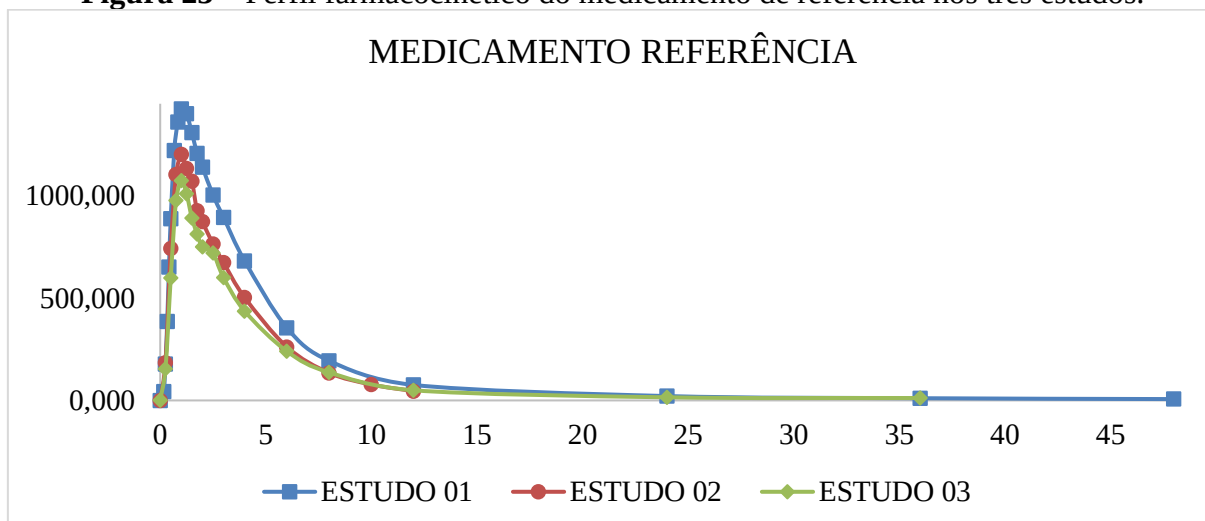


6.4.3. Lamivudina

Foram analisados três estudos com a lamivudina, na forma farmacêutica comprimido revestido de 150 mg. Dois dos estudos foram realizados pelo NUDFAC e o outro tiveram os dados fornecidos por laboratório parceiro. Os estudos foram realizados com participantes de pesquisa saudáveis de ambos os gêneros e tiveram os seguintes cronogramas de coleta. Estudo 01 (0; 0.1667; 0.25; 0.3333; 0.4167; 0.5; 0.6667; 0.8333; 1; 1.25; 1.5; 1.75; 2; 2.5; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 36 e 48 horas); estudo 02 (0; 0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5; 1.75; 2; 2.5; 3; 4; 6; 8; 10; 12 e 24 horas); estudo 03 (0; 0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5; 1.75; 2; 2.5; 3; 4; 6; 8; 12; 24 e 36 horas).

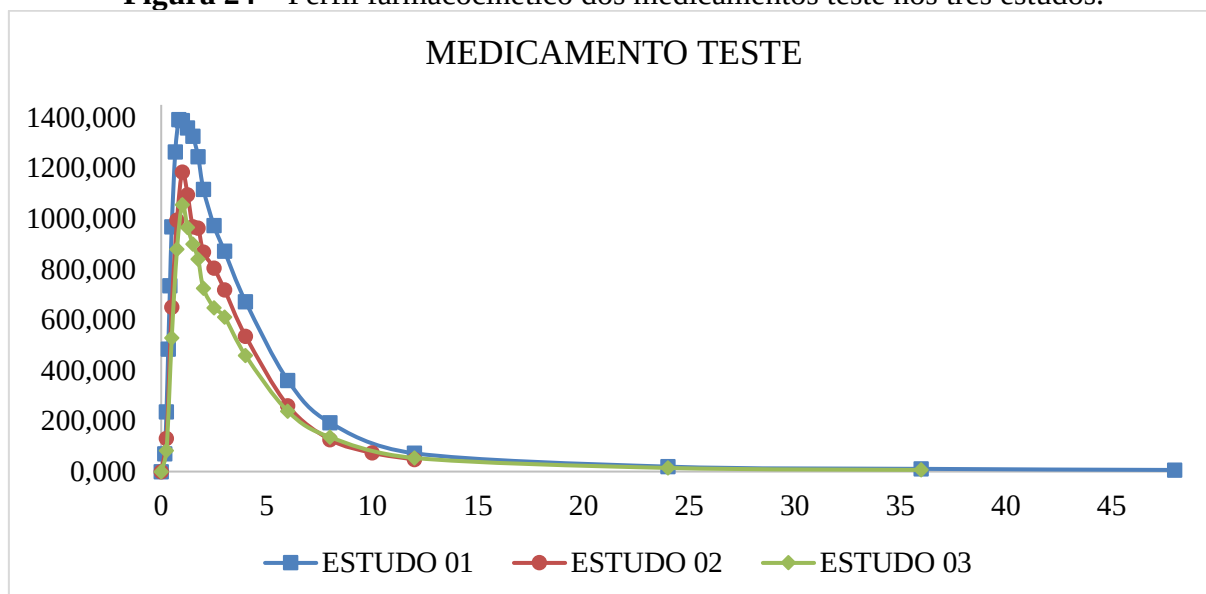
Na Figura 23, pode-se ver os perfis farmacocinéticos do medicamento referência nos três estudos realizados. Neste gráfico observamos que houve variação visível dos perfis dos medicamentos referência nos estudos independentes, mas precisou-se realizar o teste de χ^2 para verificar se essa diferença é estatisticamente significativa.

Figura 23 – Perfil farmacocinético do medicamento de referência nos três estudos.



Já na Figura 24 podemos observar o gráfico com o perfil farmacocinético dos medicamentos teste, neste caso, medicamentos diferentes (teste 1, teste 2 e teste 3) em estudos independentes. Embora os medicamentos teste apresentem perfis diferentes, estes foram bioequivalentes quando nos seus respectivos estudos independentes.

Figura 24 – Perfil farmacocinético dos medicamentos teste nos três estudos.



Na Tabela 39, encontra-se os dados transformados do $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-t} dos medicamentos teste e referência, além do erro médio quadrático e da quantidade de participantes de pesquisa por sequência dos estudos independentes. Pode-se verificar que os valores de $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-t} são bem semelhantes entre todos os estudos e medicamentos.

Tabela 39 – Inclusão dos dados para realização da metanálises.

ESTUDO	1		2		3	
PARÂMETROS	$C_{m\acute{a}x}$	ASC_{0-t}	$C_{m\acute{a}x}$	ASC_{0-t}	$C_{m\acute{a}x}$	ASC_{0-t}
Média Transformada do Medicamento Referência - (ln)	7.49704	8.80268	7.22624	8.44654	7.04296	8.36340
Média Transformada do Medicamento Teste - (ln)	7.48420	8.79498	7.20476	8.45936	7.07035	8.33618
Erro médio quadrático	0.04004	0.01899	0.01502	0.01701	0.04030	0.03479
Número de Voluntário da sequência RT	26		13		13	
Número de Voluntário da sequência TR	27		13		13	

Encontramos um valor de P para o $C_{\text{máx}}$ de 0.1434 e de 0.1200 para ASC (Tabela 40), todos superiores a 0.05, comprovando que o medicamento referência é estatisticamente semelhante entre os três estudos e podemos dar prosseguimento a metanálise.

Tabela 40 – Teste de homogeneidade dos medicamentos referência.

PARÂMETROS	$C_{\text{máx}}$	ASC _{0-t}
Número de estudos	3	
$\bar{W}$	34.99371069	
Grand Mean "R"	7.318	8.606
χ^2_R	3.883994	4.240765
P- valor	0.1434	0.1200
$\bar{d}$	-0.005012061	-0.007449813
σ_e^2	0.034035712	0.022341658
$Var(\bar{d})$	0.000324208	0.000212816

A metanálise foi realizada e obteve-se o resultado mostrado na Tabela 41 e nas Figura 38 e 39.

O intervalo de confiança (90%) para o $C_{\text{máx}}$ e ASC ficou dentro do estabelecido pela ANVISA para os três medicamentos teste e suas combinações, ou seja, podemos confirmar, a partir da metanálise realizada, que os medicamentos analisados são bioequivalentes.

Neste caso, podemos sugerir que os medicamentos são intercambiáveis, portanto, podem ser trocados sem impacto na eficácia terapêutica do medicamento.

Tabela 41 – Comparação do intervalo de confiança (90%) entre os medicamentos teste.

PARÂMETROS	INTERVALO DE CONFIANÇA			
	$C_{\text{máx}}$		ASC _{0-t}	
Combinação	96.6	102.5	96.9	101.7
Teste 1 versus Teste 2	90.9	111.9	90.1	106.6
Teste 1 versus Teste 3	86.6	106.6	93.8	110.9
Teste 2 versus Teste 3	84.4	107.4	94.4	114.7

Figura 25 – Gráfico do Intervalo de confiança (90%) dos medicamentos teste para o $C_{m\acute{a}x}$.

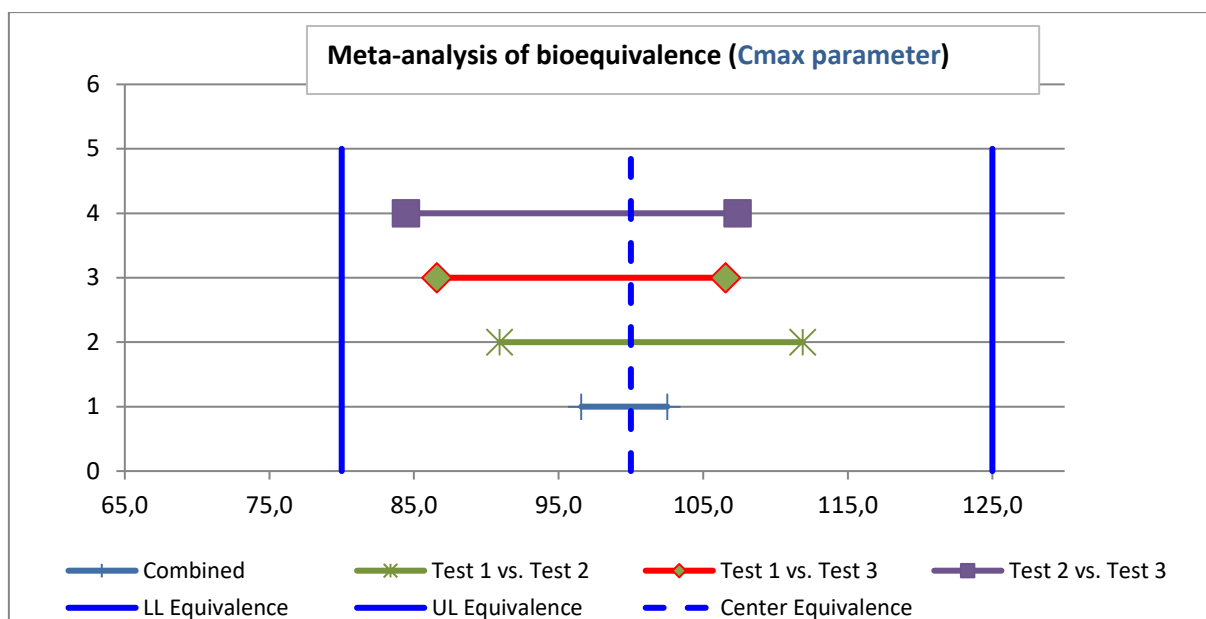
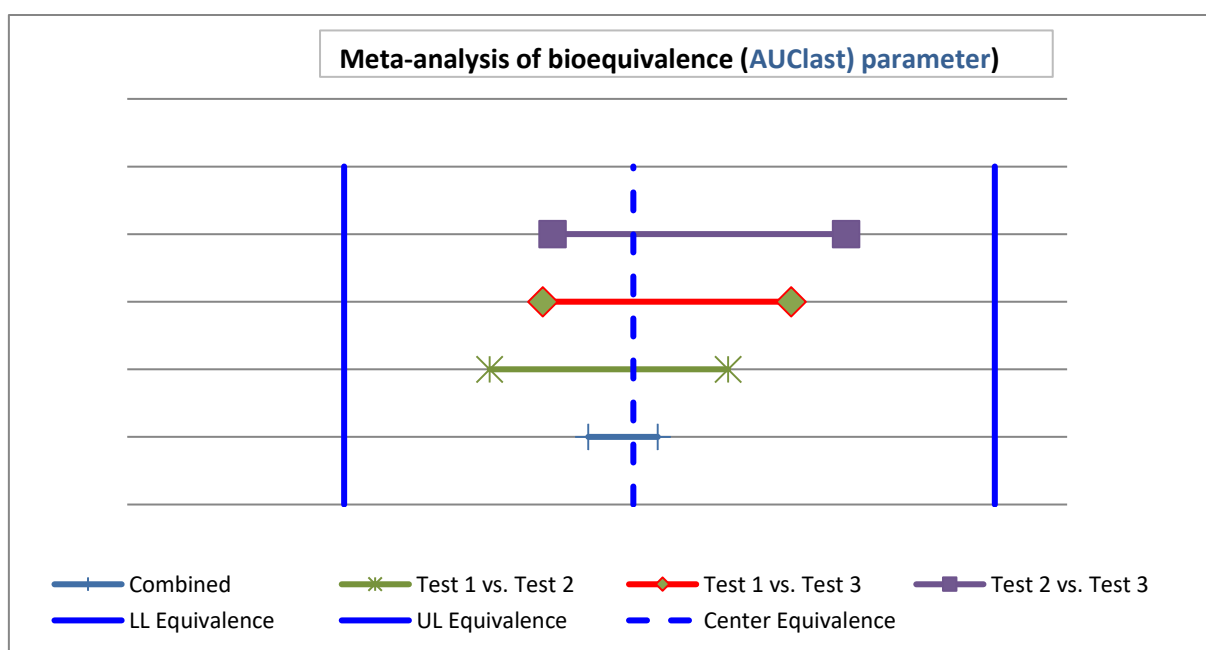


Figura 26 – Gráfico do Intervalo de confiança (90%) dos medicamentos teste para $aASC_{0-t}$.



6.4.4. SULFAMETOXAZOL + TRIMETOPRIMA

Foram analisados dois estudos com a associação de sulfametoxazol/trimetoprima 400/80 mg, nos quais o medicamento referência utilizado foi o Bactrim[®] da Roche e a forma farmacêutica sendo o comprimido. Os estudos foram realizados com participantes de pesquisa masculinos saudáveis e tiveram o mesmo cronograma de coleta. Ambos os estudos foram conduzidos com 26 participantes de pesquisa e tiveram o seguinte cronograma de coleta: 0.00;

0.50; 1.00; 1.50; 1.75; 2.00; 2.50; 3.00; 3.50; 3.75; 4.00; 4.50; 6.00; 8.00; 12.00; 24.00; 36.00 e 48.00 horas

Nas Figura 27 e Figura 28 pode-se observar que o medicamento referência apresentou o seu perfil de absorção e eliminação visualmente semelhantes entre estudos independentes, principalmente para o fármaco trimetoprima.

Figura 27 – Perfil farmacocinético do fármaco sulfametoxazol do medicamento referência no estudo 01 e 02.

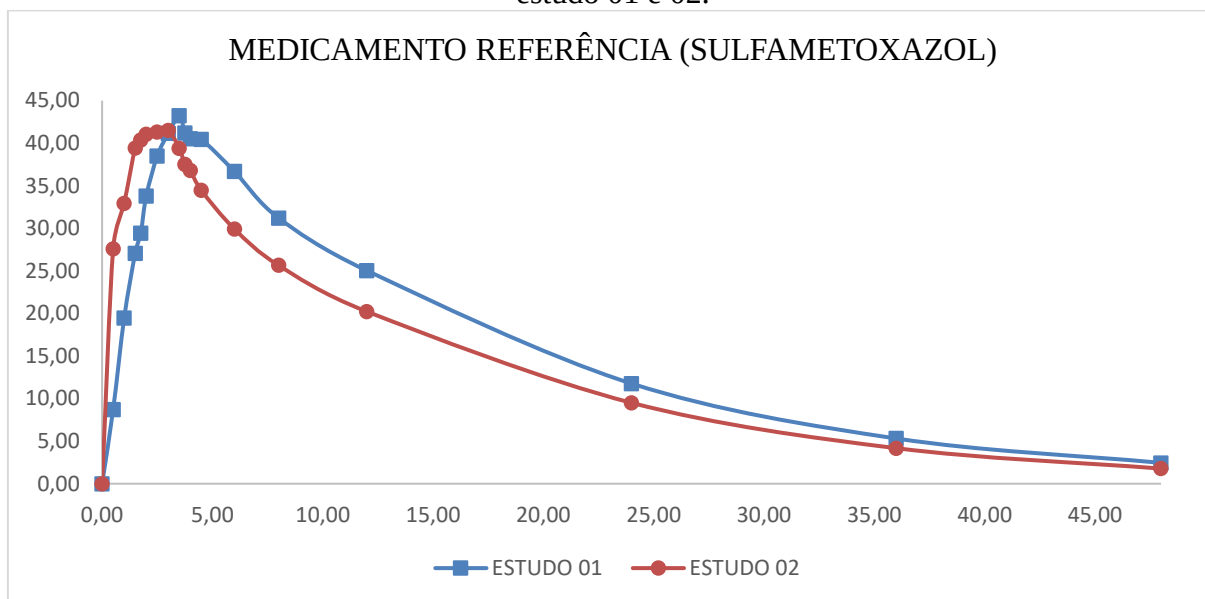
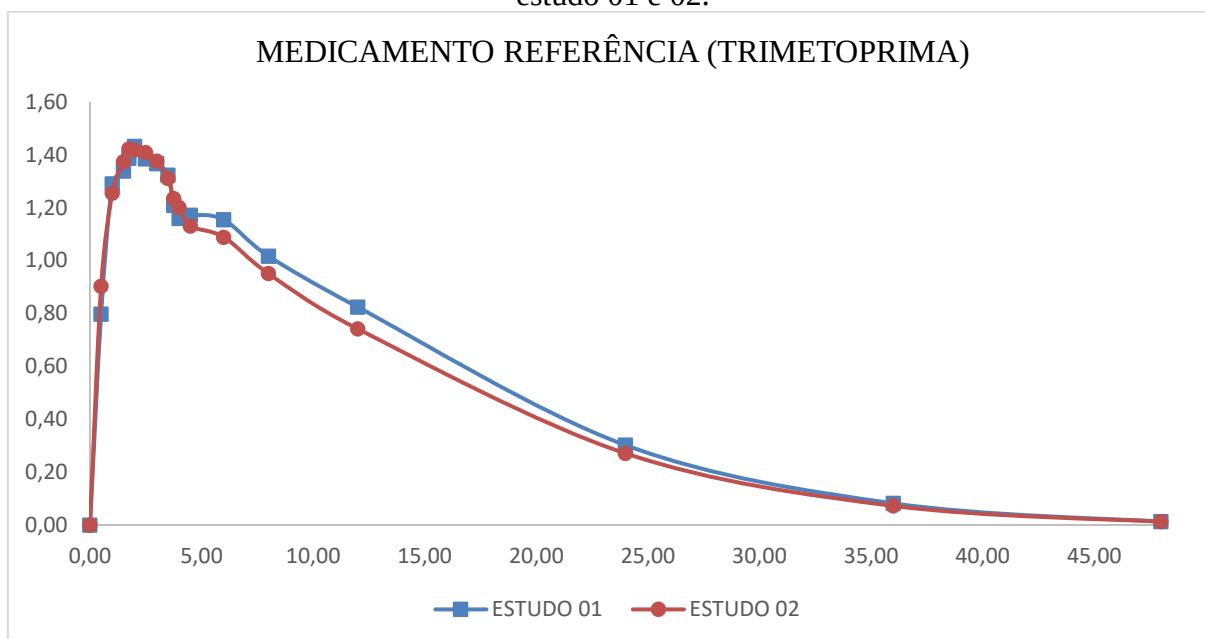


Figura 28 – Perfil farmacocinético do fármaco trimetoprima do medicamento referência no estudo 01 e 02.



Já nas Figura 29 e 30 pode-se observar o gráfico mostrando uma semelhança muito grande nos perfis farmacocinéticos dos medicamentos teste, neste caso, medicamentos diferentes (teste 1 e teste 2), de fabricantes diferentes e em estudos independentes.

Figura 29 – Perfil farmacocinético do medicamento de teste no estudo 01 e 02.

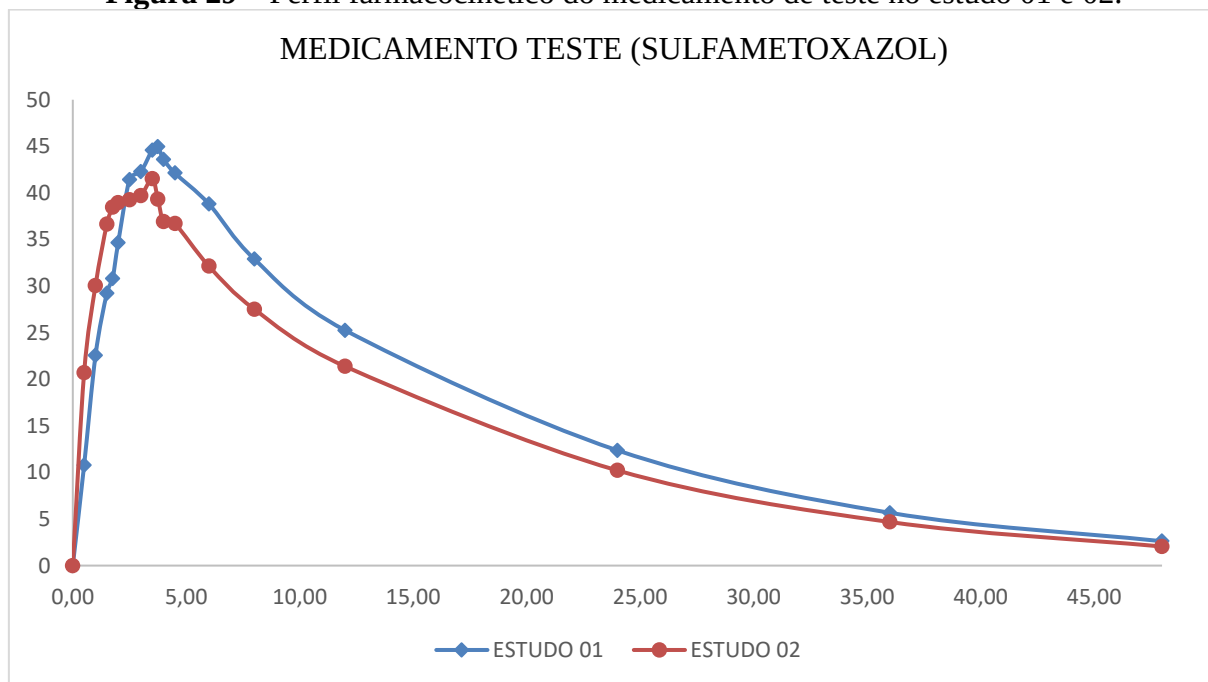
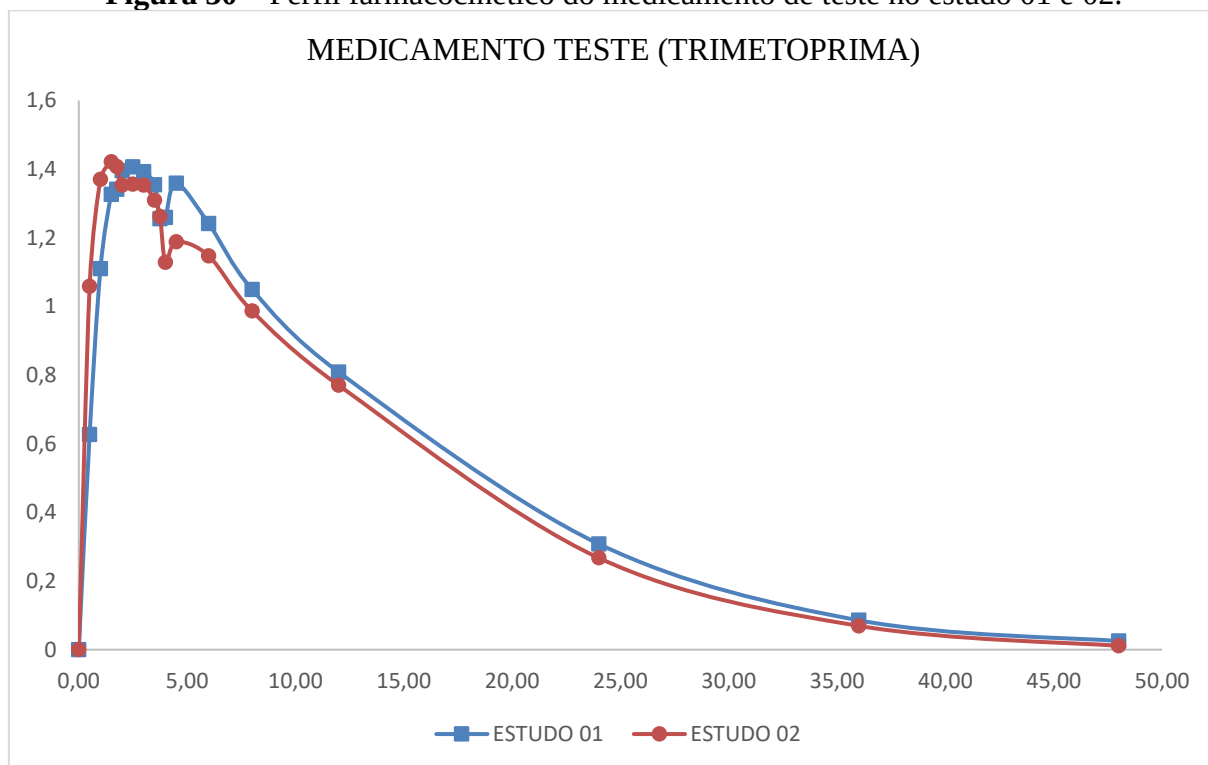


Figura 30 – Perfil farmacocinético do medicamento de teste no estudo 01 e 02.



Os dados transformados do $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-t} dos medicamentos teste e refer\encia, s\ao observados para o f\armaco sulfametoxazol na Tabela 42.

Tabela 42 – Dados transformados do $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-t} , erro m\edio e quantidade de participantes de pesquisa por sequ\encia para o sulfametoxazol.

ESTUDO	1		2	
PAR\AMETROS	$C_{m\acute{a}x}$	ASC_{0-t}	$C_{m\acute{a}x}$	ASC_{0-t}
M\edia Transformada do Medicamento Refer\encia - (ln)	3.8513	6.5972	3.8588	6.4691
M\edia Transformada do Medicamento Teste - (ln)	3.8967	6.6407	3.8309	6.4718
Erro m\edio quadr\atico	0.0083	0.0047	0.0156	0.02688
N\umero de Volunt\ario da sequ\encia RT	13		13	
N\umero de Volunt\ario da sequ\encia TR	13		13	

J\aa os dados transformados do $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-t} dos medicamentos teste e refer\encia, para o f\armaco trimetoprima s\ao observados na Tabela 43.

Tabela 43 – Dados transformados do $C_{m\acute{a}x}$ e ASC_{0-t} , erro m\edio e quantidade de participantes de pesquisa por sequ\encia para o trimetoprima.

ESTUDO	1		2	
PAR\AMETROS	$C_{m\acute{a}x}$	ASC_{0-t}	$C_{m\acute{a}x}$	ASC_{0-t}
M\edia Transformada do Medicamento Refer\encia - (ln)	0.5006	3.0576	0.4910	2.9959
M\edia Transformada do Medicamento Teste - (ln)	0.4785	3.0726	0.5044	3.0138
Erro m\edio quadr\atico	0.0382	0.0222	0.0214	0.0331
N\umero de Volunt\ario da sequ\encia RT	13		13	
N\umero de Volunt\ario da sequ\encia TR	13		13	

Neste caso foram realizados testes de homogeneidades para o f\armaco sulfametoxazol e o para a trimetoprima. Ap\os a realiza\cao do teste do χ^2 (qui-quadrado) para o f\armaco sulfametoxazol encontrou-se um valor de P para o $C_{m\acute{a}x}$ de 0.9783 e de 0.6443 para ASC_{0-t} (Tabela 44). Para o f\armaco trimetoprima encontramos um valor de P para o $C_{m\acute{a}x}$ de 0.9724 e de 0.8239 para ASC_{0-t} (Tabela 45). Todos os valores obtidos foram superiores a 0.05, comprovando que o $C_{m\acute{a}x}$ e a ASC do medicamento refer\encia s\ao estatisticamente semelhantes entre os dois estudos e para ambos os f\armacos.

Tabela 44 – Teste de homogeneidade dos medicamentos referência para o fármaco sulfametoxazol.

PARÂMETROS	C _{máx}	ASC _{0-t}
Número de estudos	2.0000	
$\bar{W}$	26.0000	
Grand Mean "R"	3.8551	6.5332
χ_R^2	0.0007	0.2132
P- valor	0.9783	0.6443
$\bar{d}$	0.0088	0.0231
σ_e^2	0.0120	0.0158
$Var(\bar{d})$	0.0002	0.0003

Tabela 45 – Teste de homogeneidade dos medicamentos referência para a trimetoprima.

PARÂMETROS	C _{máx}	ASC _{0-t}
Número de estudos	2.0000	
$\bar{W}$	26.0000	
Grand Mean "R"	0.4958	3.0267
χ_R^2	0.0012	0.0495
P- valor	0.9724	0.8239
$\bar{d}$	-0.0043	0.0165
σ_e^2	0.0298	0.0276
$Var(\bar{d})$	0.0006	0.0005

Após a realização da metanálise obtivemos os resultados apresentados na Tabela 46 e nas Figuras 31 e 32. Os intervalos de confiança (90%) para o C_{máx} e ASC_{0-t} ficaram entre 80 e 125% para ambos os fármacos, portanto, dentro do estabelecido pela legislação brasileira para determinação da bioequivalência, ou seja, podemos confirmar que o C_{máx} e a ASC_{0-t} do medicamento “teste 1” é equivalente ao “teste 2”.

Tabela 46 – Comparação do intervalo de confiança (90%) entre os medicamentos teste em estudos independentes.

Estados independentes:				
PARÂMETROS	C _{máx}		ASC _{0-t}	
Teste 1 versus Teste 2	INTERVALO DE CONFIANÇA (SULFAMETOXAZOL)			
	100.1	115.6	95.9	113.1
	INTERVALO DE CONFIANÇA (TRIMETOPRIMA)			
	86.1	108.1	89.4	111.2

Figura 31 – Gráfico do Intervalo de confiança (90%) dos medicamentos teste para o $C_{\text{máx}}$ e ASC_{0-t} do fármaco sulfametoxazol.

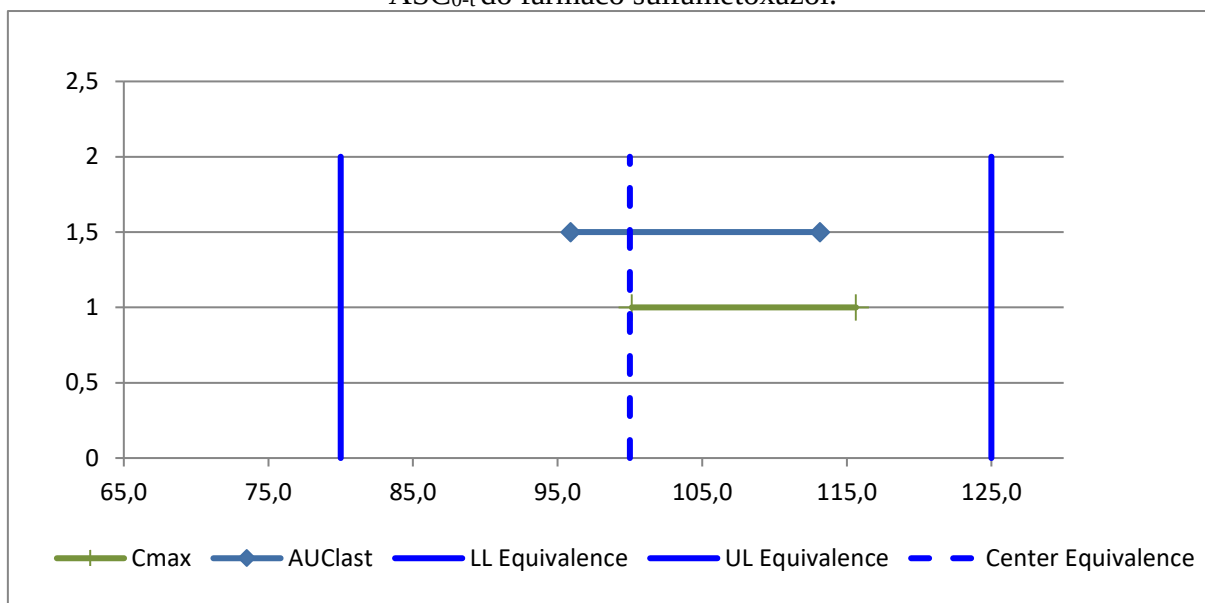
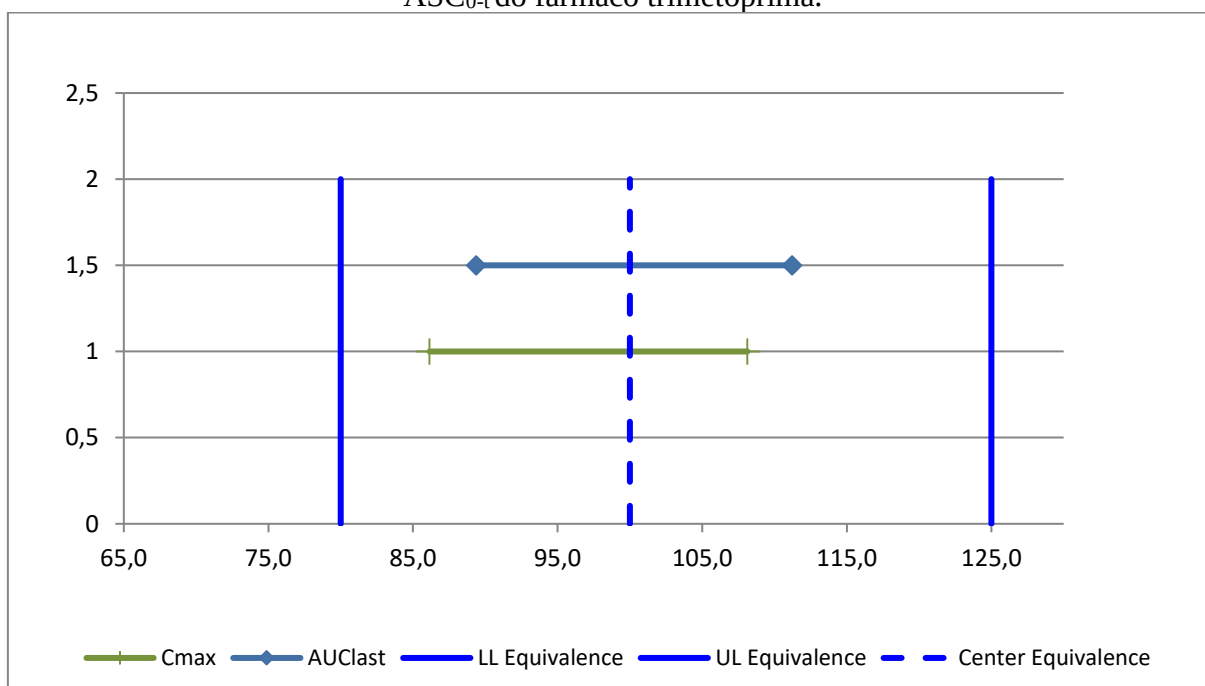


Figura 32 – Gráfico do intervalo de confiança (90%) dos medicamentos teste para o $C_{\text{máx}}$ e ASC_{0-t} do fármaco trimetoprima.



7. CONCLUSÃO

O gênero dos participantes de pesquisa influenciou no resultado dos estudos, mas de forma diferente para cada fármaco, portanto, não podemos generalizar e precisamos estudar de forma específica cada caso, de acordo com as características físico-químicas e farmacocinéticas do medicamento. Todavia, a realização de estudos com apenas um gênero, conforme propõe a resolução mexicana, pode ser utilizado como medida efetiva para redução do coeficiente de variação e consequentemente a quantidade necessária de participantes de pesquisa para realização dos estudos.

A redução do cronograma de coleta impactou nos parâmetros farmacocinéticos e resultados dos estudos, todavia, essa alteração foi mais significativa quando os medicamentos apresentavam tempos menores de meia vida plasmática. De modo geral, o cronograma com uma quantidade maior de pontos traz dados mais reais do perfil farmacocinético do medicamento, além de reduzir o coeficiente de variação e estreitar o intervalo de confiança, embora de forma discreta. Portanto, embora o aumento da quantidade de pontos de coleta eleve o valor do estudo, traz inúmeros benefícios e evita a obtenção de falsos resultados.

A utilização da massa corporal como parâmetro para seleção de participantes de pesquisa se mostrou mais eficiente que o índice da massa corpórea na redução do coeficiente de variação do medicamento. A redução ocorreu em ambos os coeficientes, intraindividual e interindividual, todavia, esta redução foi mais significativa no CV interindividual.

O método de metanálise utilizado se mostrou bastante eficaz para verificar a bioequivalência de medicamentos teste em estudos independentes, embora tenha apresentado algumas limitações quando o medicamento referência se mostra estatisticamente diferente entre estes estudos. Dos cinco fármacos analisados, um não apresentou medicamento referência homogêneo (metildopa), um não foi considerado bioequivalente (fluconazol), os demais foram considerados bioequivalentes.

As análises realizadas envolvendo diferentes estudos de bioequivalência mostraram a complexidade de fatores que podem influenciar nos seus resultados, e pequenas alterações podem gerar resultados falsos negativos como também falsos positivos. Para elaboração adequada de um protocolo clínico de estudo bioequivalência é necessário a atuação de um profissional experiente, com amplo conhecimento estatístico, farmacocinético, além de conhecimento da legislação sanitária e ética vigente.

Os resultados da metanálise mostram ainda, que mesmo dois medicamentos sendo considerados genéricos para um mesmo medicamento de referência, em estudos independentes, podem estes não apresentar bioequivalência entre eles, portanto, é necessário que os usuários, farmacêuticos e prescritores, atentem para a melhor forma de intercambialidade entre genéricos de diferentes fabricantes, procurando conhecer o histórico de cada paciente sob tratamento, e sobretudo quando tratar-se daquelas patologias crônicas que via de regra, utilizam medicamentos de alta variabilidade farmacológica e/ou índice terapêutico estreito.

8. PERSPECTIVAS

Estudar de forma mais aprofundada as causas dos comportamentos anômalos dos parâmetros farmacocinéticos de alguns medicamentos quando administrados em gêneros diferentes.

Propor a implantação, pela ANVISA, de ferramentas que possam ser utilizadas por pacientes e órgão públicos, em processos licitatórios, para garantir que medicamentos genéricos e similares de fabricantes diferentes sejam com total segurança intercambiáveis não só com o medicamento referência, mas entre si também.

Ampliar a realização da metanálise para uma quantidade maior de medicamentos e fornecer os resultados as agências reguladoras e usuários dos medicamentos para que possam saber quais os genéricos/similares apresentam bioequivalência e podem ser substituídos sem que haja potencial alteração no resultado terapêutico e reações adversas.

Verificar a existência de processos de fabricação e/ou excipientes que possam apresentar comportamento diferenciados para cada sexo.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. R. P. **Estudos de Farmacocinética Comparada em Voluntários Sadios**. 2003. 154 p. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2003.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Pharmaceutical Dosage forms and drug delivery systems**. 6.ed. Malvern: Williams & Williams, 1995.

BAUER, L. A. Applied clinical pharmacokinetics. McGraw Hill, 2001. **Biopharmaceutical Statistics**, 9, 485–497.

BOLAÑOS, R. **Drogas de alta variabilidade farmacocinética e bioequivalência. Administração Nacional de Medicamentos e Tecnologia Médica (ANMAT)**, Buenos Aires, Argentina, 2004.

BRASIL. **CONSULTA PÚBLICA Nº 1**, de 16 de janeiro de 2014. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, Brasília, 16 jan. 2014c.

BRASIL. Lei 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 fev. 1999.

BRASIL. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade/ Bioequivalência**. Volume I. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2002.

BRASIL. **On-line. Bulário Eletrônico**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www4.Anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B26322-1-0%5D.PDF>. Acessado em 19 jan. 2015b.

BRASIL. **On-line. Dados sobre medicamentos genéricos, AIDS e patente de medicamentos**. Disponível em: <http://www.medicamentogenerico.org.br/template>. Acessado em 19 dez. 2015a.

BRASIL. RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Dispõe sobre os requisitos para a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo, a serem atendidos pelos centros de equivalência farmacêutica e patrocinador do estudo**”. Diário Oficial da União, Brasília, 31 ago. 2010.

BRASIL. RE nº 896, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos**”. Diário Oficial da União, Brasília, 07 nov. 2003e.

BRASIL. Resolução RDC nº 16, de 03 de março de 2007. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Regulamento técnico para medicamentos genéricos**”. Diário Oficial da União, Brasília, 05 mar. 2007.

BRASIL. Resolução RDC nº 17, de 03 de março de 2007. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Regulamento técnico para medicamentos similares**”. Diário Oficial da União, Brasília, 05 mar. 2007.

BRASIL. Resolução RDC nº 133, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Regulamento Técnico para medicamento similar**”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003b.

BRASIL. Resolução RDC nº 135, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Regulamento Técnico para medicamentos genéricos**”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003a.

BRASIL. Resolução RDC nº 27, de 27 de maio de 2012. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária “dispõe sobre validação de métodos bioanalíticos”. Diário Oficial da União, Brasília, 27 maio 2012a.

BRASIL. Resolução RDC nº 47, de 28 de março de 2001. ANVISA - A Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001.

BRASIL. Resolução RDC nº 58, de 10 de outubro de 2014. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Dispõe sobre as medidas a serem adotadas junto à Anvisa pelos titulares de registro de medicamentos para a intercambialidade de medicamentos similares com o medicamento de referência.**”. Diário Oficial da União, Brasília, 10 out. 2014a.

BRASIL. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003c.

BRASIL. Resolução RE nº 1170, de 19 de abril de 2006. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos**”. Diário Oficial da União, Brasília, 24 abril. 2006.

BRASIL. Resolução RE nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Conselho Nacional de Saúde aprova “As diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos”. Diário Oficial da União, Brasília, 12 dez. 2012b.

BRASIL. Resolução RE nº 56, de 08 de outubro de 2014. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Dispõe sobre a Certificação de Boas Práticas para a realização de estudos de Biodisponibilidade/Bioequivalência de medicamentos e dá outras providências**”. Diário Oficial da União, Brasília, 08 out. 2014d.

BRASIL. Resolução RE nº 60, de 10 de outubro de 2014. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Dispõe sobre os critérios para a concessão renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências**”. Diário Oficial da União, Brasília, 10 out. 2014b.

BRASIL. Resolução RE nº 898, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência**”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003d.

BRASIL. Resolução RDC nº 37, de 03 de agosto de 2011. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências**”. Diário Oficial da União, Brasília, 08 ago. 2011.

BRESSOLLE, Françoise; BROMET-PETIT, Maguy; AUDRAN, Michel. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 686, n. 1, p. 3-10, 1996.

BRAGA, D. M. **Planejamento e análise de estudos de bioequivalência: comparação de delineamentos do tipo cross-over**. 2008. 117 p. Dissertação (Mestrado em estatística). Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, 2008.

CAVALCANTI, P. P. **Estudo de biodisponibilidade comparativa entre duas formulações contendo levotiroxina sódica em voluntários sadios**. 2005. 189 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará - UFC, Recife, 2005.

CAMPOS, D. R. **Avaliação in vitro - in vivo de duas formulações de pantoprazol: estudos farmacocinéticos e perfis de dissolução**. 2011. 177 p. Tese (Doutorado) - Unicamp, São Carlos, 2008.

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

CHEN, Mei-Ling et al. Bioavailability and bioequivalence: an FDA regulatory overview. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 12, p. 1645-1650, 2001.

CHOW, Shein-Chung; LIU, Jen-pei. Statistical methods for average bioavailability. **Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies**, p. 79-124, 2000.

CHOW, Shein-Chung; SHAO, Jun. Bioequivalence review for drug interchangeability. **Journal of biopharmaceutical statistics**, v. 9, n. 3, p. 485-497, 1999.

CHOW, Shein-Chung; LIU, Jen-pei. Meta-analysis for bioequivalence review. **Journal of biopharmaceutical statistics**, v. 7, n. 1, p. 97-111, 1997.

CHOW, Shein-Chung. Bioavailability and bioequivalence in drug development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 6, n. 4, p. 304-312, 2014.

Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo / Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Medicamentos genéricos. Informações para médicos, farmacêuticos e profissionais de saúde. São Paulo, 2001.

CONSIGLIERI, V. O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. **Rev. Brás. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 36, n.1, 2000.

DAVID, J. P. A. **Medicamentos Genéricos, Similares Intercambiáveis e Referência – Confuso?** Farmaceuticas.com.br. 20/02/2016. Disponível em: <<http://www.farmaceuticas.com.br/medicamentos-genericos-similares-intercambiaveis-e-referencia-confuso/>> Acessado em 15/09/2016.

DAVIT, Barbara et al. International guidelines for bioequivalence of systemically available orally administered generic drug products: a survey of similarities and differences. **The AAPS journal**, v. 15, n. 4, p. 974-990, 2013.

MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. **Biodisponibilidade e Bioequivalência**. Anvisa.gov.br. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/profissionais/artigos/ensaios.htm>> Acessado em 15/09/2016.

BEDOR, Danilo Cesar Galindo. O novo contexto da intercambialidade de medicamentos no Brasil: Medicamentos Similares e suas bases técnico-científicas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 7, 2014.

CONSIGLIERI, Vladi Olga; STORPIRTIS, Sílvia. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. **RBCF, Rev. bras. ciênc. farm.(Impr.)**, v. 36, n. 1, p. 13-21, 2000.
APA

EUNICE, K. K. **Avaliação de diferentes cronogramas de coletas de amostras biológicas em estudos de bioequivalência e análise da influência do teor de fármaco sobre os resultados destes estudos**. 2008. 278 p. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamento). Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2008.

GEORGALA, Sophia et al. Isotretinoin therapy induces DNA oxidative damage. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, v. 43, n. 11, p. 1178-1182, 2005.

GILMAN, A.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. G. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2005.

GONÇALVES, T. M. **Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para estudo farmacocinético comparativo de duas classes de fármacos (anti-retroviral e penicilínico) em indivíduos sadios**. 2005. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, 2005.

GREENBLATT, David J. Elimination half-life of drugs: value and limitations. **Annual review of medicine**, v. 36, n. 1, p. 421-427, 1985.

GUIMARÃES, E. P. **Bioequivalência de duas formulações de anlodipino em voluntários sadios**. 2005. 111 p. Dissertação (Mestrado em farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2005.

HENDRIKSEN B. A, Felix MVS, Bolger MB. The composite solubility versus pH profile and its role in intestinal absorption prediction. **AAPS PharmSci [on line]** v.5(1),1-15, 2009.

HENDRIKSEN, Barry A.; FELIX, Manuel V. Sanchez; BOLGER, Michael B. The composite solubility versus pH profile and its role in intestinal absorption prediction. **The AAPS Journal**, v. 5, n. 1, p. 35-49, 2003.

KONG, Fan Hui; GONIN, René. Optimal sampling times in bioequivalence tests. **Journal of biopharmaceutical statistics**, v. 10, n. 1, p. 31-44, 2000.

LEBLANC P. P.; et al., **Tratado de Biofarmácia e Farmacocinética**. Lisboa: Instituto Piaget, 1997.

LÖBENBERG, Raimar; AMIDON, Gordon L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 3-12, 2000.

LOPES, Renato Almeida; NEVES, Francisco de Assis Rocha. Meta-analysis for bioequivalence studies: interchangeability of generic drugs and similar containing Hydrochlorothiazide is possible but not with Enalapril Maleate. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 32, n. 2, p. 173-181, 2010.

MARZO, A. Open questions on bioequivalence: some problems and some solutions. **Pharmaceutical Research**, v.40, n.4, p.357-368, 1999.

MARZO, A.; MONTI, N.C. Acceptable and unacceptable procedures in bioavailability and bioequivalence trials. **Pharmacological Research**, v.38, n.5, 401-404, 1998.

MAZUQUELI, A. C. **Estudo de bioequivalência entre duas formulações contendo 2mg de acetato de ciproterona e 0,035mg de etinilestradiol em voluntárias sadias através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. 2008. 347 p. Dissertação (Mestrado em farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2008.

MENDES, G. D. **Planejamento e avaliação de estudos de biodisponibilidade relativa para medicamentos genéricos**. 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2005.

MIDHA, Kamal K.; RAWSON, Maureen J.; HUBBARD, John W. The role of metabolites in bioequivalence. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 8, p. 1331-1344, 2004.

MIDHA, Kamal K. et al. Conference report: Bio-International 2005. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 4, p. 747-754, 2007.

MIDHA, Kamal K.; MCKAY, Gordon. Bioequivalence; its history, practice, and future. **The AAPS journal**, v. 11, n. 4, p. 664-670, 2009.

NATION, Roger L.; SANSOM, Lloyd N. Bioequivalence requirements for generic products. **Pharmacology & therapeutics**, v. 62, n. 1-2, p. 41-55, 1994.

NGO, Suong NT. When do differences in dissolution profiles predict clinical problems?. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 32, n. 2, p. 111-112, 2007.

NISHIJIMA, Marislei et al. A competição no mercado farmacêutico brasileiro após uma década de medicamentos genéricos: uma análise de rivalidade em um mercado regulado. **Economia e Sociedade**, 2014.

NISHIOKA, Sérgio de Andrade. Regulação da pesquisa clínica no Brasil: passado, presente e futuro. **Prática Hospitalar**, v. 8, n. 48, p. 17-26, 2006a.

NISHIOKA, S. A.; SÁ, P. F. G. Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a pesquisa Clínica no Brasil. **Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 1, p. 60-62. 2006b.

OLIVEIRA, C. H. **Dosagem de concentrações plasmáticas de medicamentos através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (LC-MS/MS) e sua aplicação em estudo de bioequivalência**. 2002. 136 p. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2002.

PADILHA, P. S. **Estudos de Bioequivalência de duas formulações de Omeprazol 20mg em voluntários Sadios de Ambos os Sexos**. 2001. 146 p. Dissertação (Mestrado em farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2001.

PÁDUA, A. A. F. **Estudo de bioequivalência de duas formulações farmacêuticas (comprimidos) contendo 20 mg de lisinopril, em voluntários sadios de ambos os sexos**. 2003. 165 p. Dissertação (Mestrado em farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2003.

PATTERSON, S. D.; JONES, B. Simulation assessments of statistical aspects of bioequivalence in the pharmaceutical industry. **Pharmaceutical Statistics**, v.3, p.13-23, 2004.

PEARCE, G. A.; MCLACHLAN, A. J.; RAMZAN, I. Bioequivalence: how, why and what does it really mean? **Journal of Pharmacy Practice and Research**, v.34, n.3, p.195-200, 2004.

PINTO, Cândida Martins. Metanálise qualitativa como abordagem metodológica para pesquisas em Letras. **Atos de Pesquisa em Educação**, v. 8, n. 3, p. 1033-1048, 2013.

PIOTO, L. R. **Estudo de biodisponibilidade relativa entre duas formulações de metotrexato em plasma humano utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série**. 2006. 94 p. Dissertação (Mestrado em farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2006.

PITTA, L. R. **Estudo dos métodos estatísticos na análise da biodisponibilidade relativa/bioequivalência para o registro de medicamentos no Brasil.** 2004. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

QUENTAL C., Salles Filho S., Ensaio clínicos: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**; v. 9: p.408-24. 2006

RANG, H. P.; et al., **Farmacologia.** 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2003.

SANFELICE, A. T. D. **Biodisponibilidade comparativa de Duas formulações de ramipril em Voluntários humanos sadios após administração de dose única.** 2005. 195 p. Dissertação (Mestrado em farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2005.

SCHRAMM, S. G. **Emprego de meta análise para avaliação da intercambiabilidade entre medicamentos.** 2008. 240 p. Tese [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2008.

SCHUG B. S.; et al. Formulation dependent food effects demonstrated for nifedipine modified-release preparations marketed in the European Union. **Eur J Pharm Sci.** Apr;15(3):279-85, 2002.

SCHUIRMANN, D.J. Treatment of Bioequivalence Data: Log Transformation. In: **Proceedings of Bio-International' 89 - Issues in the Evaluation of Bioavailability Data**, Toronto, Canada, October 1-4, 159-61, 1989.

SCHWARTZ, J. B. The Influence of Sex on Pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics.** v. 42 (2), p. 1-115, 2003.

SHARGEL, L.; YU, A. B. C. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 4^a ed., satamford:Appleton & Lange, 1999.

SILVA, M. A. **Determinação de clorpropamida em plasma, empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC/MS/MS) e sua aplicação em um estudo de bioequivalência.** 2007. 218 p. Tese (Doutorado em farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2007.

SOUSA, C. E. M. **Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para quantificação de hidroclorotiazida e cimetidina em plasma humano e aplicação em estudos de farmacocinética comparada.** 2007. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, 2007.

TAMBOLI, Asif M. et al. An overview on bioequivalence: regulatory consideration for generic drug products. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 2010, 2012.

Riku J. Japan. In: Kanfer I, Shargel L, editors. Generic Drug product development, international regulatory requirements for bioequivalence. New York: Informa Healthcare; 2010. p. 164–82.

SOUZA FILHO, J. H. **Avaliação da influência dos fatores fisiológicos nos estudos de bioequivalência.** 2010. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, 2010.

SPIPKER, B. Guide to clinical trial. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.

STORPIRTIS, S. Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos. **São Paulo: sn**, p. 78, 1999.

STORPIRTIS, S. Rigor da legislação para o registro dos genéricos. In: Menda, ME. Manual médico: medicamentos genéricos. **São Paulo: Lemos Editorial**, p.66-68, 2002.

STORPIRTIS, Sílvia et al. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, n. 9-10, p. 51-56, 2004.

STORPIRTIS, Sílvia; CONSIGLIERI, Vladi Olga. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Rev. farm. bioquim. Univ. São Paulo**, v. 31, n. 2, p. 63-70, 1995.

SWEETMAN, S. Martindale: The complete drug reference. **London: Pharmaceutical Press**. Electronic version, (35 [2005]).

The Pharmaceutical Industry in Figures, The European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations - EFPIA, Key Data – 2013.

THIBOUTOT D. M.; Gollnick H. P.; Treatment considerations for inflammatory acne: clinical evidence for adapalene 0.1% in combination therapies. **Journal Drugs Dermatologic**. Sep;5(8):785-94, 2006.

UNITED STATES. Department of Healthy and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Rockville: CMC, 2000.

UNITED STATES. National Archives and Records Service. Office of the Federal Register. Code of Federal Regulations. Title 21: Food and Drug Administration. Part 320. Bioavailability and bioequivalence requeriments. Rockville: CMC, p. 186-200, 2001.

UNITED STATES. National Archives and Records Service. Office of the Federal Register. Code of Federal Regulations. Title 21: Food and Drug Administration. Subchapter D: Drugs for human use. Part 320. Bioavailability and bioequivalence requirements. 2004.

VERCAIGNE, L. M.; ZHANEL, G. G. Clinical significance of bioequivalence and interchangeability of narrow therapeutic range drugs: focus on warfarins. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.1, n.3, p.92-94, 1998.

ZAMAN, Muhammad et al. A Comprehensive Review on Bioequivalence Studies in Human Subjects. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, 2016.

ZANINI, A. C.; OLGA, S. Farmacologia Aplicada. 5.ed. **São Paulo**: Atheneu Editora, 1994.

O'ROURKE, Keith. An historical perspective on meta-analysis: dealing quantitatively with varying study results. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 100, n. 12, p. 579-582, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A –	ARTIGO 01.....	119
APÊNDICE B –	ARTIGO 02.....	141
APÊNDICE C –	MODELO DE PLANILHA DE APLICAÇÃO DE METANÁLISES	163
APÊNDICE D –	GRÁFICOS MOSTRANDO AS DIFERENÇAS ENTRE OS PERFIS FARMACOCINÉTICOS COM AS EXCLUSÃO DOS PONTOS DE COLETA.	166

APÊNDICE A – ARTIGO 01

May 21st, 2016

José Homero Souza Filho
Universidade Federal de Pernambuco (homeroufpe@gmail.com)

Manuscript Identification Number: LAJP 4757-16

Dear author:

I am glad to inform you that your article '**Pharmacokinetics and tolerability of midazolam and gender-related differences in volunteers using LC-MS/MS**' by *José H. Souza Filho; Danilo C. G. Bedor; Virna L. S. Ramos; Carlos E. M. Sousa; Leila B. Leal; Davi P. Santana* has been accepted for publication in **Latin American Journal of Pharmacy**. In due moment you will receive the page proof consigning the issue where your article will be included.

Many thanks for your interest in our journal.

Reviewer's comments:

The new version of the present manuscript has been fully revised and corrected. It is now suitable for publication.

Yours sincerely,



Prof. Néstor O. Caffini, Editor
Latin American Journal of Pharmacy
E-mail: caffini@biol.unlp.edu.ar

Pharmacokinetics and tolerability of midazolam and gender-related differences in volunteers using LC-MS/MS

José H. Souza Filho*, Danilo C. G. Bedor, Virna L. S. Ramos, Carlos E. M. Sousa, Leila B.

Leal, Davi P. Santana

Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético – NUDFAC, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brazil.

Corresponding author: José Homero de Souza Filho, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Professor Artur de Sá, s/nRecife, Pernambuco, Brazil. CEP: 50740-520. E-mail: homeroufpe@gmail.com, Tel: +558133026594/+5581998608130.

Summary

We aimed to assess gender-related differences in the pharmacokinetics of midazolam in healthy volunteers. An LC-MS/MS method was developed and validated to assay midazolam, using liquid-liquid extraction and with diazepam as internal standard (IS). Electrospray ionization and multiple reaction monitoring were used to detect midazolam ($326.01 > 291.28$) and the IS ($285.14 > 193.10$). The pharmacokinetic study was performed over a 12-hour period after single-dose oral administration of midazolam to 35 fasted volunteers (18–45 years; 17 males and 18 females). Non-compartmental pharmacokinetic analyses were performed using WinNonlin[®]. Calibration curves were linear over a range of 1.5–250 ng/mL. The assay method was precise (12.02%) and accurate (-7.43%), with a high recovery (87.81%). The incidence of adverse events was 8-fold higher in the female volunteers. No significant differences in $C_{\max}$ and AUC_{last} were observed between the males and females; however, the plasma half-life of midazolam was significantly higher in the females.

Keywords: Gender difference, LC-MS/MS, midazolam, pharmacokinetics

Introduction

Midazolam is a water-soluble benzodiazepine that is often used as an anesthetic, pre-anesthetic, or both in minor surgeries.^{1–3} Furthermore, it is used for the treatment of insomnia at an oral dose of 15 mg at bedtime, which is a safe and effective dose for elderly patients.^{4–8} Sleep is effectively achieved with midazolam at doses of 7.5 to 15 mg.⁹

The oral bioavailability of midazolam ranges from 35 to 45%⁹ and the maximum plasma concentration ($C_{\max}$) is achieved in 60 min. Midazolam is rapidly and completely absorbed after oral administration; however, it undergoes significant first-pass metabolism.¹⁰ Following the administration of a single oral 15-mg dose, a $C_{\max}$ of 70–120 ng/mL is usually achieved; however, food consumption prolongs the attainment of $C_{\max}$ by approximately 1 h and reduces the rate of absorption.¹¹

Midazolam is almost entirely eliminated by biotransformation, and less than 1% of the administered dose is recovered in the urine as the unchanged drug. Midazolam is hydroxylated by the cytochrome P450 (CYP) isoenzymes, CYP3A4 and CYP3A5, which are actively involved in its hepatic oxidative metabolism.^{11–13} In healthy young volunteers, the elimination half-life of midazolam varies from 1.5–2.5 h.¹¹ Although women show a higher CYP3A expression and activity than men do, it appears that this does not affect the pharmacokinetics of midazolam in either sex.¹²

Several biological differences exist between men and women, which can result in differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. Typically, men are larger than women are. This difference in body size results in a greater volume of distribution and a faster total clearance of most drugs in men. Furthermore, women have a greater body fat content prior to reaching an advanced age than men do, which increases the volume of distribution of lipophilic drugs in the former. Total drug absorption is apparently not significantly affected by sex, although rates of absorption may be slightly slower in women

than in men. The bioavailability of orally administered drugs, particularly substrates for CYP3A such as midazolam can be slightly higher in women than in men.^{14–17} Women secrete less gastric acid, which results in a more basic gastric environment that can potentially lead to an increased absorption of alkaline drugs in the stomach, than in men. In addition, women show slower rates of gastric emptying, which can delay the absorption of orally administered drugs.^{17–19} This delay in drug absorption persists even after menopause and is exacerbated by exogenous estrogen and progesterone. Occasionally, colonic transit time is prolonged in women, which may result in an increased absorption of weakly basic compounds from the colon as the colonic pH favors the absorption of such compounds.^{21,22}

Therefore, the objectives of this study was to assess the gender-related differences in the pharmacokinetics and tolerability of oral midazolam in healthy volunteers. In addition, a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated for the assay of midazolam in human plasma.

Subjects and methods

Study design

An open pharmacokinetic study was performed in fasted volunteers. Each subject was administered a single oral dose (15 mg tablet) of midazolam, followed by blood sample collection for up to 12 h. The study protocol (CAAE:0213.0.172.000-10) was reviewed and approved by the Research Ethics Committee at the Health Center of the Federal University of Pernambuco (UFPE), in accordance with the Helsinki Declaration²³ and its revisions. The study was approved on November 4, 2010, with number of craft as 307/2010 and registration number as 346912. Furthermore, we adhered to the guidelines for bioequivalence studies as established by the US Food and Drug Administration (FDA),²⁴ the European Agency for the

Evaluation of Medicinal Products (EMA),²⁵ and the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA)²⁶. The study was conducted at the Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Pernambuco, Recife, Brazil, and was supervised by a team of pharmacists, doctors, and nurses.

The volunteers were admitted to the hospital at 19:00 h on the night prior to the administration of midazolam, and they had a light dinner at 22:00 h. At 8:00 h the next morning, following a 10-h fasting period, each volunteer was administered a 15-mg coated midazolam tablet with 200 mL of water. The meals given to the volunteers were designed by a nutritionist, well balanced, and consisted of a similar fat, carbohydrate, and protein contents for all the participants. Additional water and food were only allowed at 2 and 4 h, respectively, after drug administration. During the study period, food was strictly controlled, and the volunteers received standardized meals to minimize the effect of food on the study results. The consumption of alcohol, coffee, and drinks containing xanthines was forbidden 3 days before, and during the entire study.

Study population

Thirty-five healthy Brazilian volunteers (17 male and 18 female) aged 18–45 years and having body mass index (BMI) of 19–29 kg/m² were recruited for the study. The purpose and procedures of the study were explained to the participants in detail before the study. Participants were supplied with written information on the study objectives, methods, possible risks, and details of the honorarium paid to them. All subjects provided their written, informed consents before participating in the study.

Inclusion and exclusion criteria

Healthy Brazilian adults, who were non-smokers, were recruited from the metropolitan region of Recife, Pernambuco. Volunteers were excluded from the study for any of the following reasons: hepatic, renal, cardiac, gastrointestinal, or psychiatric disorders; history of any drug or food allergy; history of any drug use 1 week before the study commenced; history of alcohol or drug abuse; pregnant or breastfeeding; or donated blood in the 3 months prior to the study. In addition to the standard tests performed on all participants, pregnancy tests were conducted for the women before and after the study, and at each time of admission to the hospital for the study.

Collection of plasma samples

The blood samples (approximately 7.5 mL) were collected from catheters (Jelco, Critikon, Tampa Bay, FL, USA) inserted into the antecubital vein of the forearm, before and at 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 12 h after administration of midazolam. A total of 15 blood samples were obtained from each volunteer for each part of the study. The catheters were flushed with 1 mL heparinized saline solution (10 IU/mL) after

each blood sample was collected. The blood samples were transferred into tubes coated with ethylenediaminetetraacetic acid tripotassium salt (EDTA-k3, Vacutainer, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) and immediately centrifuged at 3000 *g* for 10 min to obtain plasma. Plasma was subsequently transferred into Cryo vials (Sarstedt AG & Co, Lower Saxony, Germany) using disposable polypropylene tips, and then stored in a freezer at -70°C until analysis.

Sample preparation

Diazepam was used as the internal standard (IS) for the analyses. The diazepam (batch 1044 of the Brazilian Pharmacopoeia) and midazolam (batch 2.1 of the European Pharmacopoeia) used were reference standards. Stock solutions of midazolam (1 mg/mL) and the IS (1 mg/mL) were prepared using methanol as solvent. The working solutions of midazolam were prepared in human plasma at concentrations of 1.5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, and 250 ng/mL. The IS was used at a concentration of 0.5 µg/mL. The quality control (QC) samples were also prepared in plasma at concentrations of 4, 100, and 200 ng/mL, representing low (LQC), medium (MQC), and high (HQC) quality control concentrations, respectively.

The plasma samples were prepared by adding 250 µL of human plasma to 20 µL of the IS solution in an Eppendorf tube (Eppendorf tubes®, Hamburg, Germany), followed by mixing for 30 s using a micromixer (FINEPCR, Gyeonggi-do, Korea). A 150-µL aliquot of 0.5 M sodium hydroxide solution was added to the mixture, followed by mixing again for 30 s. Next, 1000 µL of an n-hexane/chloroform (70:30, v/v) solution was added with further mixing for 120 s. The tubes were then centrifuged at 3000 *g* for 5 min at 4°C and cooled at -70°C for 15 min. The organic portion of the mixture was transferred to a glass tube and dried at 40°C with compressed air. The dried sample was reconstituted with 200 µL of a mixture of 10 mM

ammonium acetate and methanol (50:50), homogenized for 10 s, and transferred to inserts, which were placed in an equipment rack.

Chromatographic conditions

The quantification of midazolam in plasma was performed using LC-MS/MS. All the solvents used were of HPLC grade and the chemicals and reagents were of analytical grade.

The HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) comprised of two pumps (LC-10 ADvp), a degasser (DGU 10Avp), a refrigerated autosampler (SIL 10 ADvp), and a controller module (SCL 10 ADvp). The HPLC system was coupled to a mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Micromass/MassLynx software version 4.1 was used to control the system and acquire the data. The chromatographic separation was performed using a C18, 50 × 2.0 mm, 3.5-μm SunFire column (Waters, Ireland) and a C18, 4 × 2.0 mm pre-column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of 10 mM ammonium acetate/methanol (30:70 v/v) and the flow rate was set at 0.30 mL/min. The samples were kept at a temperature of 4°C, and a 30-μL aliquot was injected for the analysis. The total run time was 3.00 min and the retention times for midazolam and diazepam were 1.72 min and 1.91 min, respectively.

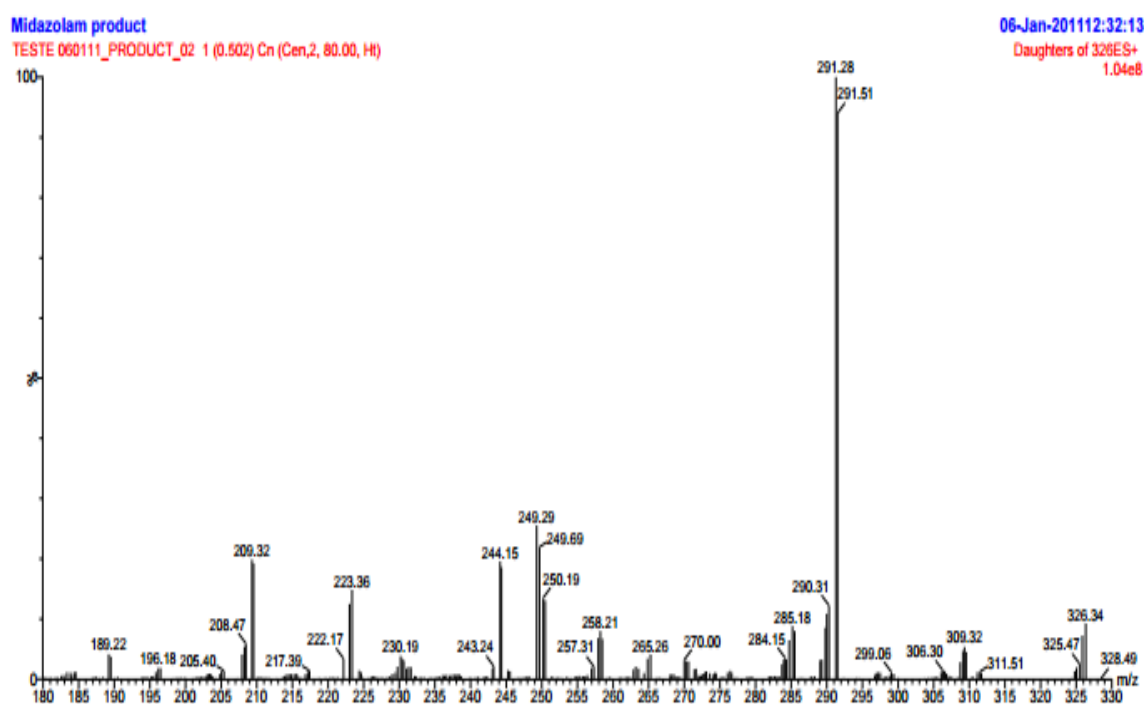
Conditions for mass spectrometric detection

The mass spectrometric parameters were optimized to obtain maximum sensitivity at unit resolution. Source temperature was optimized at 150°C, desolvation temperature was 300°C, and desolvation gas flow rate was 435 L/h. The capillary voltage was set at 2 kV, while the optimized cone voltage value was 70 V for both midazolam and the IS. The optimized collision

energy for both midazolam and the IS was 30 V. Argon was used as the collision gas at a pressure of 1.88×10^{-3} psi in the collision cell with the multiplier set at 700 V.

Infusion experiments for multiple reaction monitoring (MRM) optimizations and ion suppression studies were performed with a Harvard Apparatus 11 elite syringe pump (Holliston, MA, USA), at a flow rate of 30 μ L/min. An MRM method was prepared including the most intense transitions for midazolam and the IS. Figure 1 shows the positive ion electrospray mass spectrum of midazolam, with the precursor and product ion (m/z 326.01 > 291.28) and the mass transition monitored in MRM mode. The spectrum also showed a fragment of midazolam at m/z 249.29 but its intensity was less than that of the diagnostic fragment (m/z 291.28). After performing a full scan monitoring, no fragmentation at the ionization source was observed.

Figure 1



Method validation

Specificity was evaluated using plasma samples, including lipemic and hemolyzed plasma, from six laboratory staff volunteers. Recovery (REC) was determined at the three QC concentration levels (LQC, MQC, and HQC). Two batches of midazolam samples were prepared. The first batch was prepared in acetonitrile:water (1:1 v/v) (A) and second batch was prepared in plasma (B). The average peak area responses ($n = 6$) were used to calculate REC. The calculations were done as follows: $\text{REC (\%)} = (B/A) \times 100$, where A and B are the concentrations of midazolam in the prepared samples mentioned above. For the precision (relative standard deviation, RSD) and accuracy (relative error, RE) determinations, five replicates each of the LQC, MQC, and HQC samples were prepared and analyzed on the same day (intra-day assay) and also on three consecutive days (inter-day assay). Linearity was evaluated using three different calibration curves, for which the coefficients of determination (R^2) were calculated. The validation was performed in accordance with the standards established by the appropriate Brazilian legislations.²⁷

Additionally, the stabilities of the solutions and plasma samples were evaluated. Midazolam stock solutions and midazolam in human plasma samples were analyzed at two QC levels (LQC and HQC), after storage at room temperature (21–23°C) for 17 h and at 4°C for 16 days. Extracted samples (midazolam extracted from spiked plasma) were kept in the autosampler at 4°C. Non-extracted samples (spiked plasma) were kept at room temperature (21–23°C) (short-term), as well at -70°C (long-term) followed by three freeze-thaw cycles (24 h for each cycle). The concentrations of midazolam in the samples described above (actual concentration) were compared to those in the freshly prepared samples (nominal

concentrations) at the respective QC levels. The temperatures and storage periods were chosen based on relevant clinical laboratory conditions and pharmacokinetic study designs.

Evaluation of tolerability

The tolerability of midazolam in the volunteers was assessed by verification of adverse events (AEs), performance of laboratory tests, and measurement of vital signs. All AEs were regularly monitored and recorded, including the start and resolution times, duration, and intensity of any symptoms as well as their relationship to the study drug. Blood and urine tests, physical examination, and electrocardiography (ECG) were also performed, and the volunteers were monitored throughout the study by the medical team.

Pharmacokinetic parameters and statistical analyses

The following pharmacokinetic parameters were calculated using a non-compartmental analysis (NCA): area under the concentration-time curve from 0 h to the last measurable time point (AUC_{last}), AUC from 0 h to infinity ($AUC_{0-\infty}$), maximum plasma drug concentration (C_{max}), and time to achieve C_{max} (T_{max}). The C_{max} and T_{max} were obtained directly from the plasma concentration-time curve after a single 15 mg dose of midazolam was administered. The AUC_{last} and $AUC_{0-\infty}$ were calculated using the linear trapezoidal rule and the following equation: $AUC_{0-\infty} = AUC_{last} + C_t/\lambda_z$, where C_t is the last measured concentration, and λ_z is the slope of the linear regression of the log-transformed concentration-time curve.²⁸ The pharmacokinetic parameters were calculated using WinNonlin[®] Professional software version 5.0 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). Analysis of variance (ANOVA) was used to identify differences between the groups, using Excel 2016 software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Results and discussion

Characteristics of the volunteers

The characteristics of the volunteers are listed in Table 1. The results of the physical and clinical examinations of all volunteers during the pre- and post-study visits were normal. Initially, there were 36 volunteers; however, one male volunteer withdrew from the study before it began but he was not replaced.

Table 1

Variable	Male				Female			
	Mean	SD	Range		Mean	SD	Range	
Age (year)	22.00	5.63	18	41	20.88	2.34	19	27
Weight (kg)	68.82	8.15	52	52	56.04	7.63	45	73
Height (m)	1.72	0.04	1.61	1.61	1.63	0.07	1.55	1.83
BMI (kg/m ²)	23.20	2.57	20.06	28.39	21.04	2.36	17.79	25.26

BMI = Body mass index, SD = Standard deviation

LC-MS/MS method validation

The method demonstrated excellent specificity, without any interferences by endogenous compounds or metabolites on the retention times for midazolam and the IS. The cross-talk test showed no interference between the MRM channels of midazolam and the IS, and the carryover test showed no interference between the samples in an analytical sequence.

The weighted least squares (WLS) regression model was used to obtain linearity over one order of magnitude, 1.5–250 ng/mL (1/x), a mean R^2 value of 0.9991 ($n = 3$ analytical runs), and accuracy of 96.42–104.40% as shown in Table 2. The lower limit of quantification (LLOQ) of midazolam was obtained as 1.5 ng/mL. The mean REC of midazolam from plasma was $87.94\% \pm 9.13\%$ and that of the IS was $97.28\% \pm 5.00\%$.

Chromatograms of extracted human plasma containing a low concentration (1.5 ng/mL) of midazolam and IS indicated a good detector response for both compounds. The signal to noise ratio was 60 for midazolam and 820 for the IS.

The intra- and inter-day precision and accuracy of the assay method at the LQC, MQC, and HQC levels (Table 2) enabled satisfactory results to be obtained, with RSD < 4.83% and

RE < 4.40%. The data obtained for midazolam were within the acceptable limits stated in the guidelines for bioanalytical methods.²⁷

Table 2

Midazolam concentration spiked into plasma (ng/mL)	Determined concentration (ng/mL) (Mean ± SD)	Precision (% RSD)	Accuracy (% RE)
1.5	1.550 ± 0.008	0.48	3.36
10	9.733 ± 0.141	1.45	-2.67
25	25.657 ± 0.463	1.80	2.63
50	49.372 ± 1.243	2.52	-1.26
100	98.691 ± 2.474	2.51	-1.31
150	147.670 ± 2.081	1.41	-1.55
200	192.831 ± 9.317	4.83	-3.58
250	260.996 ± 6.121	2.35	4.40

SD = Standard deviation

Stability studies

The data from the stability studies indicated that, the concentration of midazolam in plasma under different temperatures, storage times, and freeze-thaw cycle conditions did not change significantly over the course of the study. This showed that the temperature and storage conditions studied were appropriate for the pharmacokinetic study design. The stock midazolam solution was found to be stable at room temperature for 17 h and at refrigerated

temperature (4°C) for 16 days. Both analytes were stable in human plasma for at least 8 h at room temperature (bench top) and for at least 29 h in the autosampler (4°C). The analytes were also stable for a minimum of three freeze-thaw cycles. The spiked plasma samples stored at -70°C for the long-term stability experiment were stable for a minimum of 80 days.

The developed LC-MS/MS method exhibited good linearity, specificity, sensitivity, precision, and accuracy for all the analyzed samples. The data for the validation parameters are shown in Tables 2 and 3. The method was linear over a concentration range of 1.5–250 ng/mL.

Table 3

Concentration (ng/mL)	RSD (%)		RE (%)		Recovery (%)
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	
4.0	5.42	4.65	-7.43	-7.63	94.03 ± 7.49
100	3.92	3.30	-3.3	-3.30	92.35 ± 2.10
200	4.96	3.00	-2.12	-2.12	77.45 ± 3.70

Tolerability

All the subjects slept within 45 min of midazolam administration. No serious or unexpected AEs were observed; however, nine volunteers presented minor AEs during the study period. All the AEs presented (shown in Table 4) were likely due to the study drug. This is an indication that women are more likely to experience adverse events from midazolam administration.

There were no significant differences in the $C_{\max}$ and AUC values between the two groups. Therefore, the higher number of AEs observed in the women may be attributable to their higher sensitivity to the effects of midazolam. As a result, more caution is required in the administration of midazolam to women, and dose adjustments should be made where necessary.

Table 4

AEs	Males	Females
Headache	0	4
Coryza	0	1
Hypertension	1	1
Skin rash	0	1
Tachypnea	0	1
Total	1 (12%)	8 (88%)

AEs = Adverse events.

Pharmacokinetic data and statistical analyses

The pharmacokinetic parameters for midazolam and the statistical data are shown in Table 5. The plasma midazolam concentration-time profiles from the volunteers are shown in Figure 2. Using ANOVA and a 95% confidence interval (95% CI), we observed that the differences in the $C_{\max}$, AUC_{last} , $AUC_{0-\infty}$, and $T_{\max}$ values in the male and female volunteers were not statistically significant.

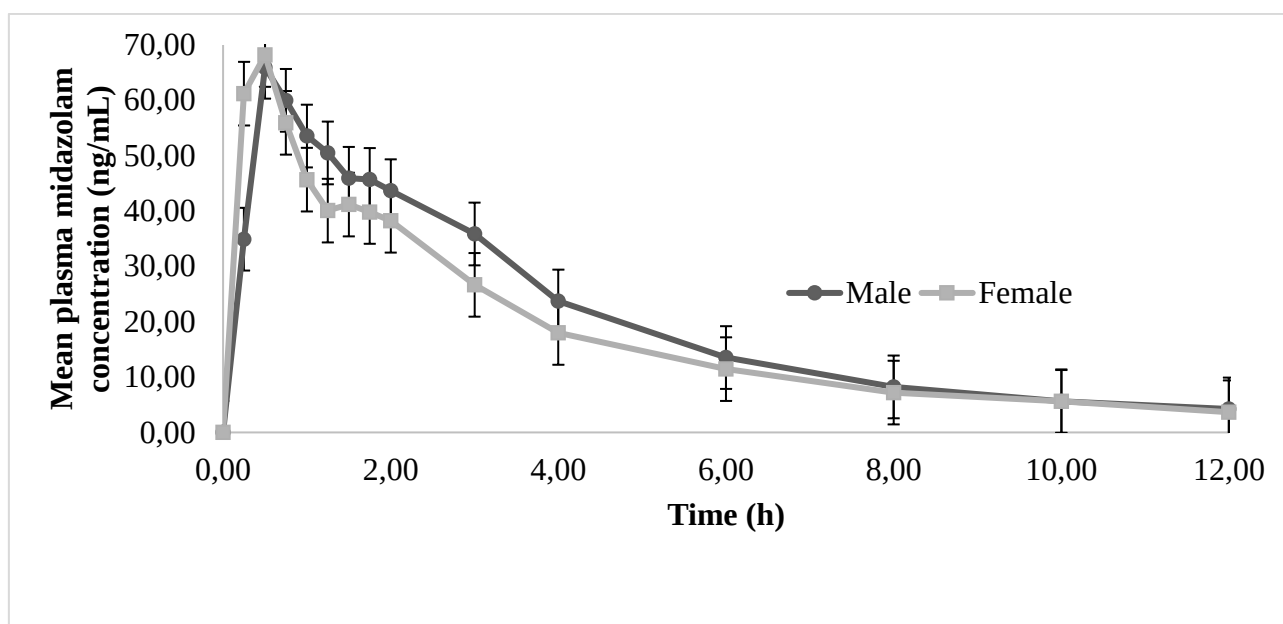
The plasma half-life of midazolam was significantly higher in the females than in the men. The volume of distribution in the women (378.70 L) was significantly higher than that in the men (285.29 L). The high value in the volume of distribution is because women have higher amounts of body fat than men do and midazolam is a lipophilic drug therefore, the drug distributes in a greater volume in women than in men. Already the high value of the plasma half-life of midazolam in the women is because the midazolam is retained in body fat and is released slowly.

Table 5

Parameter	Males			Females			P (ANOVA) (IC 95%)
	Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV	
$C_{\max}$ (ng/mL)	91.87	38.01	41.37	98.27	52.40	53.32	0.562463
AUC_{last} (ng.h/mL)	246.28	104.27	42.34	217.12	61.63	28.38	0.156157
$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	269.35	119.08	44.21	242.00	75.65	31.26	0.252695
$T_{\max}$ (h)	0.86	0.62	72.32	0.81	0.84	103.33	0.788498
λ_z (h ⁻¹)	0.239	0.072	30.19	0.202	0.061	30.19	0.025529
Vd (L)	378.70	174.90	47.44	285.29	103.00	36.10	0.018517
$t_{1/2}$ (h)	3.19	1.05	32.82	3.81	1.42	37.35	0.043459

%CV = Percent coefficient of variation (inter-individual); λ_z = Terminal elimination rate constant; $t_{1/2}$ = Plasma half-life; Vd = Volume of distribution; SD = Standard deviation.

Figure 2



The results obtained from this study demonstrate the efficacy and tolerability of midazolam and support its therapeutic use at a dose of 15 mg. However, the data obtained in this study may be limited in its application to the general population. This is because of the strictness of the inclusion and exclusion criteria, food restriction during the study, and the ethnic diversity of the Brazilian population.

Conclusions

We have described a simple, rapid, and sensitive LC-MS/MS method for the quantitation of midazolam in human plasma, which showed acceptable precision and adequate sensitivity. Midazolam was better tolerated by men than by women. Furthermore, statistical analysis showed that there were no significant differences in the respective values of $C_{\max}$, AUC_{last} , $AUC_{0-\infty}$, and $T_{\max}$ between the men and women; however, the plasma half-life and volume of distribution of midazolam were significantly higher in the women than in the men. Nevertheless, the dose must be adjusted in women to prevent the emergence of adverse events.

Conflict of interest

The principal author received a scholarship from the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) while conducting the study. The authors have no other conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank the staff of Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP for their help in the admission of the volunteers. We would also like to thank Editage (www.editage.com.br) for English language editing.

References

- (1) Wang H.Y., X. Chen, J. Jiang, J. Shi & P. Hu (2016) *Acta Pharmacol. Sin.* **37**: 276-84.
- (2) Sun G.C., M.C. Hsu, Y.Y. Chia, P.Y. Chen & F.Z. Shaw (2008) *Br. J. Anaesth.* **101**: 632–9.
- (3) Kupietzky A. & M.I. Houpt (1993) *Pediatr. Dent.* **15**: 237-41.
- (4) Monti J.M., M. Boussard, S. Olivera, P. Labraga & F. Alvariño (1993) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **44**: 525-7.
- (5) Bancke L.L., H.A. Dworak, K.A. Rodvold, M.B. Halvorsen & B.E. Gidal (2015) *Epilepsia.* **56**: 1723-31.
- (6) Feldmeier C. & W. Kapp (1983) *Br. J. Clin. Pharmacol.* **16**: 151S-155S.
- (7) Lupolover R., U. Ballmer, J. Helcl, B. Escher & B. Pavletic (1983) *Br. J. Clin. Pharmacol.* **16**: 139S-143S.
- (8) Beck H., M. Salom & J. Holzer (1983) *Br. J. Clin. Pharmacol.* **16**: 133S-137S.
- (9) Schwagmeier R., S. Alincic & H.W. Striebel (1998) *Br. J. Clin. Pharmacol.* **46**: 203-6.
- (10) Allonen H., G. Ziegler & U. Klotz (1981) *Clin. Pharmacol. Ther.* **30**: 653-61.
- (11) Roche Products Ltd. midazolam maleate (Dormonid®) tablets: prescribing information.
Available at

(http://www.Anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=3568852015&pIdAnexo=2589553).
- (12) Hu Z.Y. & Y.S. Zhao (2010) *Drug Metab. Dispos.* **38**: 817-23.
- (13) Badyal D.K. & A.P. Dadhich (2001) *Indian J. Pharmacol.* **33**: 248-59.

- (14) Schwartz J.B. (2003) *Clin. Pharmacokinet.* **42**: 107-21.
- (15) Schmucker D.L. & E.S. Vesell (1993) *Clin. Pharmacol. Ther.* **54**: 11-5.
- (16) Wizemann, T.M. & M.-L. Pardue (2001) “*Exploring the biological contributions to human health: Does sex matter?*”, The National Academies Press, Washington, pp.124-26.
- (17) Kharasch E.D., A. Walker, N. Isoherranen, C. Hoffer, P. Sheffels, K. Thummel *et al.* (2007) *Clin Pharmacol Ther.* **82**: 410-26.
- (18) Degen L.P. & S.F. Phillips. (1996). *Gut.* **39**: 299-305.
- (19) Wald A., D.H. Van Thiel, L. Hoechstetter, J.S. Gavalier, K.M. Egler, R. Verm *et al.* (1981). *Gastroenterology.* **80**: 1497-500.
- (20) Frezza M., C. di Padova, G. Pozzato, M. Terpin, E. Baraona & C.S. Lieber (1990) *N. Engl. J. Med.* **322**: 95-9.
- (21) Flockhart D.A. (1995) *Clin. Pharmacokinet.* **29**: 45-52.
- (22) Ofotokun I., S.K. Chuck & J.E. Hitti (2007) *Gend. Med.* **4**: 106-19.
- (23) World Medical Association Declaration of Helsinki (WMA) “*Ethical principles for medical research involving human subjects*”. Available at (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>).
- (24) Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration. “*Guidance for Industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products-general considerations*”. Available at (http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3995B1_07_GFI-BioAvail-BioEquiv.pdf).

- (25) European Medicines Agency. “*Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence*”. Available at
(http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003519.pdf).
- (26) Brazilian Health Surveillance Agency. “*Guide for bioavailability and bioequivalence test drugs*”. Available at
(<http://portal.Anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/733b4100474586a1900fd43fbc4c6735/Consolidado+de+normas+COBIO.pdf?MOD=AJPERES>).
- (27) Brazilian Health Surveillance Agency. “*It regulates the minimum requirements for the validation of bioanalytical methods used for recording purposes with studies and post-registration of medicines*”. Available at
(http://portal.Anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a435d90045fc4fc7a902ad7ffa9843d8/rdc+27_17_05_2012.pdf?MOD=AJPERES).
- (28) Brazilian Health Surveillance Agency. “*Guide for planning and carrying out the statistical stage of studies of relative bioavailability/bioequivalence*”. Available at
(http://www.Anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2003/898_03re_e.pdf).

APÊNDICE B – ARTIGO 02


Manuscript AJPP/10.01.16/4527 Details

Manuscript Info

Journal	African Journal of Pharmacy and Pharmacology		
Authors	SOLIZA FILHO JOSE HOMERO	Bedor Danilo César Galindo	Santana Davi Pereira
Manuscript number	AJPP/10.01.16/4527		
Title	Evaluation of the Sex differences in the Pharmacokinetics, Tolerability and Bioequivalence of Two Lamivudine Formulations in Healthy Brazilian Volunteers: An Open-Label, Randomized, Single-Dose, Two-Way Crossover Study		
Last Updated	January 13th, 2016		
Current Status	<u>ACKNOWLEDGEMENT</u> Your manuscript has been received by our Editorial Office and we have commenced it's processing. Meanwhile, you will be able to monitor it's progress by using our manuscript management portal on http://ms.academicjournals.me/ Kindly login as an author.		

Evaluation of the Sex differences in the Pharmacokinetics, Tolerability and Bioequivalence of Two Lamivudine Formulations in Healthy Brazilian Volunteers: An Open-Label, Randomized, Single-Dose, Two-Way Crossover Study

José Homero de Souza Filho*¹; Danilo César Galindo Bedor¹; Virna Ligianne Soares Ramos¹; Davi Pereira de Santana¹.

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético – NUDFAC, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil.

Address correspondence to: José Homero de Souza Filho; Department of Pharmacy, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; CEP: 50740-520; Tel/Fax:: +5581998608130, +558133026594; E-mail: homeroufpe@gmail.com

Abstract

Biological differences exist between men and women that can result in differences in responses to drugs. Both pharmacokinetic and pharmacodynamic differences between the sexes exist, and a greater amount of data regarding the pharmacokinetic differences is available. The aim of this study was to assess the influence of the gender of the volunteers on the pharmacokinetics of lamivudine following single-dose administrations of coated 150 mg tablets.

This study employed an open-label, randomized, 2-way crossover design with a 1-week washout and single-dose drug administrations to 27 (13 females and 14 males) healthy fasting volunteers who included adults ranging in age from 18 to 42 years. Plasma samples were collected over 36 hours. Plasma lamivudine concentrations were analyzed via a validated liquid chromatography tandem mass spectrometry system. Pharmacokinetic parameters were calculated, C_{max} , AUC_{last} , $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$, and T_{max} .

The 13 female volunteers had a mean [SD] age of 25.92 [4.94] years, a mean weight of 60.06 [7.24] kg, a mean height of 1.61 [5.73] m. The 14 male subjects had a mean [SD] age of 25.26 [5.98] years, a mean weight of 74.75 [8.74] kg, a mean height of 1.76 [5.91] m. Although 11 subjects experienced a total 16 adverse events (AEs), no serious AEs were reported during the study. The mean for C_{max} , AUC_{last} and $AUC_{0-\infty}$ were 2.04, 7.48, and 7.57, respectively, for the females and 1.63, 5.58, and 5.71, respectively for the males.

ANOVA revealed that there were statistically significant differences in the C_{max} , AUC, and $t_{1/2}$ values were found between the male and female volunteers in this population of healthy adult Brazilians. The two formulations were no considered bioequivalent.

Keywords: lamivudine, bioequivalence test, pharmacokinetics, high-performance liquid chromatography, Tolerability.

Introduction

Lamivudine was the first oral nucleoside analogue approved by the US Food and Drug Administration for the treatment of Chronic Hepatitis B (CHB) (Fok et al, 2013; Huang et al., 2013; Ryu et al., 2010). A recent metaanalysis by demonstrated that lamivudine treatment in the third trimester reduced the risk of perinatal transmission of hepatitis B (Nayeri et al., 2012). It is important to know the influence of gender on the pharmacokinetics of lamivudine to prevent adverse events and enhance the therapeutic effectiveness, especially in women. The pharmacokinetics of lamivudine are similar in patients with CHB infections and healthy volunteers, however the differences between men and women are little known. The maximum serum concentrations typically occur 0.5 to 1.5 hours after administration (Bigos et al, 2009). The absolute bioavailabilities are approximately 82 and 68% in adults and children, respectively (Johnson, 1999; Palumbo, 2008). Lamivudine systemic exposure, as measured by the area under the serum drug concentration-time curve (AUC), is not altered when it is administered with food. Hepatic impairment does not affect the pharmacokinetics of lamivudine (Bigos et al, 2009; Lua et al., 2014). In healthy volunteers, at a therapeutic dose of 150 mg twice daily, the mean steady-state C_{max} and C_{min} of lamivudine in plasma are 1.2 $\mu\text{g/ml}$ and 0.09 $\mu\text{g/ml}$, respectively. At a therapeutic dose of 300 mg once daily, the mean steady-state C_{max} , C_{min} and AUC_{0-24} are 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 0.04 $\mu\text{g/ml}$ and 8.8 $\mu\text{g.h/ml}$, respectively. Although the protein binding of lamivudine is limited, lamivudine is widely distributed in the total body fluid with a mean apparent volume of distribution (V_d) of approximately 1.3 L/Kg following intravenous administration. Because approximately 70% of an oral dose is eliminated in the urine as unchanged drug, the dose needs to be reduced for patients with renal insufficiency (Van Leeuwen et al., 1995; Johnson et al. 1999; Perry and Faulds, 1997).

Biological differences exist between men and women that can result in differences in responses to drugs (Soldin and Mattison, 2009). Both pharmacokinetic and pharmacodynamic differences between the sexes exist, and a greater amount of data regarding the pharmacokinetic differences is available. On average, men are larger than women. Body size differences result in a large distribution of volumes and faster total clearances of most medications in men compared to women. The larger quantity of fat in women (until they reach older ages) might increase the distribution volumes of lipophilic drugs in women (Soldin et al., 2011). The total drug absorption does not appear to be significantly affected by sex, although absorption rates might be slightly slower in women. The bioavailabilities that follow oral drug dosing, particularly for CYP3A substrates, might be somewhat higher in women than in men (Schwartz, 2004; Wizemann and Pardue, 2001).

Sex differences in CYP isozyme function that affect the clearance have been reported for CYP3A4 and CYP1A2 (Soldin et al., 2011; Badyal and Dadhich, 2001). These differences might be confused when a drug has a high clearance and/or is a substrate for both CYP3A and the P-glycoprotein multidrug resistance (MDR1) pump (Wessler et al., 2013). The clearance of some drugs depends on the rate of blood flow into the eliminating organ (i.e., the liver and kidney) and thus indirectly on liver size (Mangoni and Jackson, 2003). Women have smaller livers and a lower liver blood flow rate than men. Therefore, the observed sex differences might not be solely due to metabolic differences but also due to differences in blood flow (Flockhart, 1995; Ofotokun, 2007).

The aim of this study was to assess the influence of the gender of healthy Brazilian volunteers on the pharmacokinetics and the bioequivalence of lamivudine following the administrations of single doses of coated 150 tablets mg.

Material and methods

Study design

A randomized, single-dose, open-label, fasting, 2-period, 2-sequence, crossover study design with a 7-day washout period was used in this study. The study protocol was reviewed and approved by the research ethics committee (Comitê de Ética em Pesquisa – CEP) of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), and the study was performed in accordance with the revised Declaration of Helsinki (Finland, 1964). The study was conducted according to the Brazilian National Agency for the Evaluation of Medicinal Products – ANVISA (Brazil, 2006) at the Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil study site under the supervision of a medical team.

Volunteers were admitted to the hospital at 7 pm on the evening before the administration of the first dose of lamivudine and consumed an evening meal before 10 pm. After a 10-hour overnight fast, the volunteers received a single 150-mg dose of either the test or reference formulation with 200 mL of water in a random order that was based on computer-generated tables of random numbers. Additional water intake was permitted 2 hours after administration of the study drug, and food intake was allowed 4 hours after treatment. During the study, food intake was strictly controlled, and all volunteers received the same standardized food to minimize the effects of food on the study outcomes. The consumption of alcohol, coffee, and xanthine-containing drinks during the trial was forbidden.

Study population

Twenty-seven healthy Brazilian volunteers of both sexes (14 men and 13 women) between the ages of 18 to 42 years old with body mass indices between 19.40 and 28.90 kg/m² were enrolled in this study. The details and purpose of the study were explained to all volunteers, and a written informed consent was obtained from each volunteer prior to participation in the trial.

Inclusion and exclusion criteria

Healthy, nonsmoking adult (age 18–42 years) Brazilian with body mass indices ranging from 18 to 29 kg/m² were recruited in Recife, Pernambuco. Subjects were excluded from the study for the following reasons: a clinically documented hepatic, renal, cardiac, gastrointestinal, or psychiatric disorder; a history of the use of or a contraindication/allergy to the study drug or any related compound; consumption of any prescription or over-the-counter drug in the 4 weeks before the study; a history of alcohol or drug abuse; donated blood <3 months before the study; and participation in another bioavailability or bioequivalence study within the 6 months before the study. Volunteers with known hypersensitivities to any biologic agent, reported use of other drugs that might interfere with the study results within the 14 days prior to the study, or histories of drug abuse were also excluded from the study. Female volunteers were required have a confirmed negative pregnancy test before enrolling in the study.

Sample collection

Blood samples (8 mL) were collected from an indwelling catheter in the antecubital vein of the forearm before dosing and at 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 2.75, 3, 3.5, 4, 6, 8, 12, 24 and 36 hours after dosing (a total of 16 blood samples were obtained from each

volunteer in each part of the study). The catheter (Jelco, Critikon, Tampa Bay, Florida) was flushed with 1 mL of heparinized saline (10 IU/mL) after obtaining each sample. The blood samples were transferred to EDTA-coated tubes (Vacutainer, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey) and immediately centrifuged for 10 minutes at 3000 *g*. The blood and plasma were labeled, and the plasma was separated using disposable polypropylene tips and transferred to cryogenic tubes that were then stored in a freezer at -70°C until analysis.

Sample Preparation

The stock solutions of lamivudine (1.0 mg mL^{-1}) were prepared by dissolving the substance in water, and the internal standard (stavudine) stock solution (1.0 mg.mL^{-1}) was prepared in water. The working solutions of lamivudine were prepared in the mobile phase (see chromatography conditions below) to cover the range of concentrations from 10 to 3000 ng mL^{-1} . The internal standard (I.S.) working solution was also prepared in the mobile phase at a concentration of 1000 ng mL^{-1} . The calibration curves for lamivudine were prepared in human plasma at concentrations of 10, 30, 200, 500, 1000, 1500, 2000 and 3000 ng mL^{-1} . Quality control samples were also prepared in human plasma at the following concentrations: 30, 700 and 2100 ng mL^{-1} (i.e., the low, medium and high quality controls, respectively).

The plasma samples were prepared by mixing 400 μL of human plasma and 50 μL of IS solution (stavudine, 1000 ng mL^{-1}) in a tapered tube and adding of 400 μL of phosphoric acid (0.25%) followed by vortex mixing for 1 minute. SPE cartridges (Waters OASIS HLB 1cc Cartridge) that had been sequentially conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of water were used for sample preparation. The plasma samples were introduced into the cartridges under vacuum at 5 psi. Water (2 mL) was used to rinse the cartridges. The analytic was eluted with 400 μL acetonitrile. Twenty microliters of the samples were injected into the HPLC-MS/MS system.

Satisfactory values for the recovery of lamivudine were obtained with a single extraction using RP solid-phase cartridges for the isolation of the drugs and the internal standard (stavudine) from the plasma samples. The extraction recovery was determined by comparing the peak areas of the extracted plasma standards to the peak areas of the post extraction plasma blanks spiked at the corresponding concentrations. The absolute recoveries and their %CVs were 95%, 96.6%, and 98.1%, and 9.85%, 6%, and 3.8% for the low quality control (LQC, 0.03 µg/mL), middle quality control (MQC, 0.7 µg/ mL), and high quality control (HQC, 2.1 µg/mL) lamivudine samples, respectively. The recovery rate for the IS stavudine was 99.27%.

Chromatographic conditions

Lamivudine in the plasma was quantified with a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method that was developed and validated before the study. All solvents were of HPLC grade, and the chemicals and reagents were of analytic grade. The USP Standard Reference Lamivudine (Lot.GOF114; purity, 99.7%) and the USP Standard Reference Stavudine (as internal standard (IS), Lot. F0E050; purity, 99.7%) were purchased from US Pharmacopeia (USP, Rockville, MD, USA).

The HPLC-MS/MS and chromatography conditions were optimized for the analytic column, mobile phase, and sample detection. The HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was equipped with 2 pumps (models LC10ADvp and FCV-10ALvp), a vacuum degasser (DGU-14A), an auto sampler (SIL-10AD VP), and a controller module (SCL- 10A VP). Chromatographic separation was achieved on a Gemini[®] 150 x 4.6 mm, 5 µm C18 column (Phenomenex, Torrance, California, USA). The mobile phase consisted of 0.05% sodium hydroxide (0.025 N) and 0.1% formic acid in methanol/water (80:20 vol/vol), and the flow rate was 1 mL/min. The samples were maintained in at 4°C in an auto sampler, and a volume of 20

μL was injected for analysis. The HPLC eluent was split 1:3 at 250 μL/min into the mass spectrometer.

ESI-MS/MS detection conditions

Mass spectrometric detection was performed on a Micromass Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA) using multiple reaction monitoring (MRM) and operation in the positive ionization mode (ESI+). The dwell time was set at 500 milliseconds, and the ion source temperature was set at 110°C. Argon was used as the collision gas at a pressure of 1.88×10^{-3} psi in the collision cell. The capillary and cone voltages were 3.0 kV and 20 V, respectively, and the desolvation temperature was 300°C. Multiple reaction monitoring transitions were at mass-to-charge ratios (m/z) of 246.99 → 149.18 and 256.13 → 134.35 for lamivudine and stavudine, respectively. Data acquisition and processing were powered by the MassLynks V3.5 software (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

The analytical method for lamivudine quantification in plasma samples exhibited good linearity, specificity, sensitivity, precision, and accuracy over the entire range of clinically significant and therapeutically achievable plasma concentrations. Under the conditions described above, the method was linear in the range of 0.001 to 3 μg/mL. The lower limit of quantification was 0.01 ng/mL, and the precision (8.2%) and accuracy (102%) were good. The intra-assay precision was between 4.6% and 10.6%, and the interassay precision was between 7.4% and 8%. The accuracies ranged from 94.2% to 100.8% (intra-assay) and from 96% to 97.2% (interassay).

Tolerability assessments

Tolerability was evaluated through the assessment of AEs, standard laboratory evaluations, and vital signs. The regular monitoring and recording of all AEs included any symptoms, their time of onset and resolution, duration, severity, and relationship to the study drug. Routine blood chemistry analysis, blood cell counts with white blood cell differential, urinalyses, physical examinations, ECGs, and vital

Pharmacokinetics and statistical analyses

The following pharmacokinetic parameters were calculated using non-compartmental methods: area under the plasma concentration–time curve from zero to the last measurable lamivudine concentration sample time (AUC_{last}), area under the plasma concentration–time curve from zero extrapolated to infinite time ($AUC_{0-\infty}$), maximum plasmatic drug concentration (C_{max}), and time to reach C_{max} (T_{max}). C_{max} and T_{max} were obtained directly from the plasma concentration–time curve after a single 150-mg dose of lamivudine (test or reference) was administered. AUC_{last} was calculated using the linear trapezoidal method. $AUC_{0-\infty}$ was calculated as $AUC_{last} + C_t/\lambda_z$, where C_t was the last measured concentration, and λ_z was the slope of the linear regression of the log-transformed concentration-time curve (Brazil, 2003).

The bioequivalence of the 2 lamivudine products was assessed by calculating individual the AUC_{last} , $AUC_{0-\infty}$, and C_{max} values. The ratio (test vs. reference) of the log-transformed data and their means and 90% CIs were evaluated with analyses of variance (ANOVA) performed with WinNonlin Professional version 4.0.1 software (Pharsight Corporation, Mountain View, California). The formulations were to be considered bioequivalent if the calculations of the 90%

CI for the ratio of the means of the measures for the test and reference formulations fell within the bioequivalence limits of 80% to 125% of the logarithmic transformations of $C_{\max}$ and AUC.

Results

Subject characteristics

The 13 female volunteers had a mean [SD] age of 25.92 [4.94] years, a mean weight of 60.06 [7.24] kg, a mean height of 1.61 [5.73] m and a mean body mass index (BMI) of 22.92 [2.31] kg/m². The 14 male subjects had a mean [SD] age of 25.26 [5.98] years, a mean weight of 74.75 [8.74] kg, a mean height of 1.76 [5.91] m and a mean body mass index (BMI) of 24.10 [2.41] kg/m². The baseline characteristics of the 27 subjects are listed in **Table 1**.

Table 1 – Age, weight, and height data for the healthy Brazilian volunteers who participated in the study (N = 27, 14 males and 13 female).

Variable	Mean (SD)		Range	
	Male	Female	Male	Female
Age, year	25.26 (5.98)	25.92 (4.94)	18 - 42	19 – 34
Weight, kg	74.75 (8.74)	60.06 (7.24)	63 – 88.5	52 – 78.5
Height, cm	176 (5.91)	161 (5.73)	165 - 189	152 – 170
BMI	24.10 (2.41)	22.92 (2.31)	20.6 – 28.9	19.4 – 27.1

BMI = Body Mass Index

SD = Standard Deviation

The results of the physical examinations of all 27 subjects during the pre- and post-study visits were all normal.

Tolerability

No serious or unexpected adverse events were observed in this study. Eleven subjects (2 and 9 with the test and reference formulations, respectively) experienced 7 adverse events during the study periods. Among them, 1 adverse events were suspected to be unrelated to the formulation (dysmenorrhea), while 6 adverse events were considered to be related to the formulation tested. These adverse events included 5 cases of nausea, 5 cases of headache, 3 cases of diarrhea, 1 case of sweating, 1 case of dimming of vision and 1 case abdominal pain.

Pharmacokinetic properties and statistical analysis

The mean plasma concentration–time profiles after a single oral dose of the study drug are shown in **Figure 1**.

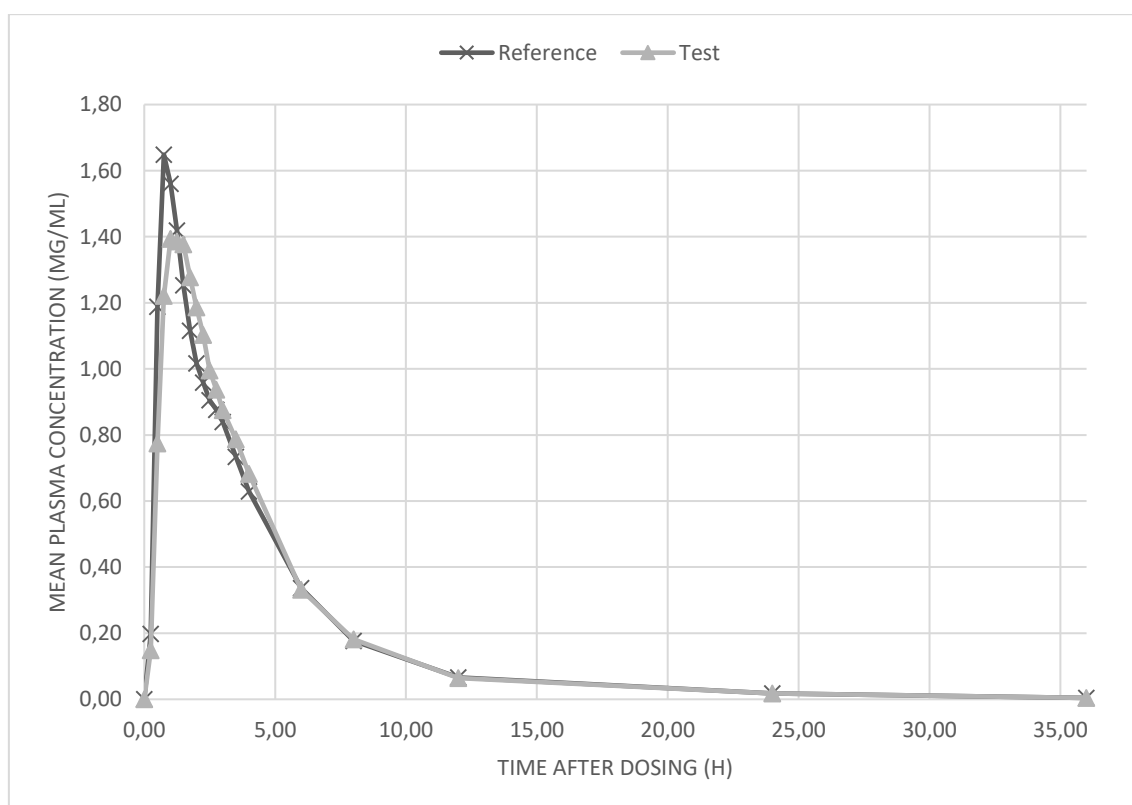


Figure 2 - Mean lamivudine plasma concentrations at various times after administration of the test and reference formulations of lamivudine 150-mg tablet (N = 27 (Male 14, Female 13)).

The 90% CIs for lamivudine $C_{\max}$, AUC_{last} and $AUC_{0-\infty}$ were 71.94% to 97.67%, 87.89% to 101.20%, and 88.91% to 101.50%, respectively. The $C_{\max}$, AUC_{last} , and $AUC_{0-\infty}$ values of test/reference formulations were 1.55/1.85 $\mu\text{g/mL}$, 6.08/6.43 $\mu\text{g}\cdot\text{h mL}^{-1}$ and 6.22/6.54 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, respectively. The PK parameters are summarized in **Table 2**.

Table 2 – Mean (SD) pharmacokinetic parameters of lamivudine following oral administration of single doses of the test and reference formulations of the 150-mg lamivudine tablets (N = 27).

Parameter	Test (SD)	Reference (SD)	CV (%)	Power (%)	90% Confidence intervals of parametric means		
					Ratio	Lower limit (%)	Upper limit (%)
$C_{\max}$, $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.55 (0.56)	1.85 (0.70)	33.76	78.03	0.84	71.94	97.67
AUC_{last} , $\mu\text{g}\cdot\text{h mL}^{-1}$	6.08 (1.70)	6.43 (1.57)	15.24	99.95	0.94	87.89	101.20
$AUC_{0-\infty}$, $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	6.22 (1.67)	6.54 (1.56)	14.29	99.98	0.95	88.91	101.50
$T_{\max}$, h	1.26 (0.55)	0.89 (0.29)					
$t_{1/2}$, h	5.47 (3.30)	4.37 (2.17)					

%CV = percent coefficient of variation inter-individual.

SD = Standard Deviation

[†] Epivir (GlaxoSmithKline, Middlesex, United Kingdom)

Gender differences

The calculated pharmacokinetic parameters of gender are shown in **Figure 2 and Table**

4. The mean [SD] $T_{\max}$ values were 1.04 [0.505] for male and 1.11 [0.443] hours for female.

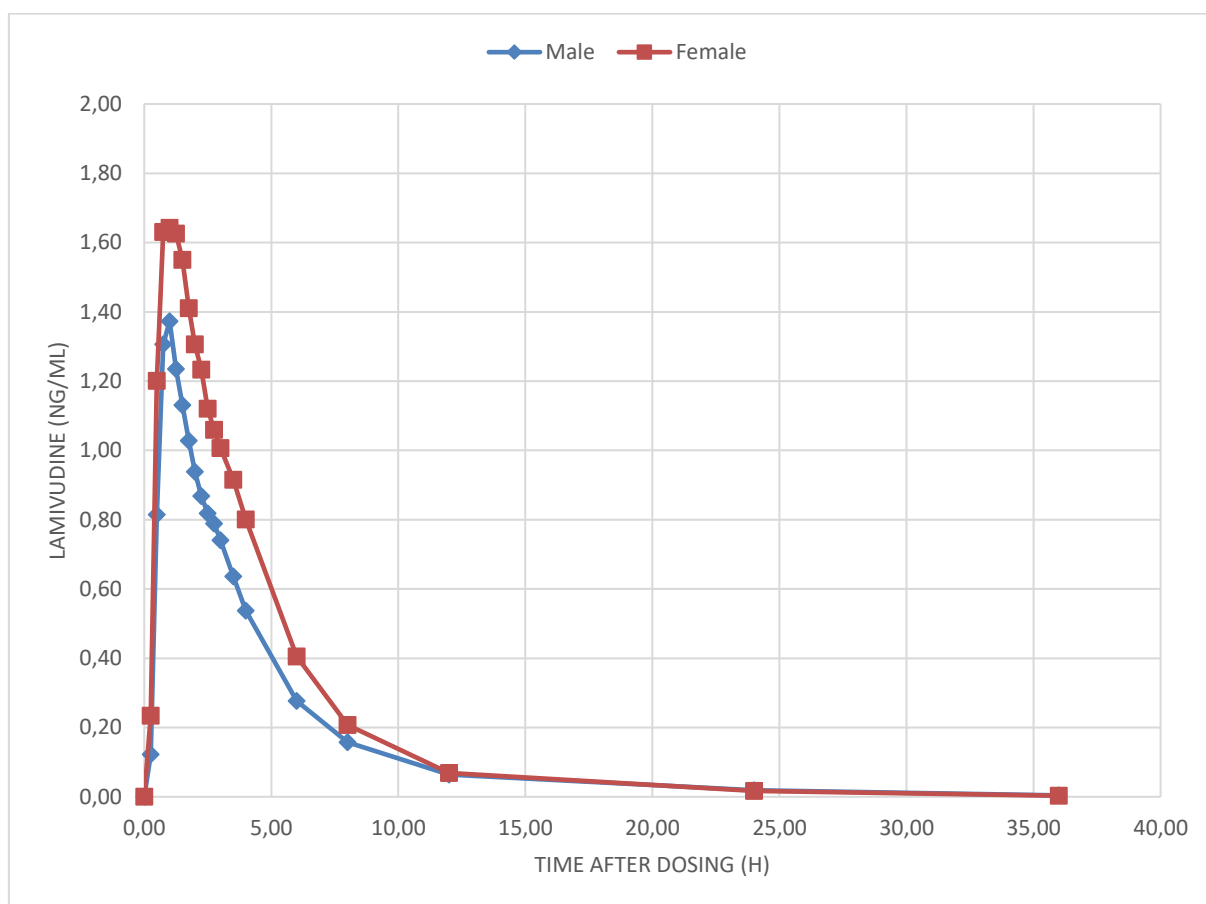


Figure 3 – Mean plasma concentrations vs. time curve for males and females after the administration of a single dose 150 mg of lamivudine tablets. Means of test and reference formulation (n = males 14, females 13).

Table 3 – Pharmacokinetic parameters of lamivudine for males and females after a single 150-mg oral dose of two formulations of lamivudine tablets, obtained by a noncompartmental model (n = 14 males and 13 female).

PARAMETER	Male		Female		P (ANOVA)
	Mean	SD	Mean	SD	
$C_{\max}$, $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.63	0.628	2.04	0.605	0.019404
AUC_{last} , $\mu\text{g}\cdot\text{h}$ mL^{-1}	5.58	1.543	7.48	1.047	0.000003
$\text{AUC}_{0-\infty}$, $\mu\text{g}\cdot\text{h}$ mL^{-1}	5.71	1.528	7.57	1.030	0.000003
$T_{\max}$, h	1.04	0.505	1.11	0.443	0.637542
λ_z h^{-1}	0.15	0.061	0.19	0.045	0.031706
$t_{1/2}$, h	5.62	3.170	4.17	2.220	0.055661

%CV = percent coefficient of variation inter-individual.

λ_z = terminal elimination rate constant.

SD = Standard Deviation

† Epivir (GlaxoSmithKline, Middlesex, United Kingdom)

Data of both formulations are included.

The extent of absorption results as determined from the mean [SD] $C_{\max}$, AUC_{last} and $\text{AUC}_{0-\infty}$ values were 1.63 [0.628] $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5.58 [1.543] $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 5.71 [1.528] $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, for male and 2.04 [0.605] $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 7.48 [1.047] $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 7.57 [1.030] $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, female. The mean [SD] $t_{1/2}$ 5.62 [3.170] hours for male and 4.17 [2.220] hours for female.

For male volunteers, the mean $C_{\max}$ ratio (test/reference) was estimated to be 71.02 with a 90% confidence interval of 56.55 – 89.20. The mean AUC_{last} ratio was 85.90% with a 90% confidence interval of 77.09 – 95.72, and the mean $AUC_{0-\infty}$ ratio was 87.23 with a 90% confidence interval of 78.78 – 96.58 (**Table 4**) and for female volunteers, the mean $C_{\max}$ ratio (test/reference) was estimated as 101.21 with a 90% confidence interval of 84.29 – 121.53. The mean AUC_{last} ratio was 104.75% with a 90% confidence interval of 97.85 – 112.14, and the mean $AUC_{0-\infty}$ ratio was 104.55 with a 90% confidence interval of 97.83 – 111.72 (**Table 4**).

Table 4 – Bioequivalence confidence intervals of the two 150-mg lamivudine oral formulations (test/reference[†]) in the healthy Brazilian volunteers (n = 14 males and 13 female).

90% Confidence intervals of parametric means										
PK Parameters	Female (N=13)					Male (N=14)				
	Ratio	Lower	Upper	CV	Power	Ratio	Lower	Upper	CV	Power (%)
		limit	limit	(%)	(%)		limit	limit	(%)	
		(%)	(%)				(%)	(%)		
$C_{\max}$, µg/mL	101.21	84.29	121.53	26.33	65.06	71.02	56.55	89.20	34.81	48.76
AUC_{last} , µg h mL ⁻¹	104.75	97.85	112.14	9.67	99.91	85.90	77.09	95.72	16.16	95.88
$AUC_{0-\infty}$, µg h mL ⁻¹	104.55	97.83	111.72	9.41	99.93	87.23	78.78	96.58	15.20	97.25

[†] Epivir (GlaxoSmithKline, Middlesex, United Kingdom)

Discussion

The pharmacokinetic profiles of lamivudine varied by gender as indicated by the significant increases in the rate of absorption ($C_{\max}$), AUC_{last} , and $AUC_{0-\infty}$ in the female gender (**Table 3 and 4, Figure 2**). The female participants had a %CV less than the average of the groups and lower than the male volunteers (**Table 4**).

This study of 27 healthy adult Brazilian volunteers showed that the two 150-mg lamivudine formulations were not bioequivalent according to the recommendations of the European (EMA)¹⁴, US (FDA)¹³ and Brazilian (ANVISA)^{12,15} regulatory frameworks relevant to investigations of bioavailability and bioequivalence. The 90% confidence intervals for the primary endpoint AUCs were completely contained within the pre-defined bioequivalence acceptance range of 80–125%. However, the $C_{\max}$ was outside the predefined range (**Table 2**).

The results obtained in studies in healthy Brazilian subjects serve as a key point for the evaluation of the efficacy and tolerability of medical products in clinical use. However, the extrapolation of the data obtained in this clinical trial may limit the generalizability of our findings in the general population because of the complexities of the inclusion/exclusion criteria, dietary restrictions in the study protocol, and ethnic differences between the Brazilian and general populations.

CONCLUSIONS

The analysis revealed that the 90% CIs for the Ln-transformed $C_{\max}$, AUC_{last} , and $AUC_{0-\infty}$ of the test and reference formulations of the 150-mg tablets of lamivudine were without the acceptable ranges for bioequivalence. Both formulations were well tolerated. ANOVA revealed that there were significant differences in $C_{\max}$, AUC_{last} or $AUC_{0-\infty}$ between the genders.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all staff from the Center of Clinical Research of IMIP - Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira.

CONFLICTS OF INTEREST

This study was funded by Ministry of Health of Brazil. The authors have indicated that they have no other conflicts of interest regarding the content of this article.

REFERENCES

Badyal DK, Dadhich AP (2001). Cytochrome P450 and drug interactions. *Indian J Pharmacol.* 33:248-259.

Bigos KL, Pollock BG, Stankevich BA, Bies RR (2009). Sex differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of antidepressants: an updated review. *Gend Med.* 6(4):522-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.genm.2009.12.004>

BRASIL. Resolução RDC n.898. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Oficial da União, Brasília, 2003.

BRASIL. Resolução RE n.1170. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária—ANVISA. Guia para provas de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, 2006.

FINLAND. World Medical Association Declaration of Helsinki (WMA). Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Adopted by the 18th WMA General Assembly,

Helsinki, Finland, June 1964, and amended by the 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 7, 2000 [WMA Web site]. <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm> . Accessed December 20, 2015.

Flockhart DA (1995). Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 2C19. Clin Pharmacokinet. 29(1):45-52. <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-199500291-00008>

Fok BSP, Gardner S, Piscitelli S, Chen S, Chu TTW, Chan JCM, Tomlinson B (2013). Pharmacokinetic Properties of Single-Dose Lamivudine/Adefovir Dipivoxil Fixed-Dose Combination in Healthy Chinese Male Volunteers. Clin Therapeut. 35(1):68-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.12.001>

Huang ZB, Zhao SS, Huang Y, Dai XH, Zhou RR, Yi PP, Chen RC, Li WT, Zhang BX, Li N, Fan XG (2013). Comparison of the efficacy of lamivudine plus adefovir versus entecavir in the treatment of lamivudine-resistant chronic hepatitis B: a systematic review and meta-analysis. Clin Therapeut. 35(12):1997-2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2013.10.002>

Johnson MA, Moore KH, Yuen GJ, Bye A, Pakes GE (1999). Clinical pharmacokinetics of lamivudine. Clin Pharmacokinet. 36:41–66. <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-199936010-00004>

Lua CM, Houa ML, Linb LC, Tsai TH (2014). Development of a microdialysis system to monitor lamivudine in blood and liver for the pharmacokinetic application in herbal drug interaction and the gene expression in rats. J Pharm Biomed Anal. 96(5):231–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.001>

Mangoni AA, Jackson SHD (2003). Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *Br J Clin Pharmacol*. 57(1):6-14. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.02007.x>

Nayeri UA, Werner EF, Han CS, Pettker CM, Funai EF, Thung SF (2012). Antenatal lamivudine to reduce perinatal hepatitis B transmission: a cost-effectiveness analysis. *Am J Obstet Gynecol* 231:e1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2012.06.001>

Ofotokun I, Chuck, SK, Hitti JE (2007). Antiretroviral pharmacokinetic profile: a review of sex differences. *Gend Med*. 4(2):106-19. [http://dx.doi.org/10.1016/S1550-8579\(07\)80025-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1550-8579(07)80025-8)

Palumbo E (2008). Lamivudine for Chronic Hepatitis B: A Brief Review. *Braz J Infect Dis*. 12(5):355-357. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702008000500002>

Perry CM, Faulds D (1997). Lamivudine: a review of its antiretroviral activity. Pharmacokinetic property and therapeutic efficiency in management of HIV infection. *Drugs*, 53:657-680.

Ryu HJ, Lee JM, Ahn SH, Kim DY, Lee MH, Han KH, Chon CY, Park JY (2010). Efficacy of adefovir add-on lamivudine rescue therapy compared with switching to entecavir monotherapy in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *J Med Virol*. 82:1835–1842. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21898>

Schwartz JB (2004). The influence of sex on pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 42(2):107-21. <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-200342020-00001>

Soldin OP, Chung SH, Mattison DR (2011). Sex Differences in Drug Disposition. *J Biomed Biotechnol*. 2011:1-14. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/187103>

Soldin OP, Mattison DR (2009). Sex Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*. 48(3):143–157. <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-200948030-00001>

Van Leeuwen R, Katlama C, Kitchen V, Boucher CA, Tubiana R, McBride M, Ingrand D, Weber J, Hill A, McDade H, Danner SA (1995) Evaluation of Safety and Efficacy of 3TC (Lamivudine) in Patients with Asymptomatic or Mildly Symptomatic Human Immunodeficiency Virus Infection: A Phase I/II Study. *J Infect Dis.* 171(5):1166-1171.
<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/171.5.1166>

Wessler JD, Grip LT, Mendell J, Giugliano RP (2013). The P-Glycoprotein Transport System and Cardiovascular Drugs. *J Am Coll Cardiol.* 61(25):2495-2502.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2013.02.058>

Wizemann TM, Pardue ML (2001). Exploring the Biological Contributions to Human Health: Does Sex Matter?. Institute of Medicine (US) Committee on Understanding the Biology of Sex and Gender Differences. Washington (DC): National Academies Press (US).
<http://www.nap.edu/catalog/10028.html>. Accessed December 20, 2015.

APÊNDICE C – MODELO DE PLANILHA DE APLICAÇÃO DE METANÁLISES

Initial Calculations (inter studies) - Transformed data to "Ln"						
	1		2		3	
	Parameters		Parameters		Parameters	
Calculate_01	Cmax	AUClast	Cmax	AUClast	Cmax	AUClast
Reference Mean	4.66637	4.66637	4.66826	4.66826	4.66811	4.66811
Teste Mean	4.49479	4.49479	4.69663	4.69663	4.84877	4.84877
MSE	0.00031	0.00031	0.00038	0.00038	0.00047	0.00047
N1	12		12		12	
N2	12		12		12	
Ch	0.0417		0.0417		0.0417	
ω_h	24		24		24	
$\sum_{i=1}^H \omega_h$	72					
$d_h^{\wedge}$	-0.172	-0.17158	0.028	0.02837	0.181	0.18066

Variability homogeneity test for the reference treatment

	All studies combined	
	Parameters	
Calculate 02	Cmax	AUClast
Number studies	3	
$\bar{W}$	24	
Grand Mean "R"	4.668	4.668
χ_R^2	0.000053	0.000053
P- valor	1.0000	1.0000
$\bar{d}$	0.012483333	0.012483333
σ_e^2	0.000386667	0.000386667
$Var(\bar{d})$	0.000005370	0.000005370

$\hat{D}_{hh}^{Cmax}$
 $\hat{D}_{hh}^{AUClast}$
 $Var(\hat{D}_{hh}^{Cmax})$
 $Var(\hat{D}_{hh}^{AUClast})$

1	2	1	3	2	3
-0.19995		-0.35224		-0.15229	
-0.19995		-0.35224		-0.15229	
0.00006		0.00006		0.00006	
0.00006		0.00006		0.00006	

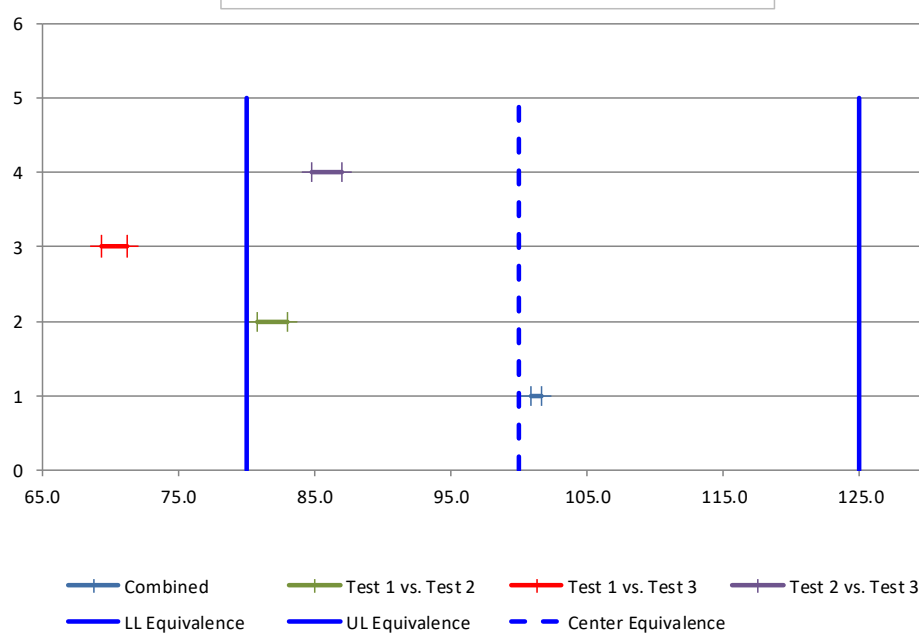
Result of the variability test

Com base no p-valor obtido a variabilidade dos lotes dos medicamentos referência, no parâmetro Cmax, não é estatisticamente diferente a um nível de significância de 5%
 Com base no p-valor obtido a variabilidade dos lotes dos medicamentos referência, no parâmetro AUClast, não é estatisticamente diferente a um nível de significância de 5%

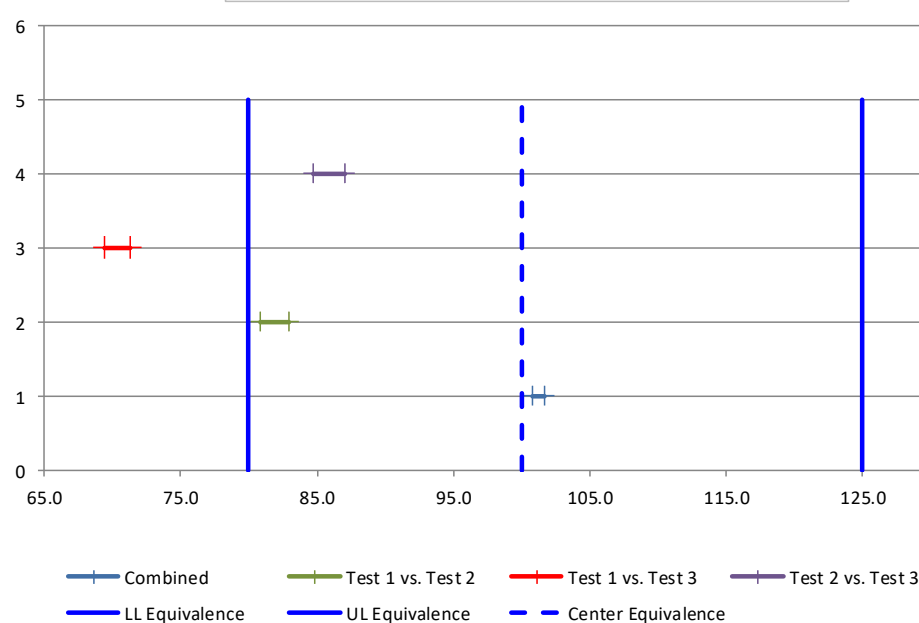
Confidence Intervals

	Cmax		AUClast	
	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Lim. Inf.	Lim. Sup.
Combined	0.009 100.9	0.016 101.6	0.009 100.9	0.016 101.6
Test 1 vs. Test 2	-0.213 80.8	-0.187 83.0	-0.213 80.8	-0.187 83.0
Test 1 vs. Test 3	-0.366 69.4	-0.339 71.3	-0.366 69.4	-0.339 71.3
Test 2 vs. Test 3	-0.166 84.7	-0.139 87.0	-0.166 84.7	-0.139 87.0

Meta-analysis of bioequivalence (Cmax parameter)



Meta-analysis of bioequivalence (AUClast) parameter



APÊNDICE D – GRÁFICOS MOSTRANDO AS DIFERENÇAS ENTRE OS PERFIS FARMACOCINÉTICOS COM A EXCLUSÃO DOS PONTOS DE COLETA.

Figura 33 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência

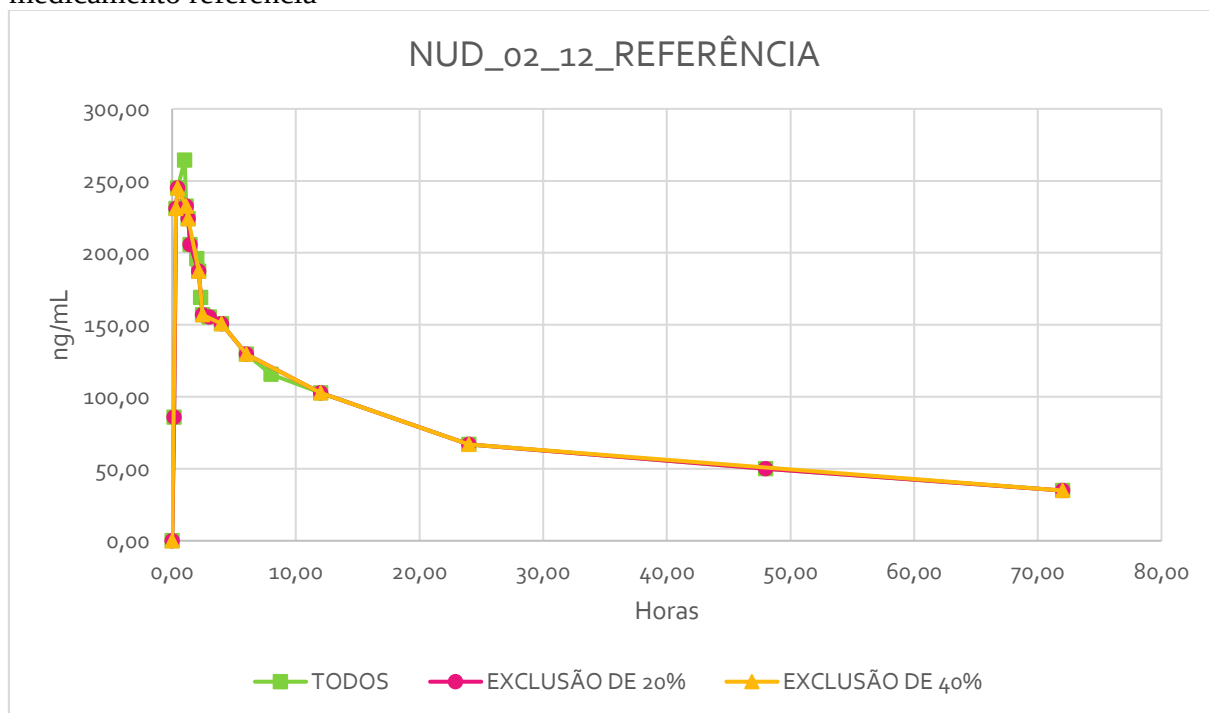


Figura 34 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste

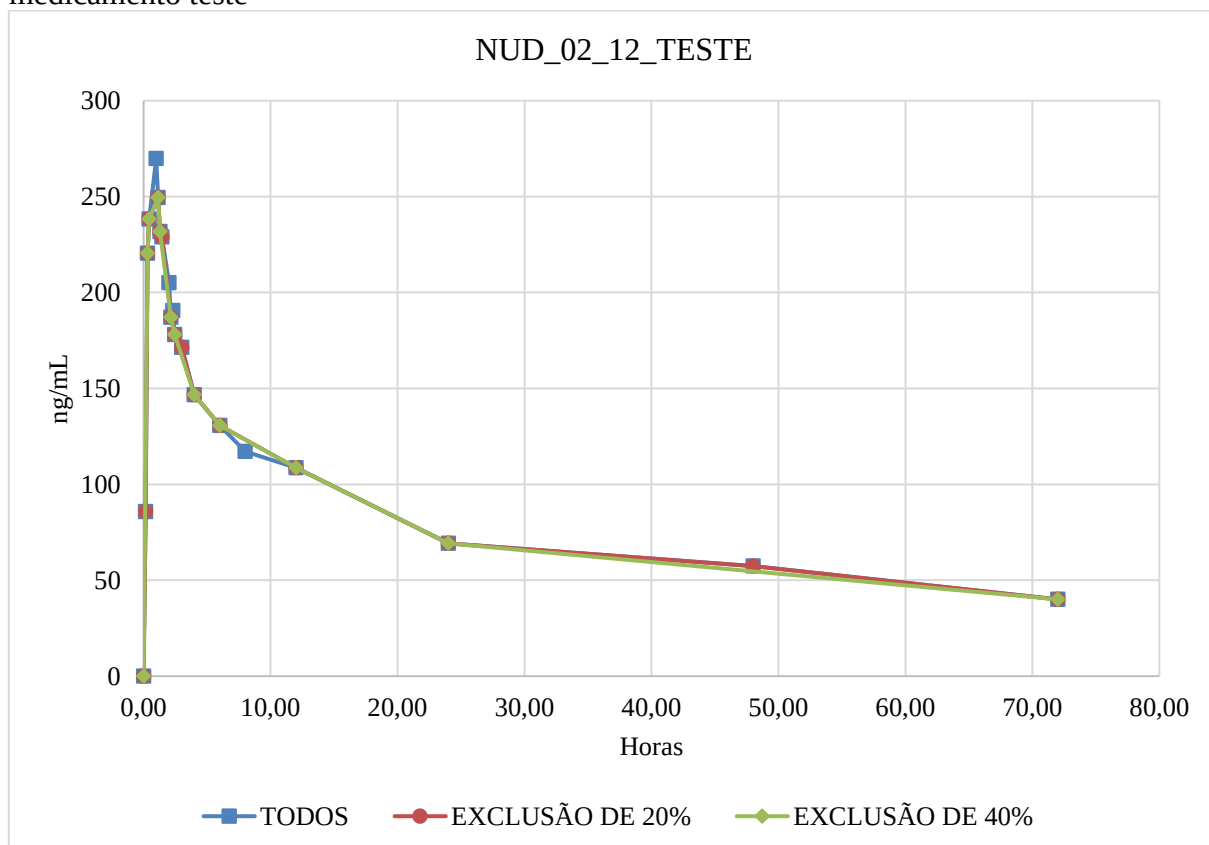


Figura 35 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência

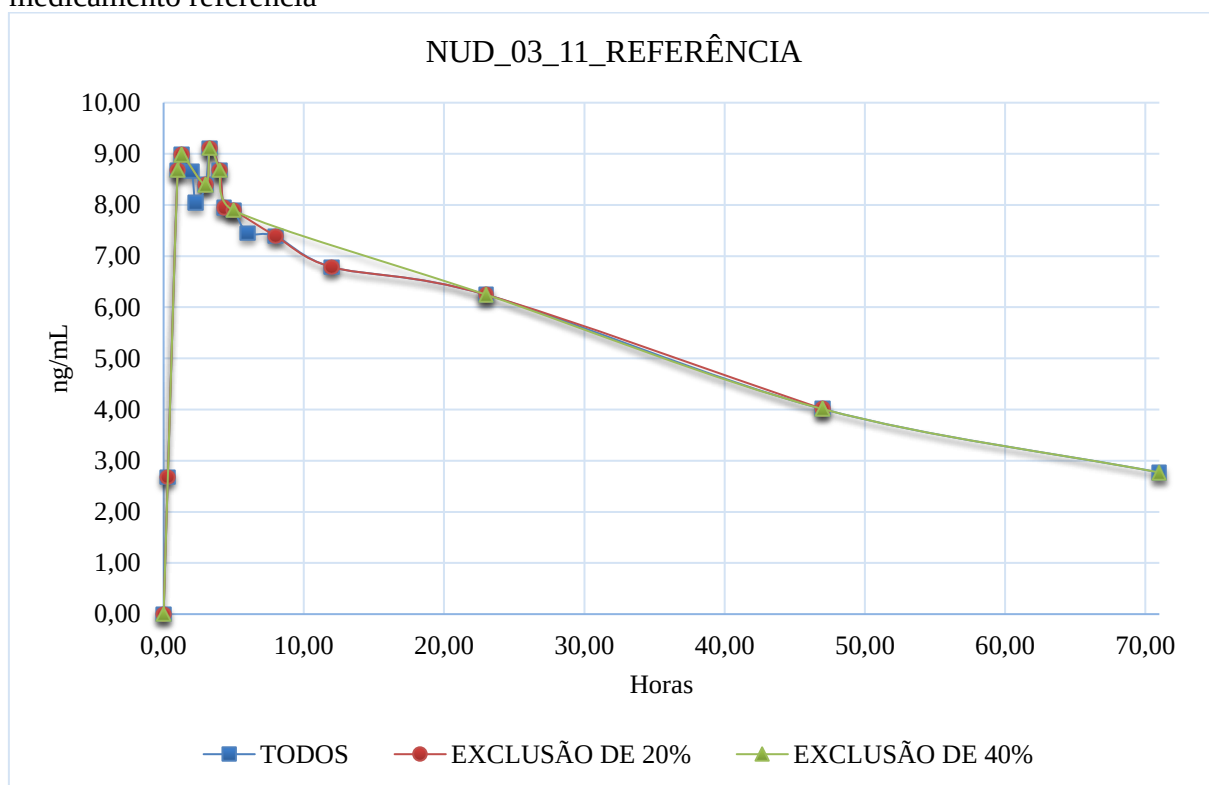


Figura 36 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste

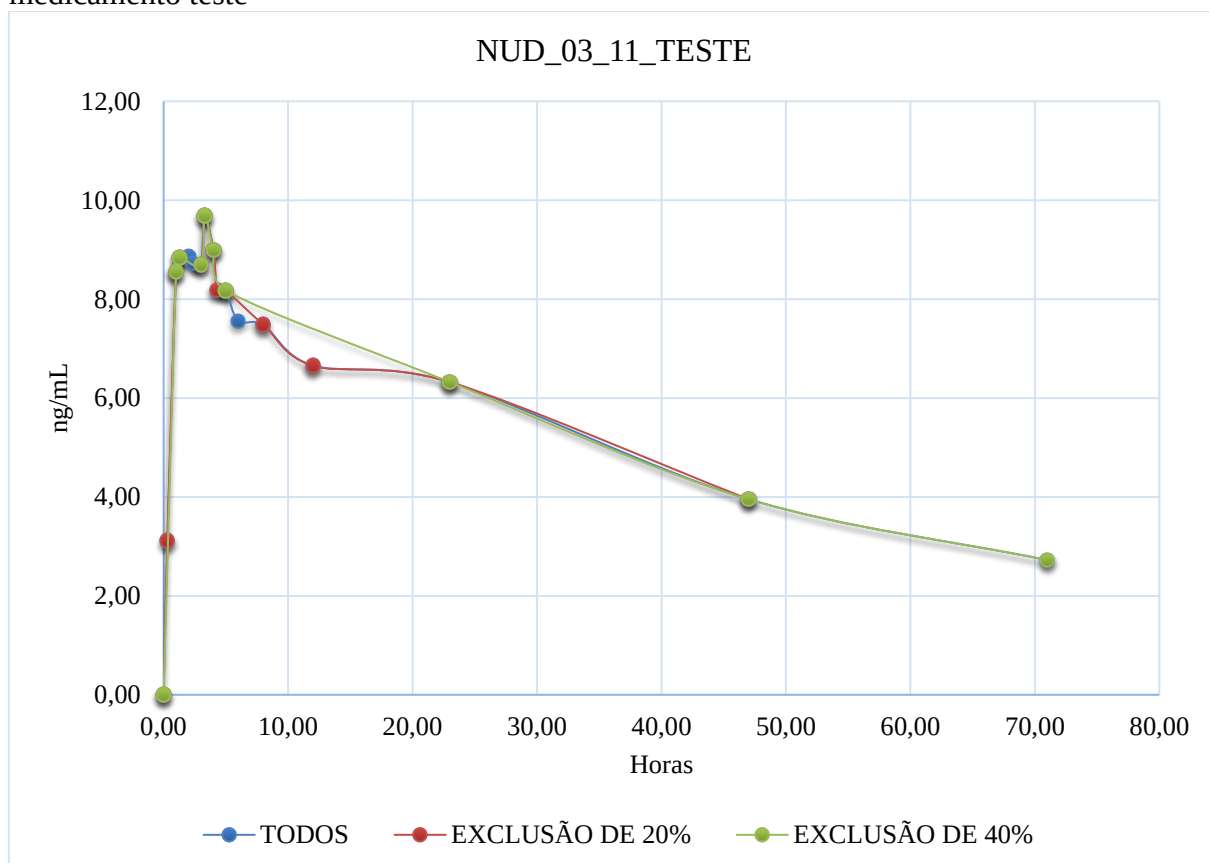


Figura 37 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência

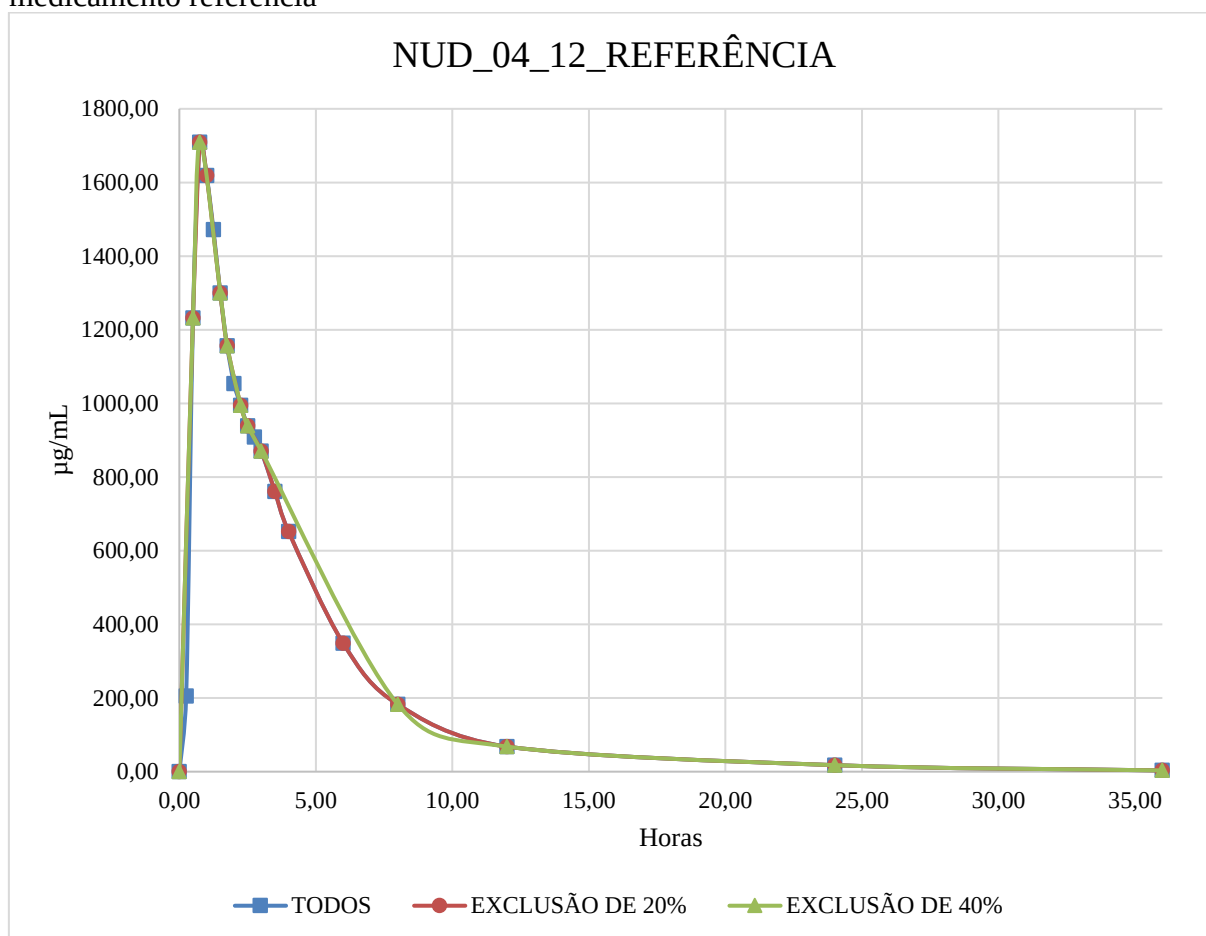


Figura 38 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste

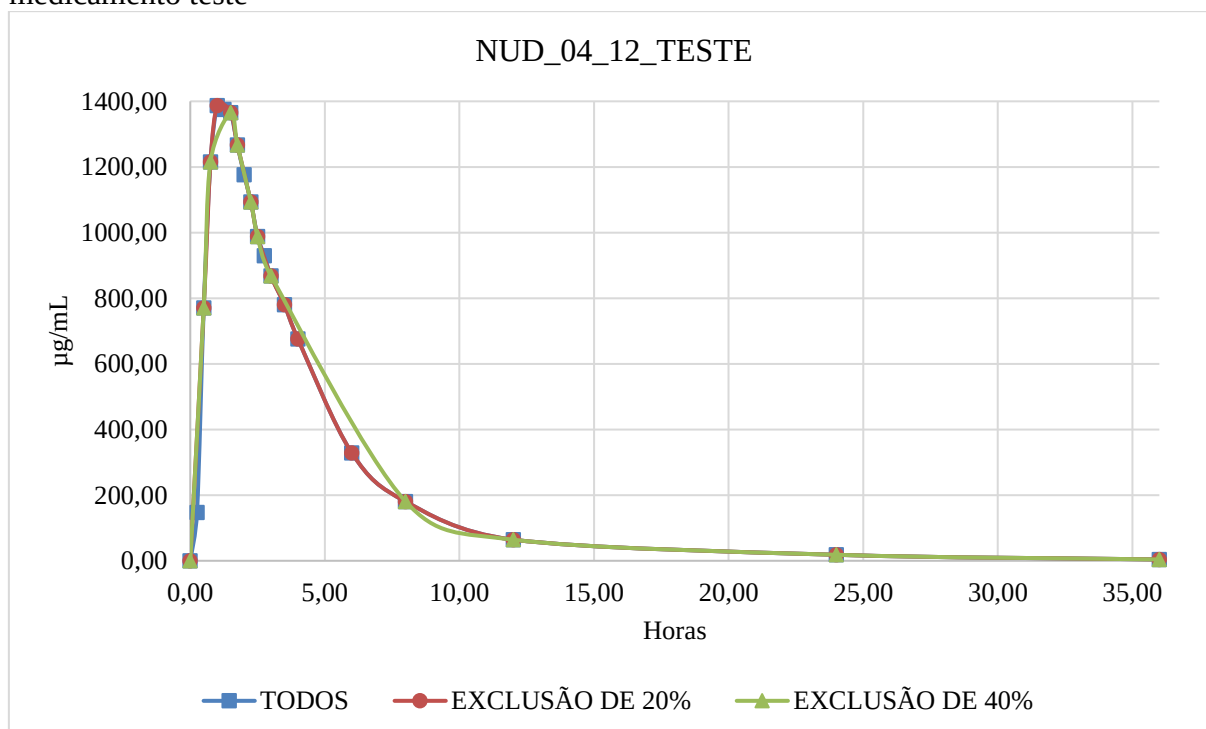


Figura 39 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência

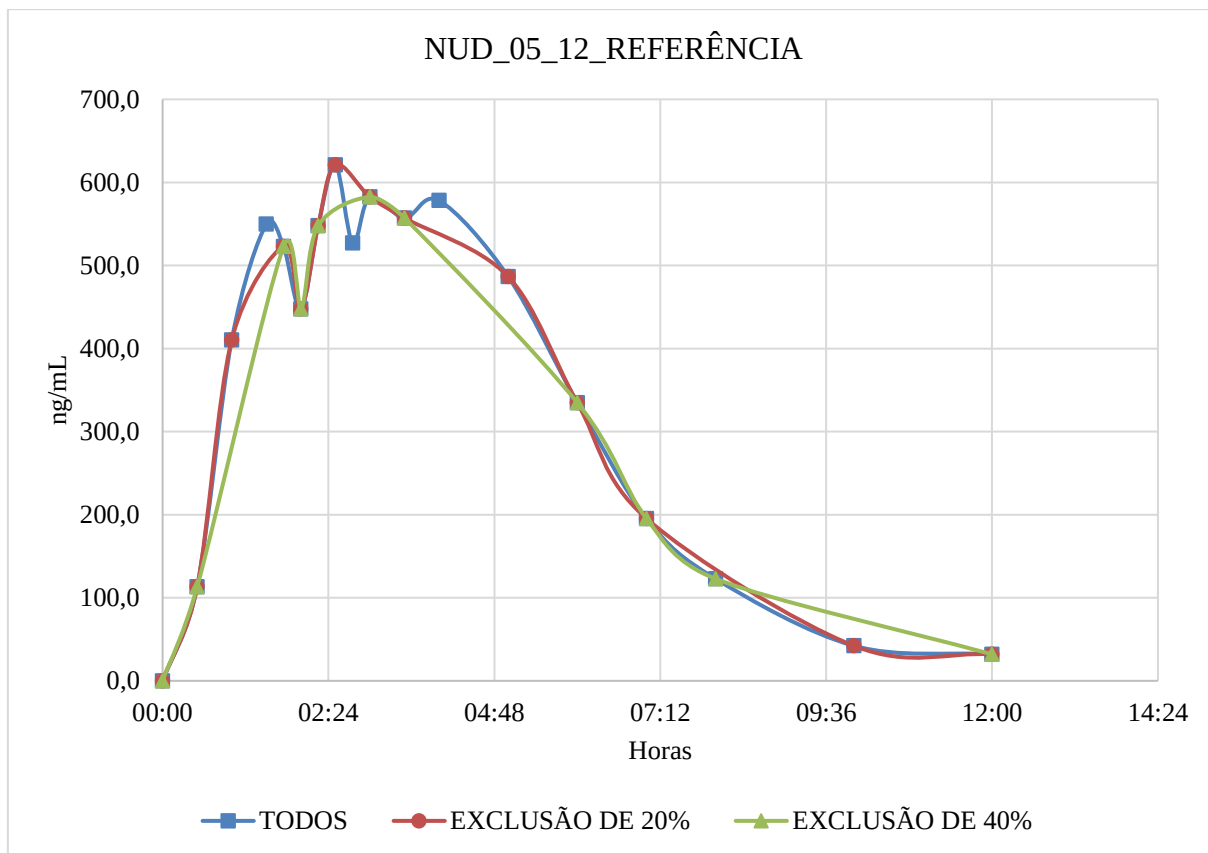


Figura 40 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste

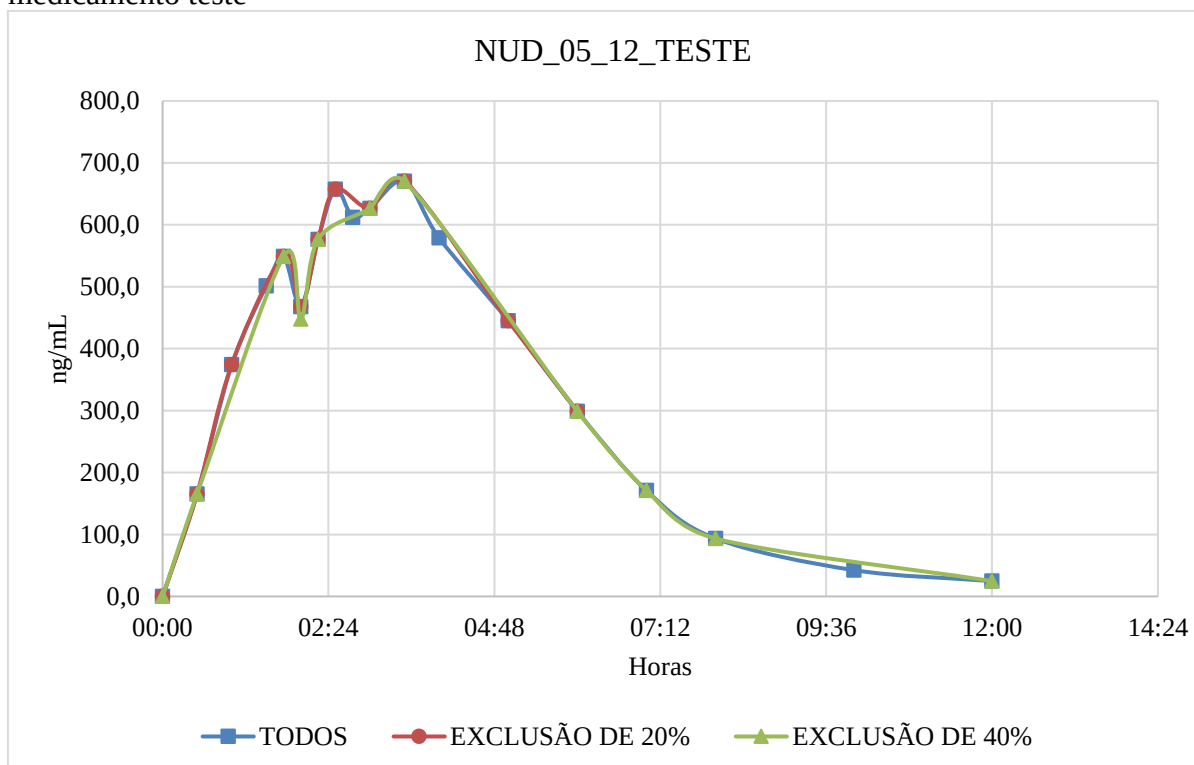


Figura 41 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência

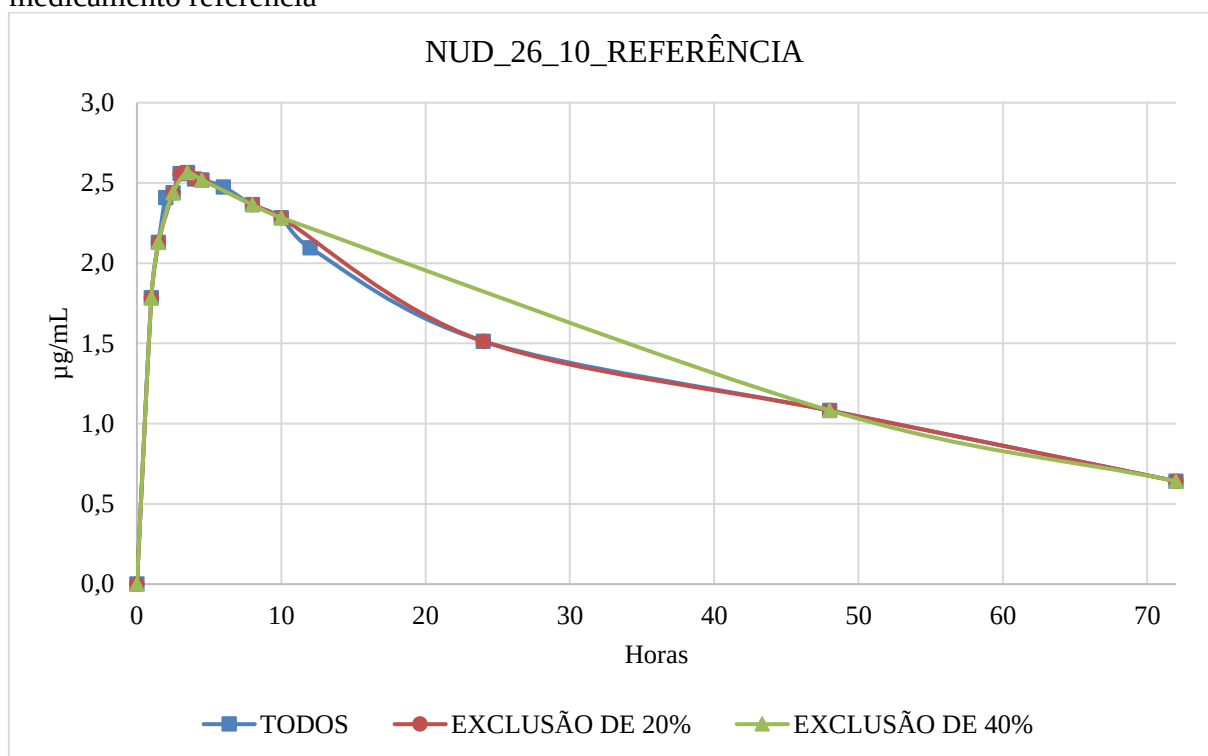


Figura 42 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste

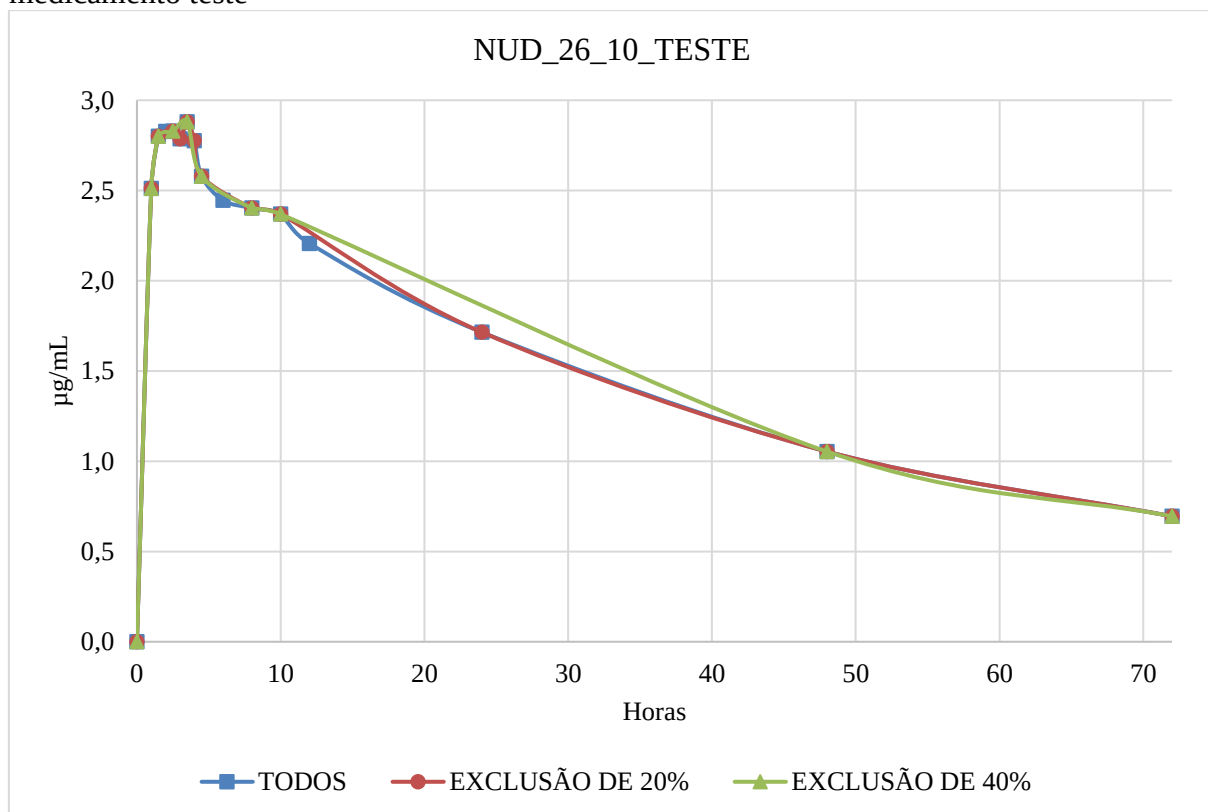


Figura 43 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência

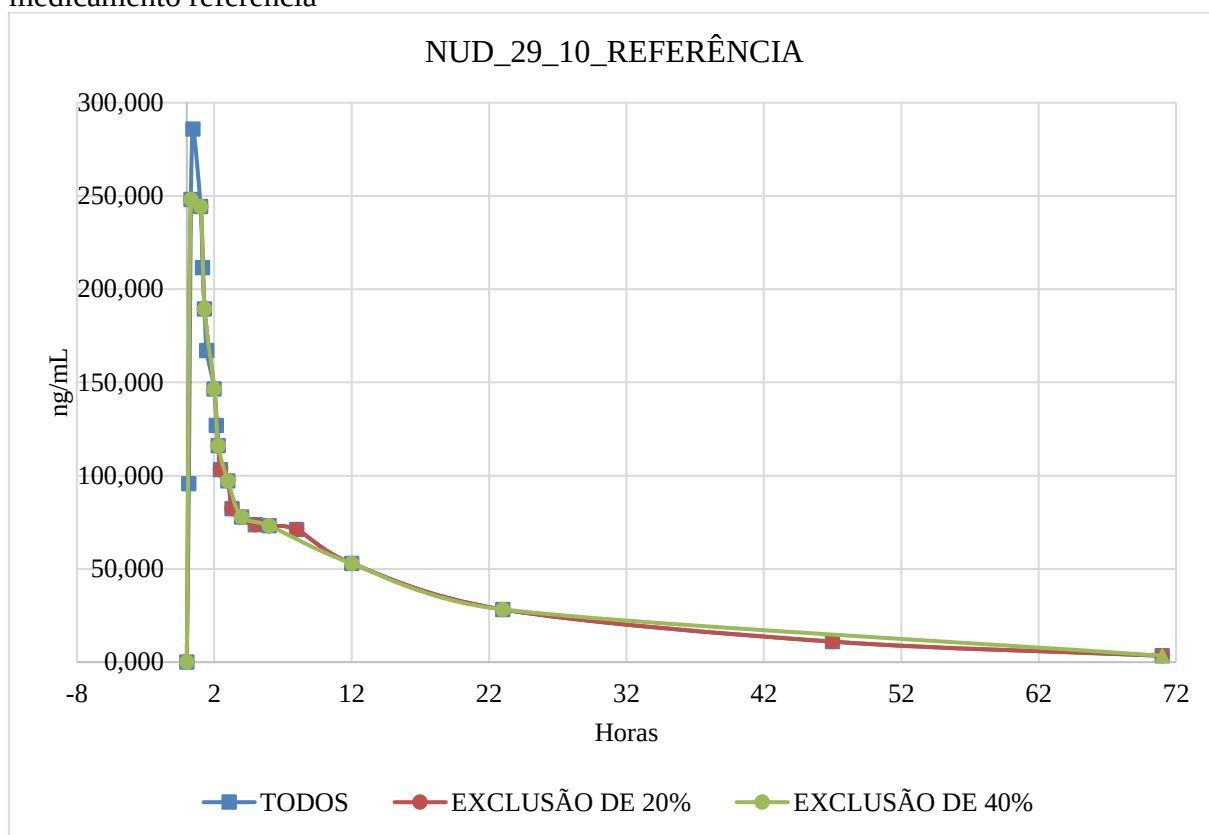


Figura 44 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste

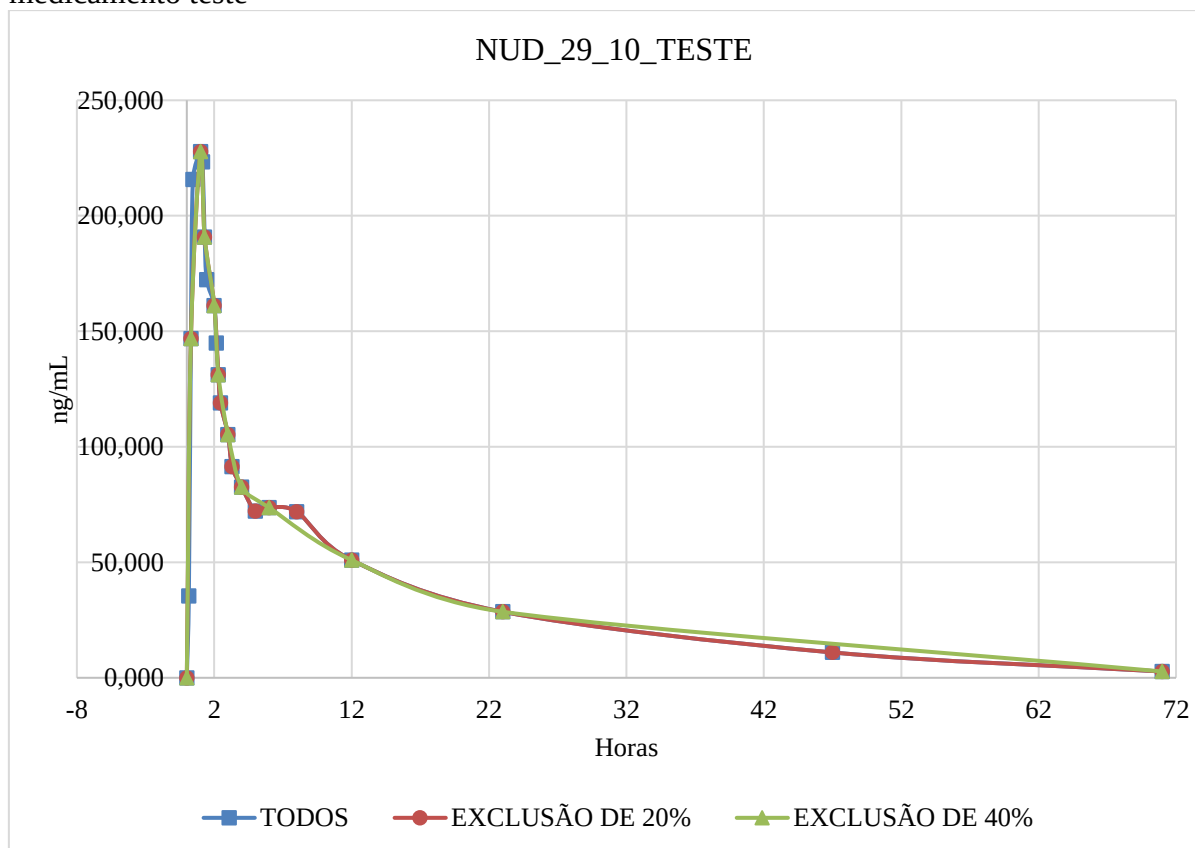


Figura 45 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência

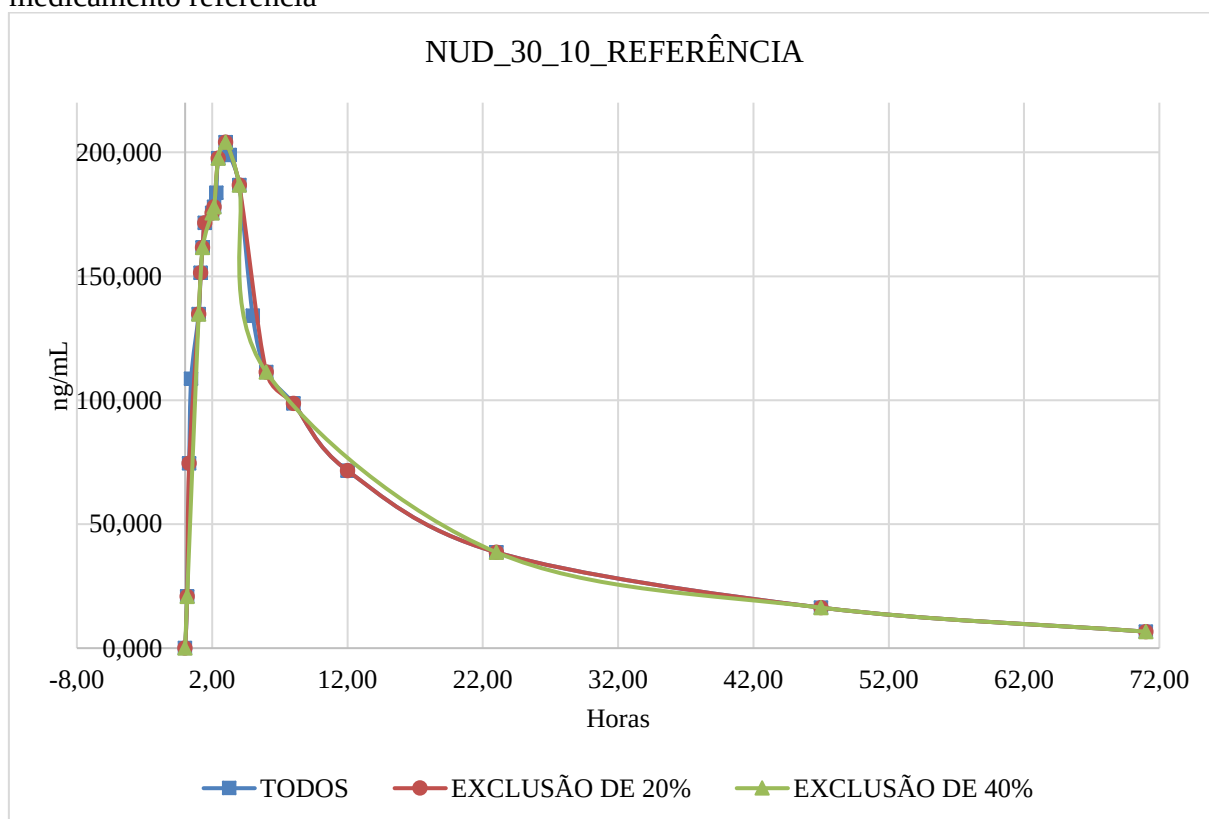


Figura 46 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste

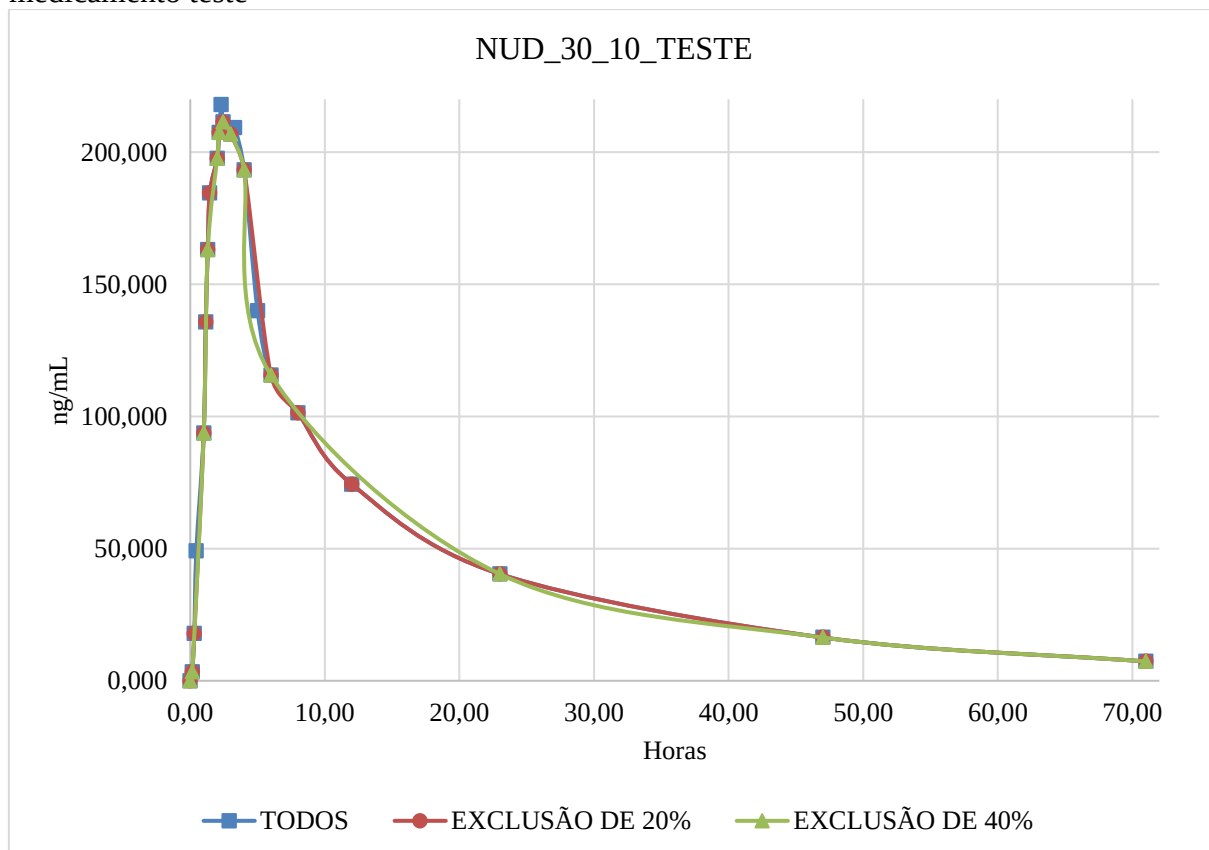


Figura 47 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência.

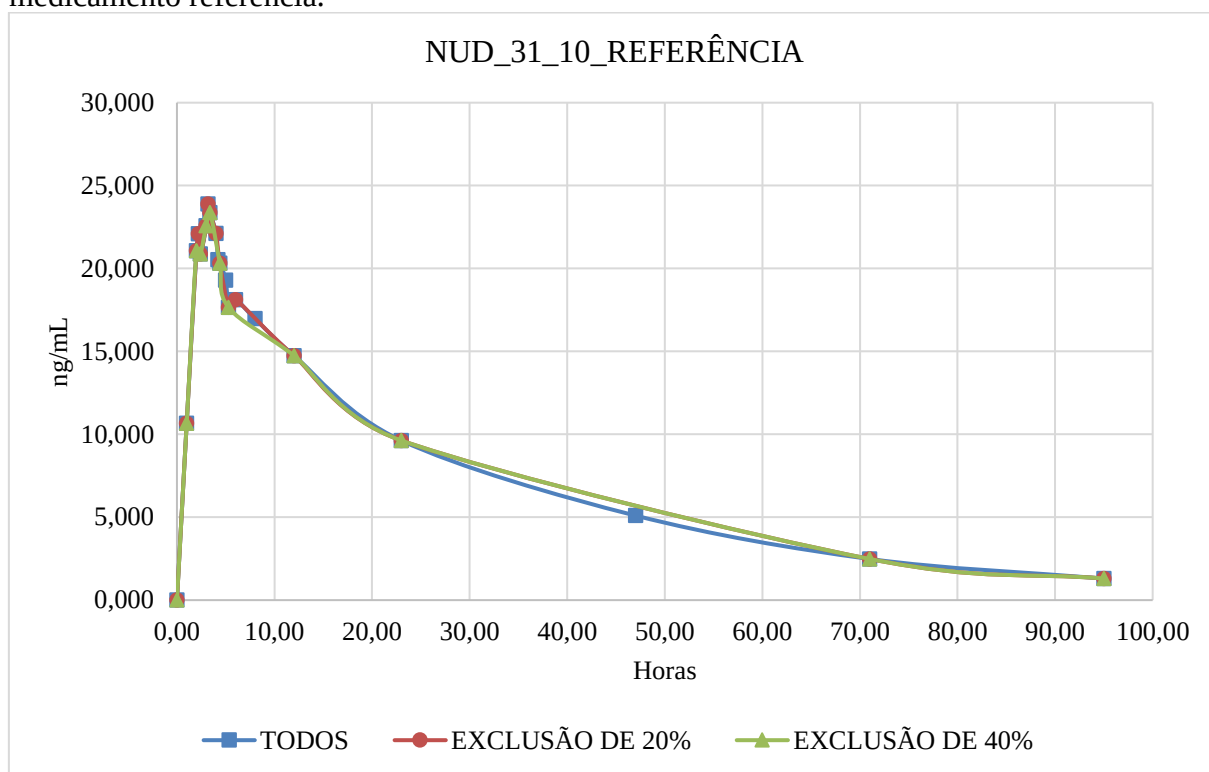


Figura 48 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.

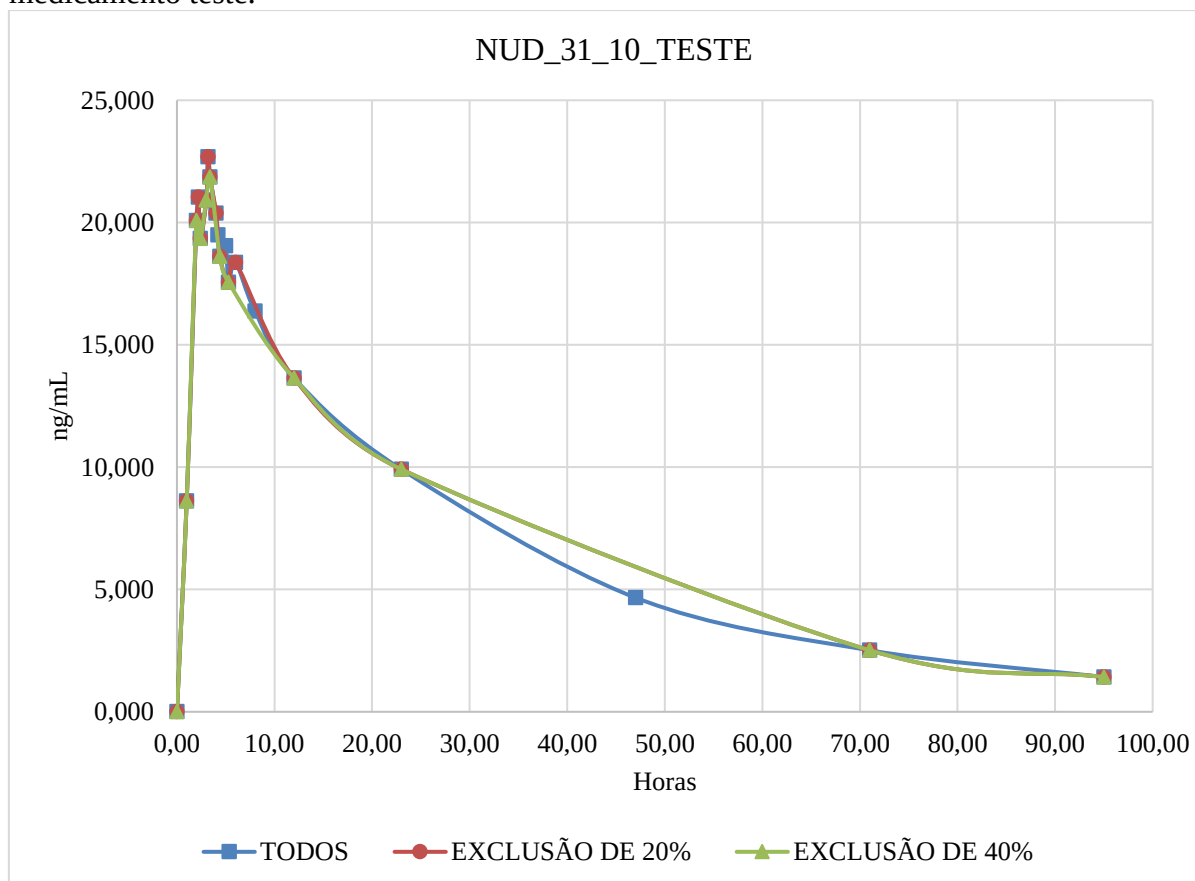


Figura 49 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência.

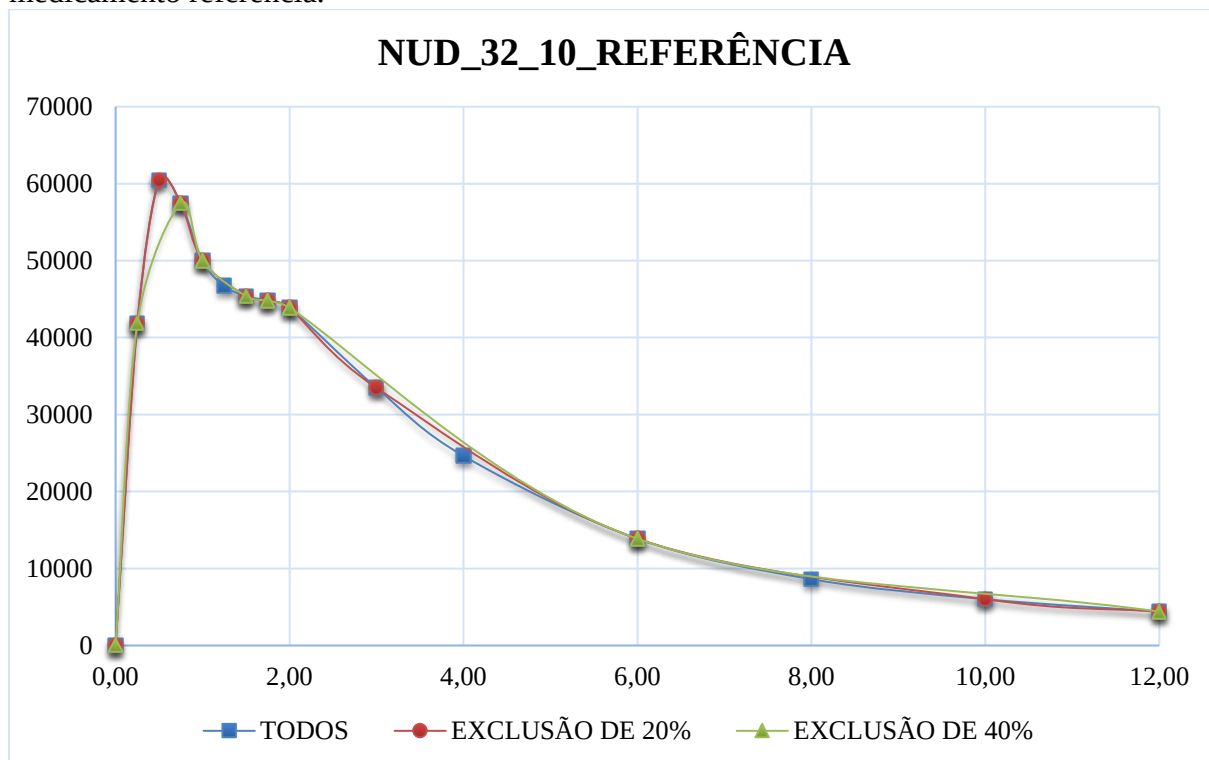


Figura 50 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.

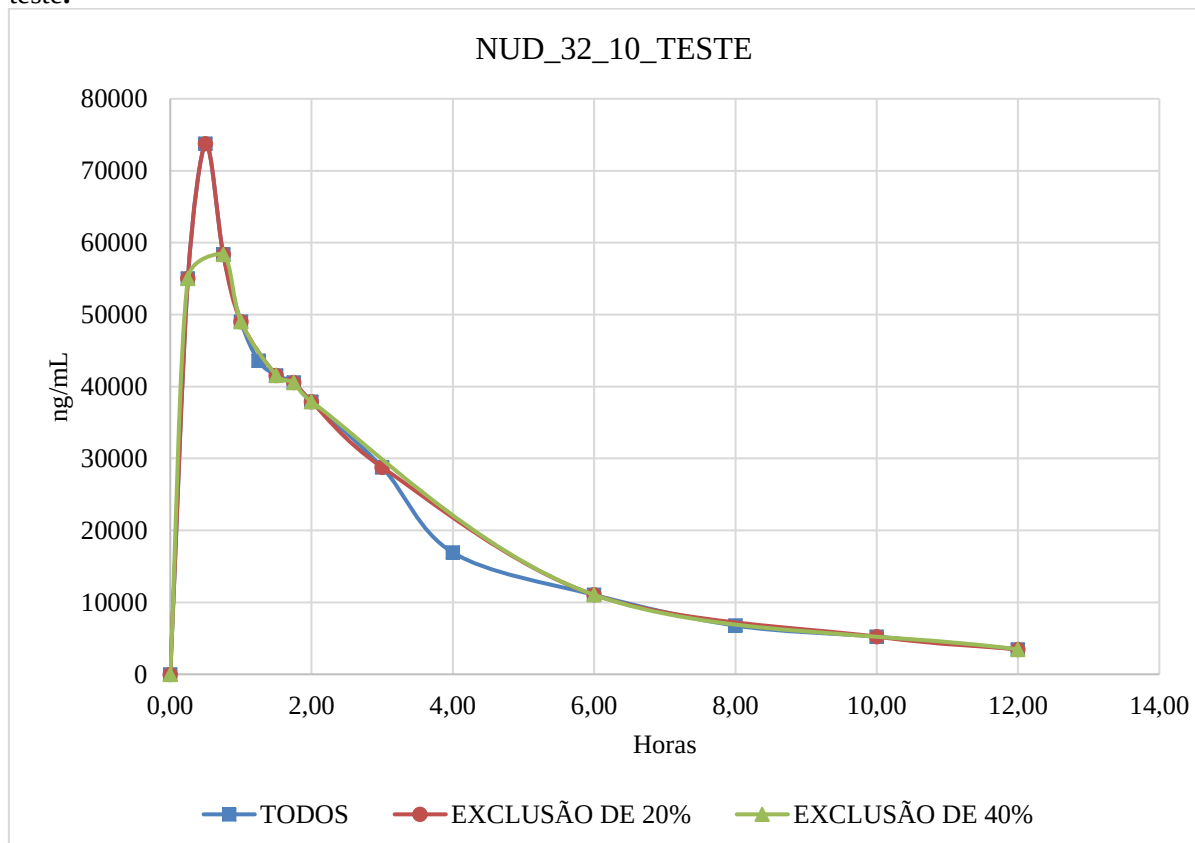


Figura 51 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento referência.

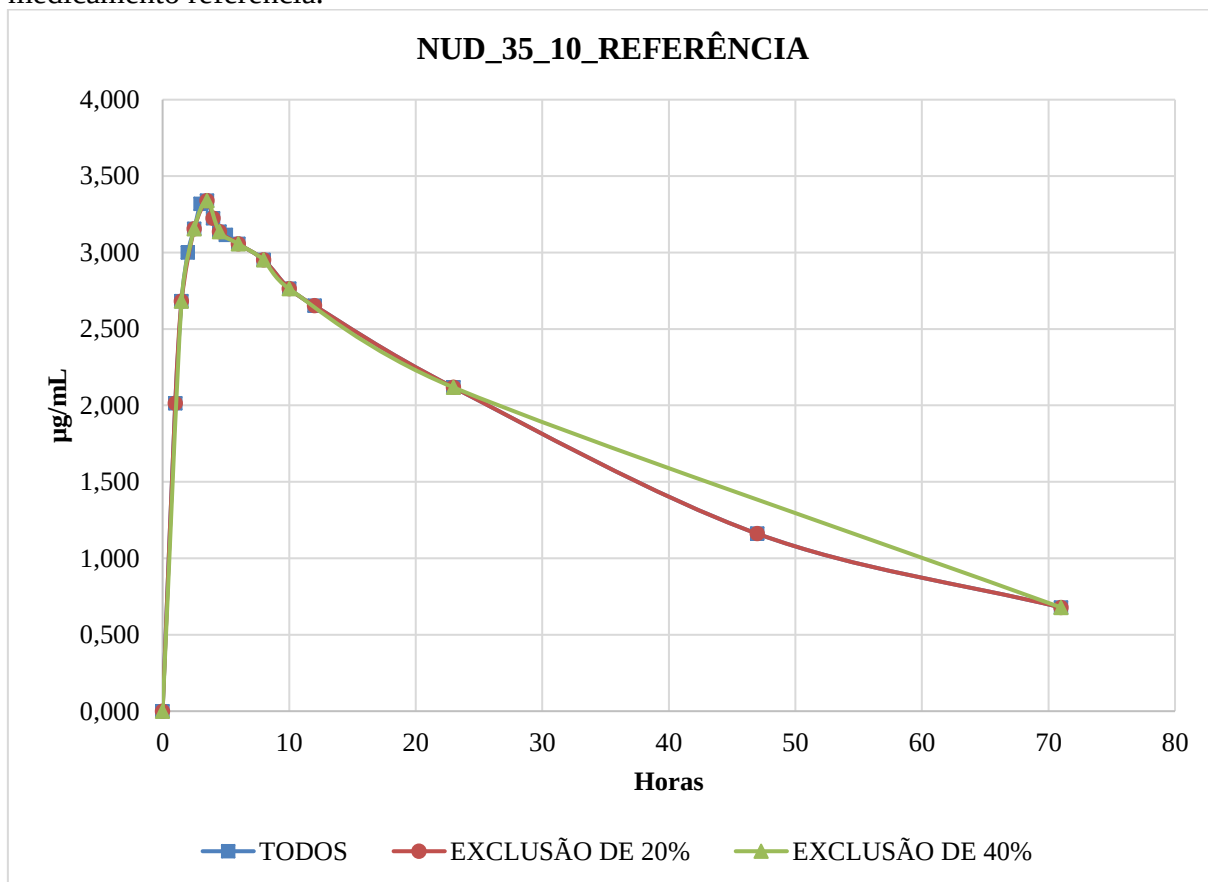


Figura 52 – Gráficos de concentração por tempo dos três cronogramas de coleta para o medicamento teste.

