UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da bioequivalência de formulações contendo
lorazepam através de método bioanalítico utilizando a
cromatografia líquida acoplada ao sistema de detecção por
espectrometria de massa

Maurício Rocha de Magalhães Sampaio

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora
Profª Drª. Valentina Porta

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Sampaio, Maurício Rocha de Magalhães
S192a Avaliação da bioequivalência de formulações contendo lorazepam
através de método bioanalítico utilizando a cromatografia líquida
acoplada ao sistema de detecção por espectrometria de massa /
Maurício Rocha de Magalhães Sampaio. -- São Paulo, 2008.
182p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Porta, Valentina

I Bioequivalência : Farmacocinética 2. Biodisponibilidade :
Farmacocinética 3. Espectrometria de massa : Química analítica
I. T. II. Porta, Valentina, orientador.

615.7F CDD

Maurício Rocha de Magalhães Sampaio

Avaliação da bioequivalência de formulações contendo
lorazepam através de método bioanalítico utilizando a
cromatografia líquida acoplada ao sistema de detecção por
espectrometria de massa

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

1

Profa. Dra. Valentina Porta
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 17 de Abril de 2008.

*Mestre não é quem sempre ensina,
mas quem de repente aprende.*

Guimarães Rosa

Dedico este trabalho
aos meus queridos pais Roberto e Jeanne que nunca
deixaram de acreditar em meu potencial.

Aos meus irmãos Janaina e Francisco e ao meus avós
Aurílio, Enaura, Domício e Zuleica pelo apoio e
incentivo aos estudos.

*Agradeço a Deus por todas as oportunidades que me
foram dadas nesta vida.*

*Pelos amigos que encontrei e reencontrei, e por todos
aqueles que em maior ou menor grau contribuíram para
o meu crescimento e aprendizado neste caminho.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a.dr^a. Valentina Porta, pela orientação, compreensão, paciência e amizade sincera. Por ter me dado a oportunidade de ter ingressado no programa de pós-graduação da melhor universidade do país e permitir com isso a minha melhor qualificação e formação profissional.

À Prof^a.dr^a. Cristina Helena dos Reis Serra, pela amizade e prestatividade em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, Prof^a.dr^a. Vladi Olga Consigliere e a Prof^a.dr^a. Silvia Santos pelo maravilhoso trabalho que conduziram nas disciplinas que ministraram durante o programa de pós-graduação.

Às minhas amigas Simone Schramm Andrade e Eunice Kazue Kano pela paciência, colaboração e condução deste trabalho e inestimável amizade.

Aos membros do BIOFAR que me acolheram de forma a me sentir um membro do grupo, Eunice Koono, Eder Benassi, Maria Valdilene, Tatiana de Oliveira e Eremita, e pela amizade e ajuda nas diversas etapas do trabalho.

Aos grandes e antigos amigos que sempre acompanharam esta etapa com proximidade, Ricardo de Oliveira Rezende, Ana Ribeiro, Paulo José da Silva, Guilherme Carrara, Juliano de Moraes e Luciana Werneck (*eu sempre soube que podia contar com o apoio de vocês*).

Aos novos amigos que fiz durante os anos de desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Amigos como Anderson, Bonato, Pedro López, Patrícia Rivas, Rodrigo Spricigo, Samanta Mourão, Valeska Martinello, Débora e Rafael Vieira. Inestimáveis pessoas e excelentes profissionais que contribuíram com o meu crescimento moral e profissional.

Aos secretários Bete e Jorge, pela atenção e dedicação.

Aos voluntários que participaram deste estudo com a devida prestatividade.

Aos membros da equipe de enfermagem, pela participação ativa durante a etapa clínica deste estudo.

À bibliotecária Leila , pela revisão das referências bibliográficas.

Ao BIOFAR, pelo financiamento que possibilitou a realização e conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho da MAGABI Pesquisas Clínicas e Farmacêuticas, pela compreensão nas minhas horas de ausência e pelo incentivo que me deram em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos de Juiz de Fora (*vocês sabem quem são*) que mesmo de longe sempre torceram e se fizeram presentes nos principais momentos.

À Michelle, a quem agradeço de todo o meu coração, e sua família pela dedicação a minha pessoa e torcida por cada etapa concluída. Muito obrigado pelas preces sinceras.

À Marcella que em um curto espaço de tempo se integrou sobre o meu trabalho mostrando interesse e empolgação que me impulsionaram para a conclusão do mesmo. Obrigado pelo carinho ^(83 266).

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	xvii
------------------	------

Lista de Figuras	xxi
------------------	-----

Lista de Quadros	xxiv
------------------	------

1. Introdução	1
----------------------	----------

2. Objetivo	7
--------------------	----------

3. Revisão da Literatura	9
---------------------------------	----------

3.1. O histórico dos medicamentos genéricos	10
---	----

3.2. O histórico da regulamentação dos medicamentos genéricos	11
---	----

3.3. A intercambialidade entre o medicamento genérico e o medicamento de referência	14
---	----

3.4. Biodisponibilidade e bioequivalência	16
---	----

3.5. Bioequivalência média individual e populacional	19
--	----

3.6. Fatores que afetam a biodisponibilidade de fármacos	20
--	----

3.6.1. Tamanho da partícula	21
-----------------------------	----

3.6.2. Forma cristalina ou amorfa	21
-----------------------------------	----

3.6.3. Estado de hidratação	22
-----------------------------	----

3.6.4. Forma farmacêutica	23
---------------------------	----

3.6.5. pH Gastrintestinal	23
3.7. Parâmetros farmacocinéticos para a avaliação da bioequivalência	23
3.8. Análise estatística, delineamento experimental e critério de aceitação para estudos de bioequivalência	25
3.8.1 O poder do teste e tamanho da amostra	29
3.9. A técnica da espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida (LC-MS/Ms) aplicada nos estudos de bioequivalência	29
3.10. Benzodiazepínicos	37
3.10.1 Lorazepam	39
3.10.1.1. Mecanismos de ação	40
3.10.1.2. Indicações e usos	40
3.10.1.3. Farmacocinética	41
3.10.1.4. Estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de formas farmacêuticas contendo lorazepam	43
3.10.1.5. Aspectos analíticos para quantificação de lorazepam em matrizes biológicas	45
4. Materiais e Métodos	46
4.1. Material	47

4.1.1. Amostras	47
4.1.2. Substâncias químicas de referência	48
4.1.3. Solventes, reagentes, materiais de consumo e vidraria	48
4.1.4. Equipamentos	49
4.2. Métodos	50
4.2.1. Método bioanalítico para quantificação de lorazepam em plasma humano	50
4.2.1.1. Procedimento de purificação das amostras	51
4.2.1.2. Condições analíticas para quantificação de lorazepam em plasma humano	54
4.2.1.3. Quantificação de lorazepam nas amostras de plasma humano	55
4.2.1.3.1. Preparação das amostras de plasma padrão e de controle de qualidade	56
4.2.1.3.2. Preparação das amostras de plasma padrão e da curva de calibração	56
4.2.1.3.3. Preparação de amostras de plasma de controle de qualidade	57
4.2.1.4. Validação do método bioanalítico para quantificação de lorazepam em plasma humano	58
4.2.1.4.1. Especificidade	58

4.2.1.4.2. Recuperação	59
4.2.1.4.3. Limite inferior de quantificação (LIQ) e limite de detecção (LD)	60
4.2.1.4.4. Limite superior de quantificação (LSQ)	60
4.2.1.4.5. Linearidade	60
4.2.1.4.6. Precisão	61
4.2.1.4.7. Exatidão	62
4.2.1.4.8. Estabilidade	63
4.2.1.4.9. Estabilidade de curta duração	63
4.2.1.4.10. Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento	64
4.2.1.4.11. Estabilidade no tempo e condições de análise (pós-processamento)	64
4.2.1.4.12. Estabilidade de longa duração	64
4.2.1.4.13. Estabilidade de soluções padrão	65
4.2.1.5 Avaliação da bioequivalência entre os medicamentos teste e referência	66
4.2.1.5.1 Casuística	66
4.2.1.5.2 Procedimento do ensaio de bioequivalência	69
4.2.1.5.3 Coleta e armazenamento de amostras	71

4.2.1.5.4 Quantificação de lorazepam nas amostras de plasma dos voluntários	71
4.2.1.5.5 Avaliação da bioequivalência entre os medicamentos teste e referência	71
4.2.1.5.6 Análise estatística aplicada ao ensaio de bioequivalência	73
5. Resultados	74
5.1. Método bioanalítico para quantificação de lorazepam em plasma humano	75
5.1.1.Desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação de lorazepam em plasma humano	75
5.1.2.Validação do método bioanalítico para quantificação de lorazepam em plasma humano	79
5.1.2.1. Especificidade	79
5.1.2.2. Recuperação	83
5.1.2.3. Linearidade	84
5.1.2.4. Limite inferior de quantificação (LIQ) e limite de detecção(LD)	87
5.1.2.5. Precisão	88
5.1.2.6. Exatidão	88
5.1.2.7. Estabilidade	89

5.1.2.7.1. Estabilidade de curta duração	89
5.1.2.7.2. Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento	89
5.1.2.7.3. Estabilidade no tempo e condições de análise (pósprocessamento)	91
5.1.2.7.4. Estabilidade de longa duração	92
5.1.2.7.5. Estabilidade de soluções padrão	93
5.1.8. Avaliação da bioequivalência entre os medicamentos teste e referência de lorazepam	93
5.1.8.1. Resultados obtidos do ensaio clínico de bioequivalência	93
5.1.8.2. Desvios do protocolo clínico de bioequivalência	95
5.1.8.3. Determinação das concentrações plasmáticas de lorazepam após administração dos produtos teste e referência	96
5.1.8.4. Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração dos produtos teste e referência	99
5.1.8.5. Avaliação da bioequivalência entre os medicamentos	102
6. Discussão	105
7. Conclusões	114
8. Anexos	116

Anexo A	117
Anexo B	119
Anexo C	121
Anexo D	141
9. Referências Bibliográficas	144
10. Resumo	156
9. Abstract	158

Tabela 7	Estabilidade de lorazepam em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetida a um ciclo de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações.	89
Tabela 8	Estabilidade de lorazepam em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetida a um ciclo de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações.	90
Tabela 9:	Estabilidade de lorazepam em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetida a dois ciclos de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações	90
Tabela 10:	Estabilidade de lorazepam em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações	91
Tabela 11:	Estabilidade de lorazepam em amostras de plasma analisadas 24 horas após o procedimento de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações.	92
Tabela 12:	Resultados da estabilidade de longa duração em amostras de controle de qualidade armazenadas por 235 dias a temperatura de -20°C.	92

Tabela 13: Resultados da estabilidade das soluções padrão de lorazepam e bromazepam em água e metanol na proporção 90:10 (v/v), utilizadas para preparação das curvas de calibração.	93
Tabela 14: Resumo dos sintomas registrados durante a internação para execução do ensaio clínico fase 1 de bioequivalência de comprimidos contendo lorazepam.	94
Tabela 15: Resumo dos sintomas registrados durante a internação para execução do ensaio clínico fase 2 de bioequivalência de comprimidos contendo lorazepam.	95
Tabela 16: Concentrações plasmáticas médias, máximas e mínimas de lorazepam obtidas após administração do produto referência (Lorax [®] , lote 27692) a 23 voluntários sadios	97
Tabela 17: Concentrações plasmáticas médias, máximas e mínimas de lorazepam obtidas após administração do produto teste (Lorazepam Teuto lote 2332002) a 23 voluntários sadios	98
Tabela 18: Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração do produto referência (Lorax [®] , lote 27692) a 23 voluntários sadios.	100
Tabela 19: Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração do produto teste (Lorazepam Teuto lote 2332002) a 23 voluntários sadios. DP = referência (Lorax [®] , lote 27692) a 23 voluntários sadios.	101

Tabela 20: Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros C_{max} , AUC_{0-t} e AUC_{0-inf} , em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos referência (Lorax [®] , lote 27692) e teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) a 23 voluntários sadios.	102
Tabela 21: Intervalos de confiança 90% (IC 90 %) para as relações entre os parâmetros C_{max} , AUC_{0-t} e AUC_{0-inf} em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) e referência (Lorax [®] , lote 27692) a 23 voluntários sadios	103
Tabela 22: Poder estatístico dos testes utilizados para determinação do intervalo de confiança 90% (IC 90%) das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , AUC_{0-t} e AUC_{0-inf} dos produtos teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) e referência (Lorax [®] , lote 27692) transformados logaritmicamente.	103
Tabela 23: Coeficientes de variação intra-individual das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ dos produtos teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) e referência (Lorax [®] , lote 27692) transformados logaritmicamente.	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Delineamento cruzado 2x2 para dois medicamentos (R= referência ou T= teste)	26
Figura 2	Representação esquemática dos componentes de um espectrômetro de massa tipo triplo-quadrupolo	34
Figura 3	Representação da técnica de ionização do analito por electrospray	36
Figura 4	Estruturas químicas do lorazepam e bromazepam	39
Figura 5	Reação química de síntese do lorazepam	39
Figura 6	Fluxograma referente ao procedimento de purificação de amostras destinadas a análise cromatográfica.	53
Figura 7	Espectro de massas do lorazepam obtido pela ionização em modo positivo.	76
Figura 8	Espectro de massas do bromazepam obtido pela ionização em modo positivo.	76
Figura 9	Modelo de ionização e fragmentação proposto para a estrutura precursora de lorazepam obtido em modo positivo.	77

Figura 10	Modelo de ionização e fragmentação proposto para a estrutura precursora de bromazepam obtido em modo positivo.	78
Figura 11	Espectro de massas da fragmentação da estrutura precursora do lorazepam obtido em modo positivo.	78
Figura 12	Espectro de massas da fragmentação da estrutura precursora do bromazepam obtido em modo positivo.	79
Figura 13	Cromatogramas MRM do analito lorazepam (L), na concentração de 1ng/mL, com tempo de retenção de 5,2 minutos e do padrão interno bromazepam (B) com tempo de retenção de 4,7 minutos.	81
Figura 14	Cromatogramas MRM da amostra de plasma branco humano.	81
Figura 15	Cromatograma MRM da amostra de plasma branco adicionado de padrão interno (PI).	82
Figura 16	Cromatograma MRM da amostra de plasma branco hemolisado de voluntário sadio.	82
Figura 17:	Cromatograma MRM da amostra de plasma branco lipêmico de voluntário sadio.	83
Figura 18:	Curva de calibração de lorazepam em plasma obtida por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa.	85

Figura 19: Cromatograma do analito lorazepam, na concentração correspondente ao limite de quantificação inferior (LIQ) de 0,50 ng/mL.

87

Figura 20: Curvas médias das concentrações plasmáticas versus tempo após administração dos produtos referência (Lorax[®], lote 27692) e teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) a 23 voluntários sadios. As barras verticais representam o erro padrão da média.

99

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Obtenção de amostras de plasma padrão de lorazepam da curva de calibração.	57
Quadro 2: Obtenção de amostras de plasma de controle de qualidade de lorazepam da curva de calibração.	57

1. INTRODUÇÃO

Na última década, a evolução dos aspectos técnicos da regulamentação brasileira na área de medicamentos, tendo como bases os princípios científicos, foi inquestionável. A implementação dos medicamentos genéricos tem colaborado para o aprimoramento da fabricação e garantia de qualidade dos medicamentos no país, introduzindo conceitos tais como equivalência farmacêutica, biodisponibilidade e bioequivalência (Storpirtis, 2004).

A intercambialidade entre o genérico e seu respectivo medicamento de referência baseia-se na equivalência terapêutica entre os mesmos, geralmente assegurada pela comprovação da equivalência farmacêutica, da bioequivalência e das boas práticas de fabricação e controle de qualidade (Storpirtis, 2004).

De acordo com a legislação brasileira vigente, são considerados equivalentes farmacêuticos os medicamentos que contêm o mesmo fármaco, isto é, mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos. Devem cumprir com as mesmas especificações atualizadas da Farmacopéia Brasileira e, na ausência destas, com as de outros códigos autorizados pela legislação vigente ou, ainda, com outros padrões aplicáveis de qualidade, relacionados à identidade, dosagem, pureza, potência, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução, quando for o caso (Brasil, 2007a). A equivalência farmacêutica, apesar de não ser um fator conclusivo, é considerada um pré-requisito para a comprovação de bioequivalência entre medicamentos analisados.

O conceito de biodisponibilidade é definido como a quantidade e velocidade de absorção do fármaco, liberado a partir de sua forma farmacêutica, e que se encontra disponível no sítio de ação. Considerando-se que, para ação sistêmica, os fármacos na corrente sanguínea encontram-se em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade corresponde à quantidade e velocidade com a qual o fármaco atinge a corrente circulatória (Consiglieri & Storpirtis, 2000).

O estudo comparativo das biodisponibilidades de dois medicamentos que possuem o mesmo fármaco, na mesma indicação terapêutica e que são administrados pela mesma via extra vascular estando, portanto, sujeitos ao processo de absorção, é realizado a partir de um ensaio de bioequivalência (Kano, 2002). Portanto, duas formulações farmacêuticas são ditas bioequivalentes quando, ao serem administradas ao mesmo indivíduo, nas mesmas condições experimentais e na mesma dose molar, não apresentarem diferenças significativas em relação a biodisponibilidade (Porta, 2005).

Assim, a determinação da bioequivalência apresenta, como principal propósito, obter evidências de que uma formulação teste não apresenta diferenças, do ponto de vista farmacocinético, de uma formulação referência (Brasil, 2002a).

A maioria dos estudos de bioequivalência está sendo aplicada a fármacos em formas farmacêuticas sólidas para uso oral e com efeitos sistêmicos. A ênfase nessa direção deve-se principalmente ao fato de que estas formas são comumente mais prescritas e fabricadas de modo mais complexo devido ao maior número de etapas no processo produtivo, que podem influenciar na liberação do ativo para o organismo, como por exemplo na etapa de mistura do(s) ativo(s) com os demais excipientes, na granulação que tem um ponto específico de granulagem, na tamização que determina o tamanho do grânulo que será comprimido, na secagem, na compressão e no revestimento que permite que determinado fármaco de ação entérica atue em seu local de ação sem sofrer a ação do suco gástrico. Estas etapas aplicadas na produção de uma forma sólida são necessárias para garantir que o fármaco esteja presente na forma farmacêutica de maneira homogênea e que esta forma seja capaz de liberá-lo em velocidade e quantidade adequada para ser absorvido pelo organismo. O processo de fabricação de uma forma farmacêutica de uso oral, deve assegurar que o princípio ativo esteja distribuído em cada medicamento na dose correta e que esse permita a disponibilização do mesmo assegurando a eficácia e segurança após administração. As formas farmacêuticas como por exemplo soluções, suspensões e emulsões apesar

de serem menos prescritas são de fácil administração quando comparadas com as formas sólidas. Permitem que o fármaco esteja disperso ou dissolvido no meio líquido, o que facilita a sua disponibilização para o organismo a fim de ser absorvido. Contudo, a estabilidade da maioria dos ativos é melhor assegurada quando formuladas em formas sólidas orais, na qual o meio líquido não se encontra presente no produto final. Deve-se entender portanto que uma forma farmacêutica sólida antes de disponibilizar o(s) ativo(s) para ser(em) absorvido(s), deve primeiramente ser desintegrada e posteriormente ter seu(s) ativo(s) dissolvido(s) nos fluidos biológicos. Contudo, uma forma farmacêutica sólida apesar de ser rapidamente fragmentada em partículas menores, podem estas não liberar o fármaco totalmente ou na velocidade adequada quando apresentadas sob a forma cristalina, que é menos solúvel do que a forma amorfa que é mais solúvel. Portanto, as formas de uso oral são particularmente propensas a variações na biodisponibilidade, ocasionando então a bioinequivalência quando comparadas ao produto referência (Ansel & Popovich, 2000).

Estas variações podem ocorrer em função de diferenças de dissolução, que pode ser afetada significativamente tanto pelas características inerentes ao próprio fármaco bem como pela presença de excipientes que favorecem ou dificultam a dissolução (Gibaldi, 1991).

A determinação da bioequivalência entre medicamentos pode ser feita de diversas maneiras. Entretanto, o FDA - *Food and Drug Administration* - recomenda a determinação quantitativa do fármaco e/ou seu(s) metabólito(s) em fluidos corporais (sangue total e plasma) em função do tempo. (United States, 2001).

O desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, exatos e precisos para determinação dos princípios ativos dos medicamentos em amostras biológicas, representou um avanço notável na quantificação dos processos de absorção. No Brasil, desde 1999 são realizados estudos de bioequivalência, na qual pode ser avaliada a quantidade do fármaco que penetra na circulação sanguínea através da determinação da área sob a curva (ASC), e a velocidade em que ocorre esse processo, fatores

determinantes na resposta terapêutica ao se administrar um medicamento (Alarcon, 2004).

No Brasil a RE nº. 899, de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003b), apresenta os parâmetros a serem considerados durante o desenvolvimento e validação de procedimentos bioanalíticos a fim de que o método, por meio de estudos experimentais, atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados.

De acordo com a lista de medicamentos genéricos fornecida pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – e publicada no Diário Oficial da União em 09/04/2007 estão registradas e são comercializadas no Brasil, por laboratórios farmacêuticos diferentes, oito apresentações genéricas, na forma farmacêutica comprimido, do fármaco lorazepam na concentração de 2 mg (Brasil, 2007b).

Este fármaco é um membro da classe dos benzodiazepínicos utilizado como ansiolítico, miorrelaxante e anticonvulsivante. Após administração oral é prontamente absorvido com biodisponibilidade absoluta de 90 a 95%. Liga-se moderadamente às proteínas plasmáticas (65%) e possui meia-vida média de eliminação de 15 horas. (Guerra et al., 2001; Lacy, 2005).

Os níveis de concentração plasmática de lorazepam são baixos, da ordem de ng/mL (Zhu & Luo, 2005). Devido a este fato, é necessário o uso de métodos de quantificação com elevada sensibilidade para quantificação deste fármaco em amostras de plasma. Vários métodos bioanalíticos foram descritos para a quantificação do lorazepam em plasma humano. Dentre eles estão incluídos cromatografia gasosa (GC) acoplada a espectrômetro de massas (GC - MS) (Fitzgerald et al., 1993; Needleman & Porvaznik, 1995), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta (LC - UV) (Muchohi et al., 2005) e LC – MS (Essien et al., 1996; Matz & Hill, 2002). Embora estes métodos apresentem resultados satisfatórios, a necessidade de se dispor de um método de alta sensibilidade e

especificidade é fator determinante para assegurar a confiabilidade dos resultados.

O cromatógrafo líquido acoplado ao sistema seqüencial de espectrometria de massas (LC - MS/MS) (Zeng et al., 2002; Chen et al., 2002) tem se tornado uma das mais importantes ferramentas para estudos bioanalíticos, pois este sistema oferece não apenas uma elevada sensibilidade e uma extraordinária seletividade, mas também um baixo ruído de fundo causado pelas matrizes biológicas (Zhu & Luo, 2005).

Sendo assim é necessário, através da utilização de um método bioanalítico altamente específico e sensível por LC – MS/MS e capaz de quantificar baixos níveis de concentração de lorazepam em amostras de plasma, a realização de um ensaio de bioequivalência que avalie a diferença de biodisponibilidade de formulações distintas de lorazepam desenvolvidas por diferentes fabricantes.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo realizar ensaio de bioequivalência entre comprimidos de lorazepam de dois diferentes fabricantes através da determinação da concentração deste fármaco em plasma de voluntários saudáveis.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar método bioanalítico, para quantificação de lorazepam em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC – MS/MS).
- Quantificar o lorazepam em plasma de voluntários que receberam esse fármaco em estudo de bioequivalência com delineamento cruzado 2 x 2.
- Verificar se existem diferenças estatísticas entre os valores de biodisponibilidade das duas formulações e se essas diferenças conferem a bioequivalência ou a bioinequivalência ao estudo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O HISTÓRICO DOS MEDICAMENTOS GENÉRICOS

A palavra genérico tem origem da palavra latina “*genus*” que significa pertencer a uma “classe geral” (Bueno, 2005).

No âmbito farmacêutico, a denominação genérica refere-se ao nome químico do fármaco ou princípio farmacologicamente ativo. Essa denominação, quando aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é chamada de Denominação Comum Brasileira (DCB) e quando recomendada pela organização Mundial de Saúde, é chamada de Denominação Comum Internacional (DCI) (Brasil, 1999a; Bueno, 2005).

O medicamento genérico é definido como um medicamento similar a um produto de referência ou inovador que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela DCB ou, na sua ausência, pela DCI (Brasil, 1999a).

Medicamento de referência ou produto inovador é aquele registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro (Brasil, 1999a).

Na Europa a terminologia “essencialmente similar” é também utilizada para definir medicamento genérico. Sendo assim, um medicamento é considerado essencialmente similar ao medicamento de referência se possuir o mesmo princípio ativo, na mesma composição qualitativa e quantitativa, com a mesma forma farmacêutica e for bioequivalente ao medicamento de referência. Para formas farmacêuticas de liberação imediata, alternativas farmacêuticas (cápsulas e comprimidos) podem ser definidas como essencialmente similares (EMA, 2002).

Os medicamentos genéricos surgiram inicialmente nos países onde existiam leis de patentes para medicamentos. Nestes países, como por exemplo: Inglaterra, Estados Unidos, Canadá e Alemanha, os genéricos representam mais de 40% do mercado de medicamentos. Na América Latina este processo é mais recente devido ao fato de a maior parte dos países não incluírem patentes de medicamentos em suas legislações até 1994, quando foi promulgada a Ata Final que Incorpora os Resultados da Rodada Uruguai de Negociações Comerciais Multilaterais do GATT (conhecido pelo acrônimo TRIPs) na Organização Mundial do Comércio (OMC) (OPAS, 2003).

Na América Latina, o Brasil foi o primeiro a possuir uma política de medicamentos genéricos (Bueno, 2005). A Argentina vem reformulando as legislações que regulam o setor de genérico no país. Estas dizem respeito à promoção da utilização de medicamentos por seu nome genérico (Associação dos Laboratórios Farmacêuticos Nacionais, 2005).

No México, através da Norma Oficial NOM-177-SSA-1998 foram estabelecidos os procedimentos a serem executados para demonstrar a intercambiabilidade entre genérico e referência (Cook, 2006). Com o objetivo de fornecer à população medicamentos de qualidade comprovada, e a um preço menor, o governo mexicano adotou uma série de medidas. A mais relevante é a publicação em 07 de junho de 2002 do acordo no qual estabelece que as instituições públicas do sistema nacional devem comprar medicamentos genéricos (Associação dos Laboratórios Farmacêuticos Nacionais, 2005).

3.2 O HISTÓRICO DA REGULAMENTAÇÃO DOS MEDICAMENTOS GENÉRICOS

A regulamentação de medicamentos e alimentos começou nos Estados Unidos em 1906 quando o presidente Theodore Roosevelt assinou o “The Pure Food and Drug Act” que também criou a “US Food and Drug Administration”, FDA (Holovac, 2004).

Os testes de segurança para registro de medicamentos passaram a ser exigidos após a detecção de problemas causados pela intoxicação por um elixir de sulfanilamida contendo como solvente o dietilenoglicol; tendo ocorrido 107 casos de morte em 1937. No ano seguinte, o congresso americano assinou o “The Federal Food, Drug, and Cosmetic Act”, estabelecendo que novos medicamentos para serem registrados deveriam comprovar sua segurança. Contudo, a necessidade de comprovação da eficácia somente foi regulamentada em 1962 (Holovac, 2004).

Nos anos sessenta, a FDA permitia o registro de medicamentos similares aos inovadores registrados entre 1938 e 1962, enquanto que os inovadores registrados, neste período, estavam sendo obrigados a comprovar a própria eficácia (Bueno, 2005).

Em 1970 a FDA proibiu a comercialização de medicamentos similares que não apresentassem dados de formulação e produção. O inovador que não tivesse eficácia comprovada também foi proibido de ser comercializado (Bueno, 2005).

Durante a década de 70 a FDA foi fortemente questionada pelas empresas produtoras de medicamentos inovadores sobre a eficácia e segurança dos medicamentos similares, sendo aprovada em 1977 a primeira regulamentação técnica para realização de estudos de bioequivalência entre medicamentos similares e inovadores que tivessem comprovada sua eficácia (Bueno, 2005).

Em 1984, a assinatura do “Drug Price Competition and Patent Term Restoration Act”, conhecido como “Waxman-Hatch Amendments”, impulsionou a expansão do mercado de medicamentos genéricos nos Estados Unidos, uma vez que possibilitou a existência de genéricos de todos os inovadores do mercado, com eficácia comprovada, após o vencimento do período de exclusividade de comercialização. Esse ato determinou também um período de 180 dias de exclusividade ao primeiro genérico registrado. Ao mesmo tempo incentivou o investimento em novos fármacos à medida que garantia um período de exclusividade de

comercialização ao inovador, que poderia ou não coincidir com o período de proteção patentária (Chow & Liu, 2000).

A FDA publicou o primeiro guia “Guidance for Industry” com orientações para realização de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência. O guia, que inclui uma série de normas, foi publicado em 2003 e ainda em vigor, resulta de constantes discussões e evoluções na área de bioequivalência (Bueno, 2005).

No Brasil a obrigatoriedade da utilização da denominação genérica do princípio ativo nas embalagens de medicamentos, segundo a DCB, além da marca comercial (nome fantasia ou marca registrada) existe no Brasil desde 1983 (Storpiertis et al., 1999).

Com o objetivo de estimular a competição no mercado de medicamentos para a ocorrência de uma redução de preços, em 05 de abril de 1993, foi publicado o Decreto 793/93 que estabeleceu a obrigatoriedade da utilização da denominação genérica na embalagem do medicamento empregando letras com tamanho 3 vezes superior às utilizadas para marca comercial (Brasil, 1993).

Em 1996 com a promulgação da Lei 9.279 que regula os direitos e obrigações relativos à propriedade industrial, o Brasil foi colocado na rota internacional para lançamentos de inovações farmacêuticas. Assim, um ambiente favorável para o desenvolvimento de uma política de medicamentos genéricos, baseado em critérios internacionalmente aceitos, foi criado (Brasil, 1996).

Finalmente, em 10 de Fevereiro de 1999, a Lei 9787 estabeleceu o medicamento genérico e dispôs sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos (Brasil, 1999a). Neste mesmo ano foi publicada a Resolução RDC 391 que estabelecia o regulamento técnico para registro de medicamentos genéricos no Brasil (Brasil, 1999b).

3.3 A INTERCAMBIALIDADE ENTRE O MEDICAMENTO GENÉRICO E O MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA

A legislação brasileira, tendo como base a regulamentação técnica e a experiência de diversos países na área de medicamentos genéricos, como Estados Unidos (FDA-Food and Drug Administration) e Canadá (Health Canada), onde os genéricos estão consolidados como substitutos de baixo preço dos medicamentos de referência, estabelece que, para um medicamento ser registrado como genérico, é necessário que se comprove sua equivalência farmacêutica e bioequivalência (mesma biodisponibilidade) em relação ao medicamento de referência indicado pela Anvisa (Brasil, 2003a). Tal fato, aliado ao cumprimento das Boas Práticas de Fabricação e Controle de Qualidade (BPFC), fornece as bases técnicas e científicas para a intercambialidade entre o genérico e seu medicamento de referência, uma vez que, nesse caso, ambos podem ser considerados equivalentes terapêuticos, ou seja, medicamentos que apresentam a mesma eficácia clínica e o mesmo potencial para gerar efeitos adversos (Storpiertis, 2004).

Para demonstrar a equivalência terapêutica por métodos convencionais seria necessária a realização de ensaios clínicos de longa duração, envolver elevado número de pacientes e dispensar altos recursos financeiros. Em função destas dificuldades, a comparação clínica direta tem sido substituída por avaliações indiretas, com base no princípio de que curvas estatisticamente semelhantes de decaimento plasmático de fármacos produzem o mesmo resultado em termos de eficácia e segurança. Desta forma, ensaios de bioequivalência, em que a biodisponibilidade do produto candidato a genérico é comparada à do produto inovador, são considerados substitutos da equivalência terapêutica, desde que exista relação bem definida entre concentração do fármaco, efeito terapêutico e segurança (Kano, 2002)

O nome genérico é utilizado para prescrever o mesmo fármaco presente no medicamento inovador, sendo assim, o medicamento genérico deve conter o mesmo fármaco, na mesma quantidade ou concentração, na mesma forma de dosagem, e ser administrado pela mesma via que o

medicamento inovador apresentando, portanto a mesma segurança e eficácia clínica, o que permite o intercâmbio entre os mesmos (Dighe, 1999).

De acordo com a resolução RDC nº. 16, de 02 de março de 2007 a prescrição dos medicamentos nos serviços privados de saúde fica a critério do profissional responsável, podendo ser realizada sob o nome genérico ou comercial. No caso do profissional prescritor decidir pela não-intercambialidade de sua prescrição, a manifestação deverá ser efetuada por item prescrito, de forma clara, legível e inequívoca. Já no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), as prescrições pelo profissional responsável adotarão obrigatoriamente, a DCB, ou, na sua falta, a DCI. A dispensação e substituição do medicamento prescrito pelo medicamento genérico ou similar correspondente, salvo restrições expressas pelo profissional prescritor, são de exclusiva responsabilidade do farmacêutico. Este, nos casos de prescrição com o nome genérico, deve somente permitir a dispensação do medicamento de referência, ou genérico ou similar correspondente, conforme a RDC nº. 51, de 15 de agosto de 2007. E é dever do profissional farmacêutico explicar, detalhadamente, a dispensação realizada ao paciente ou usuário bem como fornecer toda a orientação necessária ao consumo racional do medicamento.

Considerando a necessidade do consumidor melhor identificar o medicamento genérico e de se garantir a correta intercambialidade com seu respectivo medicamento de referência, em de agosto de 2006, foi publicada a Consulta Pública nº 46 propondo de tornar-se obrigatória a inserção do nome comercial do medicamento de referência na embalagem secundária (caixa) dos medicamentos genéricos. Consolidada esta proposta, o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Medicamentos (RDC nº. 333/2003) será alterado pela Anvisa (Brasil, 2003c; Brasil, 2006c).

3.4 BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA

A ação terapêutica de um fármaco depende da existência de uma concentração efetiva deste no seu local de ação durante um período de tempo. Uma vez que a concentração de um fármaco no local de ação se encontra em equilíbrio com a concentração do mesmo na corrente sanguínea, para a maioria dos fármacos a determinação das suas concentrações ao longo do tempo no sangue ou urina tornam-se medidas indiretas mas preditivas da concentração do mesmo fármaco no seu local de ação. Desta forma a disponibilidade do fármaco a partir da forma farmacêutica assume um papel crítico na eficácia clínica de um medicamento, tornando-se por isso necessário caracterizar adequadamente o desempenho da formulação que o contém como medição adicional de eficácia (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, 2007).

O termo biodisponibilidade foi introduzido na literatura científica em 1970. Em 1971, Lindenbaum e colaboradores observaram que quatro formulações diferentes de digoxina 0,25 mg administradas a voluntários, de acordo com o desenho cruzado conduziram a perfis da concentração-tempo de plasma muito diferentes (Marzo, 1997). Em 1977, o FDA (Food and Drugs Administration) publicou o Registro Federal das Normas para a realização dos Estudos de Biodisponibilidade e Bioequivalência e emitiu normas e guias para fármacos específicos., fazendo com que houvesse uma melhoria nas formulações pelas companhias que as produziam. Em poucos anos o termo e conceito de biodisponibilidade se expandiu rapidamente na literatura específica (Carrizo, 2000).

Para o FDA, biodisponibilidade significa a velocidade e extensão pela qual uma substância de ação terapêutica é absorvida da forma farmacêutica e torna-se disponível no local de ação do fármaco. O EMEA (European Medicines Evaluation Agency) define biodisponibilidade como sendo a extensão e a velocidade pela qual a substância de ação terapêutica é liberada da forma farmacêutica para a circulação sistêmica (Löbenberg & Amidon, 2000; Marzo, 1997).

No Brasil, segundo a Lei nº. 9.787, de 10 de fevereiro de 1999, que estabelece as bases legais para instituição do medicamento genérico no País, e a regulamentação para Medicamentos Genéricos, após processo contínuo de atualização e revisão através da RDC nº. 16, de 02 de março de 2007, o termo biodisponibilidade indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração-tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina (Brasil, 1999a; Brasil, 2007a).

A biodisponibilidade não é uma propriedade somente do fármaco, mas também da formulação em que o mesmo está contido. A definição de biodisponibilidade inclui a extensão com que o fármaco deixa a formulação e atinge a circulação sistêmica, expressa como área sob curva da concentração plasmática em função do tempo (ASC); da velocidade com que o fármaco chega à circulação sistêmica, expressa pela concentração máxima (C_{max}) e do tempo para atingir a concentração máxima (t_{max}). Desta maneira, a biodisponibilidade representa a expressão *in vivo* da qualidade farmacêutica do produto avaliado (Kano, 2002).

Se um mesmo indivíduo apresentar, em fases diferentes e adequadamente estabelecidas, concentrações plasmáticas semelhantes de um mesmo fármaco, a partir de dois medicamentos distintos, supõem-se que se observem efeitos similares. Para tanto, um estudo comparativo entre as biodisponibilidades desses dois medicamentos, que possuem a mesma indicação terapêutica e que são administrados pela mesma via extravascular (em que ocorre o processo de absorção) e na mesma dose, se faz necessário. A avaliação comparativa é chamada de teste de bioequivalência e é um método indireto de avaliar a eficácia e a segurança de qualquer medicamento contendo a mesma substância ativa que o medicamento referência (CREMESP, 2007).

A bioequivalência é definida como ausência de diferença significativa na velocidade e extensão pelas quais o fármaco, presente em equivalentes ou alternativas farmacêuticas, torna-se disponível no local de ação, quando administrado na mesma dose molar e nas mesmas condições, em ensaio

apropriadamente planejado, garantindo assim, os mesmos efeitos em relação à eficácia e segurança (Kano, 2002).

Casos de bioinequivalência entre medicamentos têm sido observados entre vários produtos, o que justifica a importância dos estudos comparativos de diferentes preparações no intuito de garantir ao usuário a equivalência terapêutica entre os diferentes medicamentos comercializados principalmente em terapias de risco, onde as substituições entre formulações podem resultar em falhas graves.(Boas, 2006).

De acordo com a Lei nº. 9.787, de 10 de fevereiro de 1999, a bioequivalência consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio(s) ativo(s), e que tenham comparáveis biodisponibilidades, quando estudados sob um mesmo desenho experimental (Brasil, 1999a)

Os estudos de biodisponibilidade devem ser realizados para qualquer produto farmacêutico original (inovador), enquanto que os ensaios de bioequivalência têm como objetivo demonstrar que um produto apresenta, ou não, diferenças significativas em relação ao desempenho biológico, quando comparado a outro previamente aprovado (Ritschel, 1992). E é neste enfoque que está inserido o medicamento genérico, que para ser considerado como tal, deve ser equivalente farmacêutico e bioequivalente ao medicamento referência.

Para produtos já registrados, os ensaios de bioequivalência devem ser realizados sempre que houver alterações, inclusões e/ou notificações pós-registro no medicamento que justifiquem nova comprovação de intercambialidade (Brasil, 2007a).

3.5 BIOEQUIVALÊNCIA MÉDIA, INDIVIDUAL E POPULACIONAL

Os órgãos reguladores internacionais e nacionais exigem evidências de bioequivalência em termos de biodisponibilidade média relativa. Entretanto, nos últimos anos, tem-se discutido a utilidade deste procedimento e a aplicação de outros modelos estatísticos envolvendo os conceitos de bioequivalência populacional e individual (Kano,2002).

O critério da bioequivalência média é recomendado para uma comparação entre as medidas farmacocinéticas de interesse na maioria dos estudos de biodisponibilidade relativa e bioequivalência (Brasil, 2003d).

A bioequivalência média considera somente na comparação das médias populacionais de medidas farmacocinéticas de interesse e não leva em consideração as variâncias inter-individuais e intra-individuais para os produtos teste e referência analisados. Já os critérios de bioequivalência individual e populacional incluem além das comparações das médias, as respectivas variâncias associadas às medidas farmacocinéticas de estudo (Brasil, 2003d).

O critério da bioequivalência populacional avalia a variabilidade total das medidas de interesse, ou seja, o objetivo está em evidenciar a diferença entre indivíduos. Desta forma, o fato das biodisponibilidades das formulações teste e referência serem semelhantes não quer dizer que a biodisponibilidade entre as mesmas sejam similares em todos os indivíduos (Patnaik et al., 1996).

O critério de bioequivalência individual engloba a variabilidade intra-individual dos produtos teste e referência, bem como as interações entre indivíduos e formulações (Brasil, 2003d). Desta forma, tem-se sugerido que ao selecionar um produto para início de tratamento, dados sobre a bioequivalência populacional já seriam adequados, mas, para pacientes que já estivessem em tratamento, a substituição de um produto por outro, somente poderia ser efetuada com segurança caso a bioequivalência individual fosse conhecida, pois este modelo de biodisponibilidade tem como necessidade a realização de ensaios prolongados e replicados, com

no mínimo três fases para a comparação de dois produtos (Hauck & Anderson, 1994).

Tendo em vista estes modelos de biodisponibilidade, é importante ressaltar que, assim como a bioequivalência média não assegura a bioequivalência populacional e individual, a existência de bioequivalência populacional não presume também a existência de bioequivalência individual entre dois produtos, ou seja, o fato da razão entre os valores médios das biodisponibilidades estar dentro dos limites estabelecidos não garante que a razão entre os valores individuais também esteja (Welleck, 1993). Conseqüentemente, dois medicamentos considerados bioequivalentes pelo critério populacional poderiam não ser bioequivalentes para todos, ou mesmo para a maioria dos indivíduos (Patnaik et al., 1996; Porta, 1999).

3.6 FATORES QUE AFETAM A BIODISPONIBILIDADE DE FÁRMACOS

Diversos são os fatores que podem influenciar a velocidade e a extensão da absorção e, portanto, o percurso do fármaco no plasma, assim como no(s) sítio(s) de ação. Esses fatores incluem os alimentos ingeridos pelo indivíduo, o efeito de uma doença sobre a absorção do fármaco, a idade do paciente, o(s) sítio(s) de absorção do fármaco administrado, o tipo de forma farmacêutica, a composição e o seu método de produção (Aulton, 2005).

Considerando-se que a absorção ocorre somente após a solubilização do fármaco, os processos de desintegração da forma farmacêutica sólida, liberação e dissolução do fármaco, bem como sua permeação através das membranas biológicas, são etapas determinantes para a biodisponibilidade do fármaco a partir de suas formas de dosagem (Serra, 1998; Panchagnula & Thomas, 2000).

As características físico-químicas do fármaco e sua liberação da forma farmacêutica exercem grande influência na quantidade e velocidade

de absorção. Assim, as formas farmacêuticas sólidas são aquelas que, potencialmente, exibem maiores problemas na biodisponibilidade, já que o fármaco somente pode ser absorvido após sua solubilização (Consigliari et al., 2000; Dressman et al., 1998).

A dissolução pode ser definida de forma simplificada como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo (Sommer, 2005). Assim sendo, é um pré-requisito para a absorção e conseqüente resposta clínica da maioria dos fármacos, apresentados na forma farmacêutica sólida, administrados por via oral (Amidon et al., 1995).

Entre os diversos fatores que podem alterar a desagregação da forma farmacêutica e a dissolução do fármaco e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade, cinco são destacados:

3.6.1 TAMANHO DA PARTÍCULA

Um aumento na área de superfície total do fármaco em contato com os fluidos gastrintestinais provocará um aumento na velocidade de dissolução. Presumindo-se que cada partícula de fármaco seja molhada de forma completa pelos fluidos gastrintestinais, a superfície efetiva apresentada pelo fármaco será inversamente proporcional ao tamanho das partículas do fármaco. Como conseqüência, quanto menor o tamanho de partículas, maior será a superfície de contato efetiva apresentada por uma determinada massa de fármaco e maior a velocidade de dissolução dele. A redução do tamanho de partícula resultará, provavelmente, em um aumento da biodisponibilidade, desde que a absorção do fármaco seja dependente da velocidade de dissolução (Aulton, 2005).

3.6.2 FORMA CRISTALINA OU AMORFA

Os materiais farmacêuticos sólidos podem ocorrer como substâncias cristalinas puras de forma identificável e definida ou como partículas

amorfos de estrutura indefinida. O caráter amorfo ou cristalino da substância farmacêutica tem grande importância na velocidade de dissolução e conseqüentemente na velocidade de absorção, uma vez que a forma amorfa é mais solúvel que a cristalina. Isto, portanto, implica em diferenças no grau de atividade farmacológica de cada uma, pois a biodisponibilidade está determinada pela velocidade de dissolução (Ansel & Popovich, 2000; Sommer, 2005).

A estrutura cristalina dos fármacos pode ser alterada durante sua síntese através de etapas específicas como precipitação e cristalização ou durante as operações para a obtenção da forma farmacêutica (Martin & Viladrosa, 2000)

A propriedade pela qual uma única substância química pode existir em mais de uma forma cristalina é conhecida como "polimorfismo". Sabe-se que apenas uma forma de fármaco puro é estável em temperatura e pressão determinadas com as outras formas, chamadas de metaestáveis (Ansel & Popovich, 2000).

Por este motivo, o controle da forma cristalina do fármaco durante os vários estágios do desenvolvimento deve ser feito, pois qualquer alteração na forma dos cristais pode alterar a biodisponibilidade do medicamento (Vippagunta et. al., 2001).

3.6.3 ESTADO DE HIDRATAÇÃO

O grau de hidratação de uma molécula de fármaco pode afetar tanto a sua solubilidade quanto seu padrão de absorção (Ansel & Popovich, 2000). As formas anidras dos fármacos apresentam atividade termodinâmica maior que os hidratos correspondentes e, conseqüentemente, têm maior solubilidade e maior velocidade de dissolução que as formas hidratadas (Ansel & Popovich, 2000; Martin & Viladrosa, 2000).

3.6.4 FORMA FARMACÊUTICA

O tipo de forma farmacêutica e o seu método de preparação ou fabricação podem influenciar na biodisponibilidade do fármaco, uma vez que o tipo de forma farmacêutica influirá na dissolução e conseqüentemente na velocidade e/ou extensão de absorção do fármaco no trato gastrointestinal. Geralmente, os fármacos devem estar em solução nos fluidos antes de poderem ser absorvidos. Dessa maneira, quanto maior o número de etapas que intervêm no processo da absorção, maior será o número de potenciais obstáculos para que a absorção ocorra e maior será a probabilidade de redução da biodisponibilidade apresentada pelo fármaco. Assim, a biodisponibilidade de um determinado fármaco tende a diminuir segundo a seguinte ordem de classificação da forma farmacêutica: solução aquosa > suspensão aquosa > formas farmacêuticas sólidas (Aulton, 2005).

3.6.5 PH GASTRINTESTINAL

Interfere na estabilidade, assim como na ionização dos fármacos, promovendo uma alteração na velocidade de dissolução e, conseqüentemente, na velocidade e na extensão de absorção (Moura & Reyes, 2002)

3.7 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS PARA A AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA

Os parâmetros farmacocinéticos determinados nos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos relacionam-se com a quantidade de fármaco absorvida e com a velocidade do processo de absorção. Esses parâmetros podem ser obtidos a partir dos resultados da quantificação do fármaco nos líquidos biológicos, como sangue e urina, após administração extra vascular (Consiglieri & Storpirtis, 2000).

Os principais parâmetros farmacocinéticos utilizados, a partir de dados de concentração sanguínea, para a avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência são: a área sob a curva da concentração plasmática ou sanguínea *versus* tempo (ASC), a concentração máxima obtida ($C_{m\acute{a}x}$) e o tempo no qual essa concentração é alcançada ($T_{m\acute{a}x}$) (Consiglieri & Storpirtis, 2000).

A área sob a curva é o parâmetro de maior importância na determinação da biodisponibilidade, pois representa a fração do fármaco absorvida após administração de dose única do medicamento. É matematicamente representada como:

$$ASC = \frac{\text{dose administrada}}{\text{Clearance total do fármaco}}, \text{ ou}$$

$$ASC = \frac{FD}{K \cdot V_d}$$

A área sob a curva é diretamente proporcional à dose absorvida (FD), representando a quantidade de fármaco realmente disponível para ser distribuída. O denominador, expresso pelo produto entre a constante de eliminação (K) e o volume de distribuição (V_d), representa o *clearance* total do fármaco (depuração) no organismo (Dipiro et. al, 1996).

Indivíduos que apresentam variações quanto a absorção, volume de distribuição e de eliminação devem ser eliminados dos estudos de bioequivalência, pois podem levar a erros nos cálculos de ASC (Consiglieri & Storpirtis, 2000).

A $C_{m\acute{a}x}$ representa a maior concentração do fármaco no sangue após a administração extra vascular e é diretamente proporcional à fração absorvida do fármaco, enquanto que o tempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) está relacionado à velocidade de absorção. Nos estudos de bioequivalência de medicamentos, estes parâmetros são obtidos diretamente das curvas de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo, após a administração dos medicamentos teste e referência aos voluntários (Cid, 1982).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO PARA ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

Conforme visto anteriormente, a análise de bioequivalência entre duas formulações de referência (R) e teste (T) tem sido realizada com base nas medidas farmacocinéticas. Os métodos de análise estatística são os chamados bioequivalência média, individual e populacional. O primeiro considera a análise sob o enfoque das médias das formulações R e T na amostra de indivíduos incluídos no estudo, e é o método mais comumente usado, enquanto que os dois últimos consideram também a variabilidade existente nas medidas farmacocinéticas (Brasil 2002a).

Os métodos estatísticos de bioequivalência média surgiram no fim da década de 70 e início da década de 80, como consequência dos esforços do FDA (Food Drug Administration) a fim de suprir a necessidade de uma avaliação nos estudos de bioequivalência.

A maior dificuldade dos ensaios de bioequivalência reside no emprego de seres humanos, uma vez que existe grande variabilidade entre indivíduos. Desta forma, a escolha do grupo de indivíduos participantes dos estudos de bioequivalência deve ser fundamentada em parâmetros capazes de manter homogêneas as características do grupo. O protocolo experimental deve contemplar esses aspectos, definindo os critérios de inclusão e exclusão de voluntários (Storpiotis & Consiglieri, 1995).

Segundo a Resolução RE nº. 898, de 29 de maio de 2003, um dos critérios para escolher um delineamento apropriado é verificar se o delineamento selecionado pode identificar e isolar a variabilidade inter-individual na análise de dados. Qualquer delineamento que venha remover essa variação da comparação entre formulações pode ser apropriado. O planejamento experimental mais utilizado nos ensaios de bioequivalência é o cruzado (crossover) não replicado com duas formulações, dois períodos, duas seqüências, que pode ser representado como segue:

Seqüência	Período	
	1	2
1	R	T
2	T	R

Figura 1: Delineamento cruzado 2x2 para dois medicamentos (R= referência e T= teste)

O estudo cruzado é um planejamento de blocos aleatorizados no qual cada bloco recebe mais de uma formulação (R= referência e T= teste) de um mesmo fármaco em períodos diferentes (1 e 2). Um bloco pode ser um indivíduo ou um grupo de indivíduos. Os indivíduos em cada bloco recebem uma seqüência diferente (1 ou 2) de formulações. As vantagens em se utilizar esse planejamento para estudos de bioequivalência são:

- A) Cada indivíduo serve como seu próprio controle, o que permite uma comparação do indivíduo com ele mesmo, para as diferentes formulações;
- B) A variabilidade inter-individual é removida da comparação entre formulações, o que torna o teste de diferença de tratamentos em geral mais poderoso;
- C) Com uma aleatorização apropriada de indivíduos para a seqüência de administração das formulações, o planejamento produz as melhores estimativas não viciadas para diferença (ou razão) entre formulações.

A aceitação ou rejeição da bioequivalência entre produtos baseia-se em probabilidades. De certa forma, pode ser resumido em uma probabilidade geral, com certo grau de segurança, em função de parâmetros comparados entre o produto teste e referência, compreendidos dentro de limites previamente estabelecidos (Consigliari & Storpirtis, 2000; United States, 1998).

Portanto, devem-se considerar os seguintes aspectos (Ansel et al., 1995; Jackson, 1994):

- A) Para a razão da tendência central, é adotado um fator D_1 como 80% e um fator D_2 como 120% . A origem dessa especificação de $\pm 20\%$ não está bem esclarecida, mas parece estar relacionada com outros limites da Farmacopéia Americana. A largura desse intervalo é baseada em medidas como ASC e $C_{m\acute{a}x}$, reconhecendo-se que intervalos menores (90 a 110%, por exemplo) são mais apropriados para fármacos que têm estreito índice terapêutico ou que apresentam efeitos tóxicos muito intensos.
- B) Os melhores parâmetros de distribuição estatística para comparação dos perfis dos produtos teste e referência devem ser selecionados. O parâmetro de distribuição estatística mais comumente empregado é a medida da tendência central, avaliada pela comparação das médias. Entretanto, podem também ser usadas a razão das médias geométricas ou a mediana.
- C) A segurança de que um determinado parâmetro do produto teste corresponde à referência é medido por $1-P$. Esta é a probabilidade de que a verdadeira diferença (ou razão) situe-se dentro da zona de segurança, definida pelo intervalo de bioequivalência. Quanto menor P , maior é a segurança . P pode ser definido como o risco ou probabilidade de considerar um determinado parâmetro da formulação teste como aceitável, conforme o critério, quando na realidade não o é. Geralmente, P é fixado como 0,05 para a maioria dos parâmetros (nível=5%).

De acordo com a Resolução RE nº. 898, de 29 de maio de 2003, a média dos valores dos parâmetros farmacocinéticos estudados do produto-teste deve estar dentro dos limites de 80 a 125% do produto referência empregando-se intervalo de confiança (IC) de 90%, nível de significância $P=0,05$ e a transformação logarítmica dos valores de ASC e $C_{m\acute{a}x}$. A análise estatística deve compreender método paramétrico e a análise de variância

(ANOVA) deve estudar a influência da seqüência (grupo ou ordem) de administração, indivíduos, períodos ou fases e o tratamento (produtos) administrado (Brasil, 2003d).

O uso dos limites de 80 a 125% para o intervalo de bioequivalência da razão das médias na escala original (80 a 120%), é justificado pelo fato de haver uma correspondência a um intervalo de bioequivalência simétrico para as diferenças na escala logarítmica transformada (Brasil, 2002a)

A ANOVA é empregada nos estudos cruzados, pois permite identificar as fontes de variação e estimar a variância de todos os dados obtidos. É um método que consiste em diferenciar ou testar a igualdade de médias populacionais, baseado na análise de variâncias amostrais. As variâncias são comparadas pelo teste F , que é igual à variância das médias dividida pela variância do erro experimental ou residual. Esse último inclui causas aleatórias (Triola, 1999; Consiglieri & Storpirtis, 2000).

Para a aplicação da análise de variância (ANOVA) é necessário que se cumpram os seguintes requisitos (Consiglieri & Storpirtis, 2000):

- A) A administração dos produtos aos voluntários deve ser aleatória afim de que a seqüência de administração dos produtos seja realizada ao acaso;
- B) As variâncias devem ser homogêneas, isto é, as variâncias associadas aos dois tratamentos e das seqüências devem ser iguais;
- C) Deve haver linearidade no modelo estatístico afim de que os efeitos do modelo como indivíduos, seqüência, período e tratamento, sejam aditivos e independentes;
- D) Independência e distribuição normal dos resíduos.

3.8.1 O PODER DO TESTE E TAMANHO DA AMOSTRA

O poder do teste estatístico em um estudo de bioequivalência é definido como a probabilidade de aceitar a bioequivalência entre produto teste e referência corretamente. Durante a etapa de planejamento de um ensaio de bioequivalência, uma das questões mais importantes é relativa ao tamanho de amostra necessário para obtenção de resultados confiáveis. 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 intra-individual obtida através da literatura ou de um estudo piloto (Brasil, 2003d).

Na literatura, existem diversas maneiras para determinar o tamanho da amostra. Contudo, o número de voluntários sadios deverá sempre ser capaz de assegurar o poder estatístico suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de bioequivalência. O número de voluntários pode ser calculado por meio do coeficiente de variação e poder do teste.

Por decisão regulatória, e não científica, no Brasil não é permitido a condução de um estudo de bioequivalência com utilização de número inferior a 12 voluntários. Na falta de dados relativos ao coeficiente de variação do fármaco, pode-se optar por utilizar um número mínimo de 24 voluntários (Brasil, 2006b).

3.9 A TÉCNICA DA ESPECTROMETRIA DE MASSA ACOPLADA A CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA (LC-MS/MS) APLICADA NOS ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

O método bioanalítico empregado para a determinação de um fármaco e/ou seus metabólitos em matrizes biológicas é fator determinante para assegurar a obtenção de dados exatos, precisos e específicos a serem utilizados para a interpretação da bioequivalência (Bueno, 2005).

Atualmente, a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa vem sendo utilizada em inúmeras aplicações como por exemplo no sequenciamento de DNA (biologia molecular), em determinação de compostos pesticidas em alimentos para registros, identificação e caracterização de novas drogas, determinação de esteróides e outras drogas ilícitas em atletas, triagem clínica através da quantificação de fenilcetonúria em recém-nascidos, determinação de compostos pesticidas no solo e na atmosfera, identificação e caracterização de polímeros e controle de qualidade dos derivados de petróleo. Além disso, em se tratando da aplicação nos estudos de bioequivalência, a técnica LC-MS/MS tem se tornado uma ferramenta de grande importância, pois somente através da alta seletividade e especificidade oferecida pela técnica é possível se necessário, quantificar compostos na ordem de fentogramas (fg), (Zhu e Luo, 2005).

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molar de compostos eletricamente carregados, ou íons, previamente formados. Estes íons são selecionados no espectrômetro de massas de acordo com a razão massa-carga (m/z). Em termos dimensionais, a unidade resultante da medida determinada pelo espectrômetro m/z de um íon segue a seguinte convenção: massa (m) em Daltons (Da), definida como 1.0 Da igual a $1/12$ da massa de um átomo do isótopo de carbono 12 (^{12}C) sobre o número z , que é a carga fundamental do íon. Na maioria dos casos os íons determinados por espectrometria de massas possuem somente uma carga ($z = 1$), sendo assim, o valor de m/z é essencialmente função da massa molecular (iônica) em Da (Applied, 2006).

O descobrimento da espectrometria de massas data do século 19 e pode ser atribuído a dois pesquisadores, J.J. Thomson e F.W. Aston. A principal linha de pesquisa de Thomson foi o estudo das propriedades elétricas da matéria. Em 1897, Thomson provou a existência do elétron e determinou o valor da razão da carga pela massa do elétron (Applied, 2006).

O grande desenvolvimento da espectrometria de massas, resultando no aumento da aplicabilidade da técnica, ocorreu a partir da década de 70, e deve-se a três principais fatores (Waters, 2005):

- A) Acoplamento às técnicas cromatográficas;
- B) Surgimento de novas formas de ionização,
- C) Desenvolvimento de computadores e aplicativos

Nos primeiros espectrômetros de massas fabricados, as amostras, necessariamente, deveriam estar no estado gasoso, mas com o desenvolvimento de novas tecnologias, atualmente as amostras podem ser introduzidas em solução ou em forma de um cristal em fase sólida (Applied, 2006).

A combinação entre cromatografia e espectrometria de massa é um assunto que vem despertado muito interesse nos últimos 40 anos. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi primeiramente reportada em 1958 e se fez disponível comercialmente em 1967. Desde então, esta técnica tornou-se cada vez mais utilizada. Contudo, os compostos para serem analisados por cromatografia gasosa precisam ser ao mesmo tempo voláteis e termicamente estáveis às temperaturas usadas para se atingir a separação cromatográfica. Em termos simples, todos os compostos que são capazes de passar através de uma coluna de cromatografia gasosa são capazes de serem ionizados e conseqüentemente de serem detectados pelo espectrômetro de massas (Ardrey, 2003).

Apesar das facilidades oferecidas na técnica de acoplamento entre a cromatografia gasosa e a espectrometria de massa, poucos fármacos atendem as exigências de serem, ao mesmo tempo, voláteis e termoestáveis.

Embora a cromatografia líquida e a espectrometria de massa possam ser consideradas técnicas incompatíveis, por não poderem ser acopladas diretamente e uma interface ser necessária entre elas afim se remover a fase móvel, atualmente esta técnica é a de melhor escolha para a quantificação de compostos orgânicos (Ardrey, 2003 & Applied, 2006).

O acoplamento do espectrômetro de massa à técnica de cromatografia líquida permite que os compostos pré-separados por esta última sejam identificados e quantificados com alto grau de seletividade, sensibilidade e confiabilidade e com algumas vantagens sobre a cromatografia gasosa, uma vez que, os compostos presentes em amostras complexas, como fluidos biológicos, podem ser analisados livres de interferentes, proporcionando análises rápidas, sendo os métodos de purificação das amostras mais simples, consumindo menos tempo de preparo e menos reagentes. Outra vantagem da cromatografia líquida é que as colunas e métodos aplicados, principalmente a fase reversa, resolvem 90% dos casos de separação de compostos orgânicos (Applied, 2006).

Em geral, um sistema ideal de detector por espectrometria de massas acoplado a cromatografia líquida deve (Applied, 2006):

- ser seletivo: permitir a identificação de produtos alvos presentes em uma mistura.
- ser universal: detectar, quando necessário, todos os compostos de eluição.
- Ter alta sensibilidade em condições ótimas.
- manter a resolução da separação cromatográfica.
- propiciar um sinal proporcional à concentração do composto.
- permitir a deconvolução dos picos cromatográficos, isto é, decompor os picos não resolvidos nos constituintes originais.

A técnica de cromatografia líquida pode estar acoplada a um detector de espectrometria de massas com um único filtro analisador de massas do tipo quadrupolo (LC-MS) ou a um detector de espectrometria de massas com dois filtros analisadores de massas do tipo quadrupolo e uma célula de

colisão para a fragmentação da molécula precursora (LC-MS/MS, triplo-quadrupolo).

A técnica de LC-MS/MS despontou com muita força na década de 90 em consequência da necessidade dos laboratórios bioanalíticos de equiparem-se com aparelhos capazes de fornecer seletividade, especificidade, sensibilidade e rapidez de análise. Uma das razões para estes requerimentos é o fato das matrizes biológicas serem extremamente complexas. Essa técnica baseia-se especialmente nas características de seletividade do espectrômetro de massa aliadas à capacidade de separar diversos tipos de compostos da cromatografia líquida. Preocupa as empresas que comercializam esses equipamentos, exatamente a interface entre a saída do cromatógrafo líquido e a entrada no espectrômetro de massas. A função da interface é transferir os íons formados na fonte para o espectrômetro de massas, restringindo a passagem de solventes, interferentes, ar e umidade, que comprometem as análises e o ótimo funcionamento do sistema. As interfaces robustas que permitam altos fluxos e apresentam facilidade de manuseio e manutenção são verdadeiros objetos de desejo para quem atua nesta área (Astigarraga, 2003).

Um espectrômetro de massa tipo triplo-quadrupolo (MS/MS) é basicamente composto dos seguintes componentes (Figura 2) (Waters, 2005 & Applied, 2006):

- A) Uma fonte de ionização, que proporciona a geração de íons em estado gasoso (moléculas carregadas).
- B) Dois analisadores de massas, que promovem a separação dos íons através da razão massa/carga (m/z).
- C) Uma célula de colisão, para promover a fragmentação do íon precursor gerando o íon produto a ser quantificado.
- D) Um detector, que realiza a contagem dos íons e transforma o sinal em corrente elétrica, onde a magnitude do sinal elétrico em função

da m/z é convertida por um processador de dados proporcionando um espectro de massas correspondente.

Figura 2- Representação esquemática dos componentes de um espectrômetro de massas tipo quadrupolo. (A) Fonte de ionização; (B) Analisadores de massas; (C) Célula de colisão ; (D) Detector (Applied, 2006).

No analisador de massas tipo triplo-quadrupolo, os íons são, em um primeiro estágio, separados ou selecionados de acordo com sua m/z , aplicando-se um campo elétrico. Os íons tramitam no eixo central de quatro hastes dispostas em paralelo e equidistantes, onde são aplicadas voltagens DC (corrente direta) e AC (corrente alternada). Posteriormente, os íons selecionados colidem com moléculas de nitrogênio ou argônio em uma célula de colisão. A energia de colisão é convertida em energia vibracional e a fragmentação do íon precursor gerando o íon produto ocorre pela quebra de ligações. Em um outro estágio, no segundo analisador, os íons produtos são da mesma forma selecionados de acordo com a razão m/z e atingem o detector.

Embora existam várias estratégias para separação e detecção, a etapa de ionização é aquela com o maior número de diferentes estratégias. Isso se deve à grande variedade de tipos de amostras e espécies de interesse. Neste contexto, surgiu a ionização por “electrospray” como uma

alternativa para geração de íons a partir de espécies pouco voláteis presentes em fase líquida.

Um levantamento na literatura mostra que, de 1980 a 2000, o número aproximado de artigos publicados usando “electrospray” passou de 100 para 7800, sendo que 80% destes estão relacionados com análise de biomoléculas e de compostos orgânicos, 10% são relativos à instrumentação e estudos sobre os aspectos fundamentais da formação do “electrospray” e 10% das publicações estão associadas a espécies organometálicas e inorgânicas nas mais diferentes formas (Moraes, 2003).

Embora seja normalmente considerada como uma fonte de ionização, o “electrospray” é, na realidade, um processo de transferência de íons pré existentes em solução para fase gasosa. Pode-se dizer que a efetiva ionização (transformação de uma espécie neutra em um íon) é um efeito secundário. De qualquer forma, é fácil entender porque uma técnica que permite a transferência de íons de uma solução para a fase gasosa para análise por espectrometria de massas, em tão pouco tempo, teve um impulso tão grande: isto se deve ao fato da maioria dos processos químicos e bioquímicos ocorrerem em fase líquida, envolvendo muitas vezes espécies pouco voláteis (Moraes, 2003).

O “electrospray” foi sugerido como um possível modo de ionização para espectrometria de massas por Dole em 1968. No entanto, seus experimentos não foram convincentes pois estes visavam a análise de espécies poliméricas, como poliestireno, que não estão ionizados em solução. Foi somente em 1984 que Yamashita e Fenn demonstraram a aplicabilidade da fonte de “electrospray” como um método de ionização branda aplicável a compostos polares e iônicos (Applied, 2006).

Esse processo de ionização envolve a formação de um “spray” eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas. À medida que as gotas ficam menores em consequência da evaporação do solvente pelo gás de nebulização, suas densidades de carga tornam-se maiores e ocorre a dessorção dos íons. Estes íons, que são liberados, são

guiados por eletrostática para o orifício de entrada do analisador de massas (Figura 3). Toda a região da fonte está à pressão atmosférica. E a frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico gerado na probe da fonte, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução (Moraes, 2003).

Figura 3 – Representação da técnica de ionização do analito por electrospray (Applied, 2006).

Um dos grandes problemas no “electrospray” é perda de linearidade da intensidade de ionização com o aumento da concentração do padrão analisado. A vazão da amostra do gás nebulizante, do gás secante e a distância da ponta do capilar ao contra eletrodo são parâmetros que afetam a estabilidade do “electrospray” e, portanto, a formação das espécies na fase gasosa. No entanto, esses são facilmente controlados para se obter um fluxo de amostra constante. Já a presença de outros eletrólitos na solução não é tão fácil de ser controlada e compromete a linearidade de resposta da intensidade de um pico em função da concentração (Moraes, 2003).

Para a grande maioria dos compostos, os detectores de massas são mais sensíveis e de longe, mais específicos do que os detectores tradicionais. Os detectores de massa podem analisar vários compostos e identificar componentes em cromatogramas não separados, reduzindo assim a necessidade da cromatografia perfeita (Brasil 2002b).

No Brasil, o primeiro estudo de bioequivalência, utilizando a técnica da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com uma fonte de electrospray, foi realizado em 1999. O método desenvolvido para quantificar o fluconazol em amostras plasmáticas de 24 voluntários saudáveis demonstrou, através da comparação das biodisponibilidades de duas formulações distintas, a existência de bioequivalência entre o medicamento teste e o referência. Desde então, a aplicação desta técnica tornou-se imprescindível para atender as necessidades comerciais dos laboratórios nacionais, em curto espaço de tempo, assim como atender as exigências dos órgãos regulatórios com dados de alta confiabilidade (De Nucci et al., 1999).

3.10 BENZODIAZEPÍNICOS.

Diversos fármacos são capazes de atuar no sistema nervoso central (SNC) e produzir calma ou sonolência. Estes fármacos são chamadas de sedativo-hipnóticos. Entende-se que um agente sedativo é aquele capaz de reduzir atividade motora, moderar a excitação e acalmar o indivíduo; enquanto que um agente hipnótico é aquele capaz de causar sonolência e facilitar o início e manutenção de um estado de sono que lembra o sono natural em suas características eletroencefalográficas, e do qual o indivíduo pode ser acordado com facilidade (Marcolin, 1998).

Os benzodiazepínicos são fármacos que possuem propriedades sedativo-hipnóticas, ansiolíticas, anticonvulsivantes e miorrelaxantes; e são considerados bastante seguros, uma vez que possuem capacidade limitada para causar depressão profunda e potencialmente fatal do sistema nervoso central. Embora o coma possa ser induzido com doses muito altas, os benzodiazepínicos não podem induzir estado de anestesia cirúrgica e são praticamente incapazes de causar depressão respiratória fatal ou colapso cardiovascular, desde que não estejam associados a outros depressores do SNC como barbitúricos e o etanol (Spitz, 1998).

Desde a antiguidade, as bebidas alcoólicas e as poções contendo láudano e várias ervas, têm sido utilizadas para induzir o sono. O primeiro agente especificamente introduzido como sedativo, e posteriormente como hipnótico foi o brometo, em meados do século XIX. drogas como hidrato de cloral, aldeído e sulfonas foram muito utilizadas para estes fins até 1903, quando surgiu o barbital, o primeiro barbitúrico hipno-indutor sendo por isso utilizados em tratamento de ansiedade e agitação, derivado do ácido barbitúrico. Em 1912, surgiu o fenobarbital, um medicamento da classe dos barbitúricos utilizado em casos de epilepsia, pois regula a actividade eléctrica dos nervos. No início da década de 50 surgiu o meprobamato (um carbamato) e a clorpromazina (um neuroléptico), que passaram a ser bastante utilizados como ansiolíticos e sedativos. Somente em 1957 os trabalhos de Leo Sternbach e Earl Reeder levaram à síntese do primeiro benzodiazepínico, o clordiazepóxido. Este fármaco foi comercializado 1961, inaugurando a era dos benzodiazepínicos. Em 1963 foi lançado no mercado um medicamento ainda mais potente, o diazepam (Gilman, 1996 & Cordioli, 2000).

Os benzodiazepínicos foram amplamente prescritos no tratamento dos transtornos ansiosos durante toda a década de 70, como uma opção segura e de baixa toxicidade. A empolgação inicial deu lugar à preocupação com o consumo ao final da mesma década: pesquisadores começavam a detectar potencial de uso nocivo e risco de dependência entre os usuários de tais substâncias (Cordioli, 2000).

Existem hoje cerca de 35 benzodiazepínicos comercializados em todo o mundo. Estima-se que 50 milhões de pessoas façam uso diário de benzodiazepínicos, sendo a maior prevalência entre as mulheres acima de 50 anos, com problemas médicos e psiquiátricos crônicos. Os benzodiazepínicos são responsáveis por cerca de 50% de toda a prescrição de psicotrópicos (Portal Unimeds, 2007). No Brasil, há mais de 100 remédios à base de benzodiazepínicos, como por exemplo: diazepam, bromazepam, clobazam, clonazepam, estazolam, flurazepam, flunitrazepam, nitrazepam e lorazepam (Unifesp, 2005). As estruturas

Todos os fármacos benzodiazepínicos são estruturalmente derivados da 1,4-benzodiazepina-2-ona, e apresentam propriedades físicas, químicas, farmacológicas e terapêuticas muito semelhantes (Korolkovas, 2000). O lorazepam é um fármaco que pertence à classe dos benzodiazepínicos e que é utilizado como ansiolítico, sedativo-hipnótico, anticonvulsivante e miorrelaxante (Korolkovas, 2000; Kanazawa et al., 2000). É classificado como uma substância psicotrópica, pertencente à lista B1 e como tal sua venda é feita sob prescrição médica com retenção de receita (Brasil, 1998).

3.10.1.1 MECANISMO DE AÇÃO

Embora seu mecanismo exato de ação não seja conhecido, ao que parece, após interagir com um receptor específico da membrana neuronal, potencializa ou facilita a ação inibidora do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) que, por sua vez, é capaz de atenuar as reações serotoninérgicas do sistema nervoso central responsáveis pela ansiedade. Assim, o lorazepam seria um agonista (potencializador) deste sistema agindo nos receptores gabaérgicos (Portal Psiqweb, 2007)

3.10.1.2 INDICAÇÕES E USOS

O lorazepam é indicado para o tratamento da ansiedade sob todas as formas, tratamento da insônia, do mal epilético, alívio dos sintomas da síndrome de abstinência alcoólica aguda, catatonia induzida por neurolépticos, além de ser utilizado como pré-anestésico (Korolkovas, 2000).

As doses indicadas para ansiedade em adultos variam de 1 a 2 mg duas ou três vezes ao dia, podendo ser aumentada gradualmente até o máximo de 10 mg ao dia divididas em duas ou três administrações. Para insônia a dose recomendada é de 2 a 4 mg ao deitar (Korolkovas, 2000).

Em relação às interações medicamentosas o lorazepam pode ser administrado em combinação com outros fármacos, como corticosteróides, para o controle da náusea e vômito decorrentes dos tratamentos quimioterápicos. O uso de etanol e outros depressores podem aumentar os efeitos do lorazepam no sistema nervoso central. A administração concomitante com escopolamina via parenteral pode aumentar a incidência de sedação, alucinações e irritação. Existem ainda descrições de casos em que a administração de loxapina em combinação com lorazepam provocou depressão respiratória (Lacy et. al., 2005).

3.10.1.3 FARMACOCINÉTICA

O lorazepam é administrado oralmente e é estável em pH ácido, e por possuir caráter de lipossolubilidade intermediária, entre os benzodiazepínicos, é rápido e quase completamente absorvido no trato gastrointestinal atingindo a concentração plasmática máxima em cerca de duas horas. Seu nível plasmático a partir de uma dose de 2 mg pode atingir 20 ng/mL, a biodisponibilidade apresentada é de 90 a 95% e em concentrações clínicas o lorazepam se liga as proteínas plasmáticas em 65%. A meia-vida média de eliminação do lorazepam é de 15 horas e é metabolizado quase que exclusivamente por conjugação hepática originando metabólitos, dos quais o principal metabólito ativo é o desalquilorazepam que possui meia-vida de eliminação de aproximadamente 50 horas (Guerra et al., 2001; Lacy et. al., 2005). É excretado no leite materno e é eliminado na urina na forma de glicuronídeos inativos (Korolkovas, 2000).

Estão descritos na literatura vários estudos de farmacocinética do lorazepam envolvendo voluntários sadios. Samara e colaboradores (1997) ao avaliarem o efeito do valproato na farmacocinética e farmacodinâmica do lorazepam, em voluntários sadios do sexo masculino, concluíram que a coadministração com o lorazepam não afeta as propriedades farmacocinéticas do valproato. A influência do sexo e do ciclo menstrual na farmacocinética do lorazepam foi estudada por Guerra e colaboradores

(2001) em 24 voluntários sadios de ambos os sexos. Caille e colaboradores (1983) avaliaram os perfis farmacocinéticos de formulações de administração oral e sublingual, após dose múltipla, em voluntários sadios do sexo masculino e confirmaram que a formulação sublingual é absorvida mais rapidamente.

Baseado no fato de que em algumas situações a atividade farmacológica específica do fármaco está presente em apenas um enantiômero e inativa em outro, ou ainda, que este outro enantiômero possui um tipo diferente de atividade, Kanazawa et. al. (2000) investigaram através de análise estereoseletiva o lorazepam em plasma utilizando a cromatografia quiral. O lorazepam apresenta um centro de quiralidade em sua estrutura e é disponibilizado no mercado como um racemato, ou seja, uma mistura contendo quantidades iguais dos dois enantiômeros. Sendo assim, esse estudo apresentou um método de aceitável exatidão e sensibilidade que forneceu dados necessários para estudos farmacocinéticos dos enantiomêros do lorazepam presentes em amostras biológicas.

Afim de se verificar a instabilidade estereoquímica do lorazepam em amostras de plasma e urina humana, Papini e colaboradores. (2006) desenvolveram um método enantioseletivo com a finalidade de separar e quantificar as formas enantioméricas do lorazepam através da técnica da cromatografia líquida acoplada a detecção por espectrometria de massa. A aplicação deste método não permitiu a determinação dos enantiômeros em plasma e urina, e consequentemente a determinação das implicações da estereoseletividade na disposição cinética e no metabolismo. Contudo, permitiu, através dos limites de confiança do método representado pela recuperação, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão, obtidos com o padrão racêmico do fármaco, provar ser compatível à aplicação de estudos clínicos farmacocinéticos.

Kanazawa e colaboradores (1998) obtiveram sucesso ao realizarem a separação enantiomérica e a identificação do lorazepam através da detecção óptica e pela espectrometria de massa. Neste estudo, sedativos e

anestésicos foram analisados em fluidos biológicos, e o método desenvolvido, utilizando a ionização química à pressão atmosférica (APCI – *atmospheric pressure chemical ionization*), mostrou ser uma importante ferramenta no estudo da farmacocinética desses ativos.

Baseado no fato de que não haviam estudos descritos da farmacocinética do lorazepam para crianças africanas, particularmente aquelas com malária, Muchohi e colaboradores (2005) descreveram um método relativamente simples, sensível e seletivo para a determinação deste fármaco em amostras de plasma humano. O método que foi aplicado utilizou a cromatografia líquida com detecção ultravioleta que apesar de ser um método menos sensível, quando comparado à detecção por espectrometria de massa, apresentou a vantagem de ter sua aplicação em laboratórios de menores recursos financeiros, oferecendo limites de detecção e quantificação apropriados para determinação das concentrações terapêuticas do lorazepam.

3.10.1.4 ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA DE FORMAS FARMACÊUTICAS CONTENDO LORAZEPAM

Existem descritos na literatura trabalhos relacionados à biodisponibilidade e outros relacionados à bioequivalência deste fármaco. A biodisponibilidade do mesmo, administrado sob diferentes formas farmacêuticas, foi investigada por Wermeling e colaboradores em 2001. Neste estudo foi proposto comparar a biodisponibilidade e a farmacocinética do lorazepam quando administrado por via alternativa intranasal com outras duas vias usuais: intravenosa e intramuscular. Os resultados demonstraram que o lorazepam é bem absorvido quando administrado por via intranasal, tendo uma taxa de absorção maior do que quando administrado por via intramuscular, e valores de eliminação comparáveis com a da intravenosa e da intramuscular. Este estudo sugere que a via intranasal possa ser considerada como uma forma de administração não-invasiva, podendo ser utilizada como um substituto aos métodos de administração já padronizados em âmbito hospitalar.

Através do desenvolvimento de uma técnica rápida e sensível por LC-MS/MS para a determinação do lorazepam presente em amostras de plasma humano, Zhou e Lou (2005) obtiveram resultados satisfatórios para a aplicação do método em estudos de farmacocinética. Neste estudo um ensaio de bioequivalência foi aplicado e avaliou que duas formulações (teste e referência) de lorazepam, na forma de comprimidos 2,0 mg, são intercambiáveis.

Com o objetivo de investigar a farmacocinética do lorazepam e a sua aplicação em estudos de bioequivalência, Hailing e colaboradores (2005) realizaram um ensaio na qual 18 voluntários saudáveis receberam, em fases distintas e de acordo com um delineamento randomizado do tipo cross-over, uma dose oral simples de 2 mg de lorazepam na forma de comprimidos. Após a quantificação do fármaco em plasma verificou-se através dos parâmetros farmacocinéticos obtidos que não havia diferença estatística significativa entre as duas formulações, sugerindo assim que tanto o medicamento teste como o referência sejam considerados bioequivalentes.

Qiu e colaboradores (2006) também conduziram um estudo comparativo entre duas formulações com 20 voluntários chineses somente do sexo masculino, no qual cada um recebeu uma dose simples de 3 mg de lorazepam. Os resultados demonstraram que as formulações teste e referência podem ser consideradas bioequivalentes. Neste estudo a concentração plasmática máxima de lorazepam obtida para ambas as formulações foi de 36 ng/mL.

Wei-feng e colaboradores (2005) realizaram a determinação do lorazepam em plasma humano através da técnica LC-MS/MS e aplicaram o método em um estudo de bioequivalência. Otimizando a fonte de Electrospray em modo positivo quantificaram concentrações de lorazepam na ordem de ng/mL, sendo que o limite de quantificação inferior determinado foi de 0.71 ng/mL. Ao aplicarem a precipitação por acetonitrila nas amostras de plasma, obtiveram a recuperação do analito acima de 100%.

3.10.1.5 ASPECTOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LORAZEPAM EM MATRIZES BIOLÓGICAS

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta ainda é, por apresentar desejável sensibilidade, especificidade e menores custos, um método confiável para a quantificação de lorazepam em plasma, sendo uma técnica amplamente empregada em estudos de farmacocinética (Muchohi et al, 2005).

Com o avanço das técnicas de ionização, a detecção do lorazepam em matrizes biológicas por espectrometria de massa tornou-se um método de escolha, não só para estudos específicos de farmacocinética, mas para ensaios de biodisponibilidade e testes de bioequivalência (Papini, 2005; Qiu et. al., 2006; Zhu, 2005).

Embora alguns dos métodos de pré-tratamento de amostras verificados nos estudos descritos na literatura utilizem a extração em fase sólida (Kanazawa et al., 1998), o tipo mais usual é a precipitação de proteínas com acetonitrila (Zhu, 2005; Muchohi et al, 2005).

Os métodos descritos na literatura empregam colunas de fase reversa, geralmente C18 como fase estacionária. A fase móvel pode apresentar a mistura de acetonitrila e ácido fórmico conforme Zhu e colaboradores (2005) ou acetonitrila e água com 0,1% de ácido acético utilizada por Papini e colaboradores (2005). A utilização de metanol e acetato de amônio também é proposta por Andraus e colaboradores. (2004) em um estudo de bioequivalência entre duas formulações distintas de bromazepam que utilizou o lorazepam como padrão interno.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas no ensaio de bioequivalência foram obtidas de dois laboratórios farmacêuticos distintos, e designadas como produto referência (R) e produto teste (T) conforme descrito a seguir.

PRODUTO REFERÊNCIA (R)

Laboratório: Wyeth-Whitehall Ltda, Brasil

Produto: Lorax[®] (comprimidos contendo 2 mg de lorazepam)

Lote analisado: nº. 27692

Fabricação: Novembro de 2004

Validade: Novembro de 2007

PRODUTO TESTE (T)

Laboratório: Teuto Brasileiro, Brasil

Produto: Lorazepam Teuto (comprimidos contendo 2 mg de lorazepam)

Lote analisado: nº. 2332002

Fabricação: Fevereiro de 2005

Validade: Fevereiro de 2007

4.1.2 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA

As substâncias químicas de referência, lorazepam e bromazepam, foram utilizadas para o preparo de soluções de padrão (P) e padrão interno (PI) respectivamente.

Lorazepam (Lote: 1244220001; Teor: 101,50%; Validade: 07/2008; Fornecedor do padrão secundário: Laboratório Teuto Brasileiro).

Bromazepam (Lote: 0202.0500.036; Teor: 100,1%; Validade: 02/2007; Fornecedor padrão secundário: Sintefina Indústria e Comércio Ltda).

4.1.3 SOLVENTES, REAGENTES, MATERIAIS DE CONSUMO E VIDRARIA

Foram utilizados os seguintes solventes, reagentes e materiais:

- Ácido fórmico p.a., Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha);
- Acetato de amônio grau analítico, Sigma[®] Chemical Company (St.Louis, E.U.A);
- Água ultra-pura, com resistividade de 18.2 Ω , obtida através do equipamento Millipore, modelo MilliQ Academic;
- Coluna cromatográfica analítica Phenomenex[®], modelo Gemini[®] C18 110 A, de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μ m (Torrance, E.U.A);
- Diclorometano p.a., Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, E.U.A);
- Membranas filtrantes Sartorius de acetato de celulose regenerada com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 μ m (São Paulo, Brasil);
- Metanol grau cromatográfico, J.T. Baker[®] (Phillipsburg, E.U.A);

- N-Hexano grau cromatográfico, J.T. Baker® (Phillipsburg, E.U.A);
- Seringas de vidro de 10 mL, Becton Bickinson (São Paulo, Brasil);
- Tubos de vidro de 10 mL (São Paulo, Brasil);
- Tubos de vidro cônicos de 10 mL (São Paulo, Brasil);
- Unidades filtrantes Millipore, tipo GV Millex em polietileno membrana Durapore® com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 µm (São Paulo, Brasil);
- Tubos de polipropileno tipo criogênico de 3 mL (São Paulo, Brasil);
- Vidrarias calibradas, comuns de laboratório, foram utilizadas.

4.1.4 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Agitador tipo vórtex Phoenix; modelo AT56 (São Paulo, Brasil);
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB 204-S (Küsnacht, Suíça);
- Banho ultrassônico Odontobrás, modelo 2840D (São Paulo, Brasil);
- Centrífuga Heraeus, mod. Megafuge 2.0 D37520 (Hanau, Alemanha);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Scientific Instruments, composto de uma bomba LC-10ADVP, degaseificador DGU-14A e injetor automático de amostras SIL-10ADVP equipado com loop de 50 µL (Kyoto, Japão);

- Espectrômetro de massas triplo quadrupolo Micromass Quattro LC, equipado com uma fonte Z-electrospray ionization (Manchester, Reino Unido).;
- Freezer Cònsul com temperatura mínima de -20 °C (São Paulo, Brasil);
- Freezer Revco com temperatura mínima de -70 °C (Twinsburg, E.U.A);
- Pipeta automática de volume variável de 1,0 a 10,0 mL Labsystems Finnpiquette (Altricham, Reino Unido);
- Pipetas automáticas de volume fixo de 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µL Brand Transferpette (Wertheim, Alemanha);
- Refrigerador Cònsul com temperatura mínima de 0° C (São Paulo, Brasil);
- Sistema de filtração a vácuo Sartorius;
- Sistema de tratamento de água MilliQ Academic (Bedford, E.U.A);
- Software de processamento de dados, MassLynx 3.5 (Manchester, Reino Unido).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LORAZEPAM EM PLASMA HUMANO

Estão descritos na literatura alguns métodos para quantificação de lorazepam em plasma através de cromatografia líquida de alta eficiência

(Kanazawa et al., 2000; Pistos & Stewart, 2003; Zhu et. al., 2005; Papini et. al., 2005).

No presente trabalho, desenvolveu-se e validou-se método bioanalítico altamente específico e sensível, por LC – MS/MS, capaz de quantificar baixos níveis de concentração do lorazepam em amostras de plasma humano. O método que se apresentou preciso e exato, utilizando bromazepam com padrão interno, será descrito a seguir.

4.2.1.1 PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Na etapa analítica o procedimento adotado de purificação das amostras de plasma contendo padrão de lorazepam para elaboração da curva de calibração, assim como para as amostras de plasma de controle de qualidade, amostras de plasma isentas do fármaco em questão, empregadas como ‘branco’ e amostras plasmáticas de voluntários que receberam lorazepam, foi feito através de dupla extração líquido-líquido.

Antes de se estabelecer um protocolo de extração definido com a utilização do solvente de extração hexano:diclorometano (60:40 v/v) , quatro solventes de extração (éter, hexano, diclorometano e acetonitrila), na quantidade de 5,0 mL, foram testados individualmente. A comparação foi feita pela determinação, no mesmo solvente, das áreas dos picos dos cromatogramas das amostras de plasma padrão extraídas e de outras amostras padrão que não sofreram o processo de extração, não havendo a correção do volume de secagem. As concentrações de padrão e padrão interno utilizadas foram 10 ng/mL e 25 ng/mL, respectivamente.

Em tubos de vidro de 10 mL, adequados para o processo de extração, foram adicionados 50 µL de padrão interno solubilizado em 10% de metanol, o correspondente a 500 ng/mL de bromazepam, previamente seco em corrente de nitrogênio a 40 °C. Em seguida foram aliqüotados 500 µL de plasma e adicionados a cada um dos tubos. Todas as amostras foram agitadas por 30 segundos em agitador de tubos tipo vórtex. Posteriormente,

adicionaram-se 2 mL do solvente de extração hexano:diclorometano (60:40 v/v). Uma nova agitação em vórtex foi realizada por 60 segundos e em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm. Ainda dentro dos tubos as amostras foram congeladas e a fase orgânica filtrada, através de uma unidade de filtro Millex GV 0.45- μ m com membrana Durapore® de 13 mm de diâmetro, para tubos cônicos de vidro de 10 mL. Este procedimento se repetiu por mais uma vez caracterizando a dupla extração sob a fase inorgânica restante. Sob um baixo fluxo de gás de nitrogênio e à temperatura de 40 °C as amostras foram secas e posteriormente reconstituídas com 250 μ L de fase móvel, preparada de acordo com o descrito no item 4.2.1.3. Antes de serem transferidas para os *vials* para serem injetadas pelo auto injetor do cromatógrafo líquido, as amostras foram agitadas por mais 30 segundos em vórtex. A Figura 6 ilustra em forma de fluxograma o procedimento detalhado de extração de lorazepam e bromazepam (padrão interno) presentes em amostras de plasma.

Figura 6: Fluxograma referente ao procedimento de purificação de amostras destinadas a análise cromatográfica.

4.2.1.2 CONDIÇÕES ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LORAZEPAM EM PLASMA HUMANO

As condições cromatográficas para a quantificação de lorazepam em plasma humano consistiram no emprego da coluna cromatográfica analítica Phenomenex®, modelo Gemini® C18 110 A, de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5µm para a separação dos componentes.

A fase móvel consistiu de metanol e tampão acetato de amônio 10 mM (80:20, v/v), acrescida de 0,1% de ácido fórmico ao final da preparação. Antes de ser utilizada para a realização das análises, a fase móvel foi filtrada através de um sistema de membranas filtrantes Sartorius de acetato de celulose regenerada com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm. A degaseificação foi feita em aparelho de banho ultrassônico durante 20 minutos.

As análises foram realizadas a 22° C, em fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção foi de 50 µL e o tempo total de análise foi de 6 minutos por amostra.

Afim de assegurar a confiabilidade dos resultados a serem quantificados, foi acoplado de forma sequencial ao sistema de cromatografia líquida um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Micromass Quattro LC, capaz de detectar a presença do fármaco na matriz biológica com elevada sensibilidade e seletividade.

Através do espectrômetro de massas, equipado com uma fonte Z-*electrospray ionization (ESI)* e operando em modo positivo (ES+), o analito foi monitorado e quantificado por *multiple reaction monitoring (MRM)*. As transições monitoradas foram *m/z* 320,69 > 274,96 para o lorazepam e *m/z* 318,00 > 182,20 para o padrão interno. Essas transições correspondem a fragmentação da estrutura precursora originando a estrutura chamada de produto.

Durante o desenvolvimento e otimização do método, os valores para cada parâmetro de trabalho foram definidos para: temperatura da fonte, temperatura de desolvatação, fluxo do gás de desolvatação e voltagem do capilar. Os valores de energia de colisão e os de voltagem do cone também foram ajustados para lorazepam e bromazepam. O nitrogênio foi usado como gás de nebulização e o argônio, como o gás de colisão. O software de processamento de dados, MassLynx 3.5 foi usado para aquisição dos dados e quantificação de lorazepam.

4.2.1.3 QUANTIFICAÇÃO DE LORAZEPAM NAS AMOSTRAS DE PLASMA HUMANO

A quantificação de lorazepam nas amostras de plasma provenientes dos voluntários foi realizada de acordo a metodologia bioanalítica descrita no item 4.2.1.

Foram analisadas as amostras de plasma dos voluntários que receberam lorazepam, paralelamente à curva de calibração com oito pontos (0,5; 1,0; 4,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 ng/mL) e amostras em triplicata de plasma de controle de qualidade em três concentrações:

- Controle de qualidade alto (CQA): 60,0 ng/mL
- Controle de qualidade médio (CQM): 30,0 ng/mL
- Controle de qualidade baixo (CQB): 1,0 ng/mL

4.2.1.3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA PADRÃO E DE CONTROLE DE QUALIDADE

A curva de calibração e amostras de controle de qualidade representam amostras padrão de concentração conhecida, preparadas com a matriz biológica em estudo.

A análise concomitante das amostras de controle de qualidade e amostras de plasma de voluntários garante a qualidade e a estabilidade das mesmas durante todo o procedimento analítico empregado (Kano, 2002).

Além disso, sem a existência da curva de calibração, não seria possível realizar o cálculo das concentrações das amostras desconhecidas.

4.2.1.3.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE PLASMA PADRÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para garantir a estabilidade das amostras de plasma padrão da curva de calibração, estas foram preparadas diariamente a partir de soluções-padrão de 5 a 800 ng/mL de lorazepam e solução-padrão de 500 ng/mL de bromazepam, ambas em água e metanol, na proporção de 90:10 (v/v). A tubos de extração foram adicionados 50 µL de solução-padrão de bromazepam a 500 ng/mL. A seguir, adicionaram-se 50 µL de solução-padrão de lorazepam e 450 µL de plasma branco. As amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex por 30 segundos. As soluções-padrão de lorazepam e bromazepam foram armazenadas no refrigerador a 4° C, sendo a estabilidade destas monitorada diariamente durante as corridas analíticas. O Quadro 1 apresenta as diluições realizadas para obtenção das amostras de plasma padrão da curva de calibração.

Quadro 1: Obtenção de amostras de plasma padrão de lorazepam da curva de calibração.

Concentração da solução-padrão de lorazepam	Aliquota	Volume de plasma branco	Concentração final de lorazepam
5 ng/mL	50 µL	450 µL	0,5 ng/mL
10 ng/mL	50 µL	450 µL	1,0 ng/mL
40 ng/mL	50 µL	450 µL	4,0 ng/mL
100 ng/mL	50 µL	450 µL	10,0 ng/mL
200 ng/mL	50 µL	450 µL	20,0 ng/mL
400 ng/mL	50 µL	450 µL	40,0 ng/mL
600 ng/mL	50 µL	450 µL	60,0 ng/mL
800 ng/mL	50 µL	450 µL	80,0 ng/mL

4.2.1.3.3 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE PLASMA DE CONTROLE DE QUALIDADE

Foram preparadas amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações (CQB = 1 ng/mL, CQM = 30 ng/mL e CQA = 60 ng/mL), transferindo-se alíquotas de solução-padrão de lorazepam em água e metanol (90:10, v/v), nas concentrações de 100 ng/mL e 600 ng/mL para balões volumétricos de 50 mL, conforme descrito no Quadro 2. Posteriormente, foi adicionado plasma branco que foi homogeneizado de forma a evitar a formação de espuma. Após completar o volume, agitou-se vigorosamente para garantir a completa homogeneização. Ao final do preparo, estas amostras foram alíquotadas em frascos de polipropileno de 3 mL, devidamente identificados com a concentração e a data de preparo. Em seguida foram armazenadas em freezer a -20°C.

Quadro 2. Obtenção de amostras de plasma de controle de qualidade de lorazepam

Controle de Qualidade	Concentração da solução-padrão de lorazepam	Aliquota	Volume de plasma	Concentração final de lorazepam
CQB	100 ng/mL	500 µL	50 mL	1 ng/mL
CQM	600 ng/mL	2500 µL	50 mL	30 ng/mL
CQA	600 ng/mL	5000 µL	50 mL	60 ng/mL

4.2.1.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LORAZEPAM EM PLASMA HUMANO

A validação foi realizada conforme critérios estabelecidos na resolução nº.899 (Brasil, 2003a), através da determinação dos parâmetros especificidade, linearidade (curva de calibração), precisão e exatidão intra e inter dias, limite de quantificação inferior e superior, limite de detecção, recuperação e estudo de estabilidade, contemplando a estabilidade de curta duração, estabilidade nos ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade pós processamento, estabilidade de longa duração e estabilidade das soluções padrões. Além da validação completa do método, validações diárias das corridas analíticas foram realizadas para monitoramento da qualidade dos procedimentos, através da análise das amostras de plasma de controle de qualidade.

4.2.1.4.1 ESPECIFICIDADE

É a capacidade que o método possui de identificar exatamente um composto em presença de outros componentes, sejam ele exógenos ou endógenos, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (Brasil, 2003a).

Pode-se definir ainda, a especificidade como sendo a busca individualizada do sinal de uma espécie única do analito (Brasil, 2002b).

A especificidade do método foi verificada usando-se seis amostras de plasma humano branco obtidas de voluntários saudáveis que não receberam lorazepam. Destas seis amostras plasmáticas, uma foi de plasma lipêmico, que corresponde a uma amostra de plasma obtida de voluntário após receber uma refeição rica em lipídios. A outra foi uma amostra hemolisada obtida por congelamento e descongelamento do sangue de voluntário seguida de centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos.

A interferência do anticoagulante (heparina), presente nos tubos de coleta, também foi verificada durante este estágio.

4.2.1.4.2 RECUPERAÇÃO

A recuperação corresponde ao resultado obtido após análises de amostras de plasma branco acrescidas de padrão, submetidas à pré-tratamento, expresso como porcentagem do resultado obtido após análise de amostras de padrão, não submetidas à pré-tratamento (Causon, 1997).

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (Brasil, 2003a).

Este parâmetro foi determinado comparando-se em replicata ($n=5$) as áreas dos picos dos cromatogramas das amostras de plasma padrão extraídas e de outras amostras padrão que não sofreram o processo de extração em três diferentes concentrações (concentrações das amostras-padrão de controle de qualidade baixo, médio e alto).

O valor em área das amostras extraídas deve ser corrigido, uma vez que durante o processo de preparo existem perdas de volume. Assim, após a segunda etapa de filtração na qual foi utilizado um volume total de 4 mL, foram retirados para a secagem um volume fixo de 3 mL. A razão entre o volume total e o volume para a secagem multiplicado pela média das áreas das amostras extraídas corresponde a área corrigida.

4.2.1.4.3 LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO (LIQ) E LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O LIQ é estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Deve apresentar resposta igual ou superior a cinco vezes qualquer interferência da amostra branca no tempo de retenção do fármaco (Brasil, 2003a).

O limite de quantificação inferior foi determinado analisando-se amostras (em quintuplicata) de concentrações decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120%.

O limite de detecção (LD) foi estabelecido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2003a).

4.2.1.4.4. LIMITE SUPERIOR DE QUANTIFICAÇÃO (LSQ)

É a maior quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão de 15% e exatidão de 85 a 115%.

O LSQ deve apresentar uma concentração maior ou igual a 120% da concentração mais alta que se pretende analisar (Brasil, 2003a).

4.2.1.4.5 LINEARIDADE

É a capacidade de um método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (Brasil, 2003a).

A linearidade é obtida através da construção da curva de calibração, que representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. O coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou superior a 0,98 (Brasil, 2003a).

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 6 concentrações diferentes do padrão do fármaco. O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação inferior (LIQ) até 120 % da concentração mais alta que se pretende analisar de um método bioanalítico (Brasil, 2003a).

A linearidade do método foi testada utilizando-se oito concentrações diferentes, no intervalo de 0,50 a 80,0 ng/mL de lorazepam em plasma humano adicionado de padrão interno. Para cada ponto da curva de calibração, cinco repetições foram realizadas.

A curva de calibração incluiu ainda a análise da amostra de plasma “branco” (amostra de plasma isento de padrão de lorazepam e de padrão interno), e da amostra “zero” (plasma isento de padrão adicionado de padrão interno).

Foi estabelecida a correlação linear, considerando variável independente a concentração (x) e variável dependente a área do pico (y). Os parâmetros de correlação foram estimados através do método dos mínimos quadrados (Brasil, 2003a).

4.2.1.4.6 PRECISÃO

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (Brasil, 2003a). É uma medida de erro aleatório expressa como coeficiente de variação (C.V%) dessas medidas (Causon, 1997).

A precisão deve ser determinada em um mesmo ensaio (precisão intra-dia) que se refere ao C.V. obtido por repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, em curto intervalo de tempo (por exemplo, mesmo dia). A precisão inter-dias é obtida por meio de alterações de condições ou utilização do método durante um maior intervalo de tempo, como semanas ou meses (Romeu, 2002) .

A precisão do método foi determinada analisando-se amostras de três concentrações diferentes de lorazepam (concentrações das amostras-padrão de controle de qualidade baixa, média e alta), em cinco réplicas no mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em dias diferentes, não necessariamente consecutivos (precisão inter-ensaio). O CV foi calculado, não se admitindo valores superiores a 15%, segundo a seguinte equação:

$$\text{C.V. (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100$$

4.2.1.4.7 EXATIDÃO

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro ou mais provável da grandeza. É uma medida de erro sistemático (Brasil, 2003a).

O referido parâmetro foi determinado pela análise de amostras de três diferentes concentrações de padrão (concentrações das amostras-padrão de controle de qualidade baixo, médio e alto) em cinco réplicas no mesmo dia (exatidão intra-ensaio) e em dias diferentes, não necessariamente consecutivos (exatidão inter-ensaio). A exatidão foi calculada, não se admitindo valores superiores a 15%, segundo a seguinte equação:

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

4.2.1.4.8 ESTABILIDADE

A avaliação da estabilidade dos fármacos contidos em amostras plasmáticas e seus extratos, durante o tempo necessário a conclusão das análises, visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado, sendo então capaz de subsidiar a confiabilidade dos resultados (Souza, 2005).

Para avaliar se as amostras plasmáticas contendo o fármaco lorazepam se manteriam estáveis em condições pré-determinadas, possibilitando assim a aplicação do método bioanalítico ao estudo de bioequivalência, os testes foram realizados conforme recomendado pela Resolução nº. 899 de 29 de Maio de 2003. Para a realização do estudo de estabilidade devem ser observados os parâmetros previamente validados, como a exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e especificidade. As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Estas são descritas a seguir.

4.2.1.4.9 ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO

Foram utilizadas três amostras de plasma de controle de qualidade nas três concentrações preparadas (CQB, CQM e CQA). Essas foram submetidas ao descongelamento natural e mantidas à temperatura ambiente de 4 horas e analisadas. Os resultados foram comparados com os obtidos da análise das amostras analisadas imediatamente após o preparo e devem estar dentro de um desvio não superior a 15% (Brasil, 2003a).

4.2.1.4.10 ESTABILIDADE EM CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

Três amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações (baixo, médio e alto), foram submetidas às seguintes condições: congelamento a -20°C por, no mínimo, 12 horas, descongelamento e recongelamento por, no mínimo, 12 horas e assim sucessivamente até completar três ciclos e foi determinado, em cada um deles, inclusive no tempo zero, a concentração do fármaco nas amostras de plasma de controle de qualidade. O tempo zero é correspondente a preparação das amostras de plasma de controle de qualidade e análise das mesmas sem submetê-las ao congelamento. Os resultados foram comparados com os obtidos da análise das amostras do tempo zero e devem estar dentro de um desvio não superior a 15% (Brasil, 2003a).

4.2.1.4.11 ESTABILIDADE NO TEMPO E CONDIÇÕES DE ANÁLISE (PÓS-PROCESSAMENTO)

Para se testar a estabilidade do padrão na matriz biológica durante o tempo de espera no auto-injetor, foram utilizadas três amostras, em triplicata, de plasma de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA), submetidas a descongelamento natural, processo de extração e manutenção à temperatura ambiente durante 24 horas. Após estes períodos as amostras foram analisadas, sendo os resultados comparados com os de amostras analisadas imediatamente após o preparo. O desvio aceito poderá ser de somente +/- 15% (Brasil, 2003a).

4.2.1.4.12 ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO

Este parâmetro avalia o intervalo de tempo em que as amostras de plasma dos voluntários podem ficar armazenadas sem comprometer a estabilidade das mesmas. Logo, a estabilidade de longa duração deve

exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última.

Assim, três amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta) foram preparadas e mantidas a -20°C . Estas amostras foram analisadas após um período de tempo igual ao de armazenamento das amostras de plasma de voluntários que receberam lorazepam. Durante o estudo foi avaliada a estabilidade das amostras de controle de qualidade após 30 dias de preparo. Para verificação dessa estabilidade os resultados foram comparados com os de amostras analisadas imediatamente após o preparo, sendo que o desvio aceito foi de 15% (Brasil, 2003a).

4.2.1.4.13 ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO

Foi analisada a estabilidade das soluções-padrão do fármaco e seu padrão interno utilizadas para a preparação da curva de calibração. Essas soluções tiveram seu armazenamento sob a temperatura de 4°C com variação de $\pm 6^{\circ}\text{C}$.

Para avaliar a estabilidade das soluções-padrão foram preparadas diariamente curvas de calibração em água e metanol, na proporção de 90:10 (v/v). Essas foram analisadas durante a etapa e em conjunto com a análise das amostras de voluntários do estudo. A concentração escolhida da curva de calibração como padrão de referência para a avaliação da estabilidade foi a de 40 ng/mL . A estabilidade do padrão interno, presente também nas amostras na concentração de 25 ng/mL , foi avaliada concomitantemente.

Os resultados desse teste, inicialmente expressos em valores de área, foram reportados em valores de concentração calculada pelo software MassLynx 3.5 e foram comparados com os obtidos utilizando-se soluções recentemente preparadas do fármaco e do padrão interno. As amostras serão consideradas estáveis quando não se observar um desvio superior a

15% do valor obtido das amostras analisadas imediatamente após o preparo (Brasil, 2003a).

4.2.1.5 AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS MEDICAMENTOS TESTE E REFERÊNCIA

O ensaio clínico de bioequivalência foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Anexo A) e pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Anexo B). Todo o ensaio cumpriu rigorosamente o protocolo de estudo BF 080405 (Anexo C)

4.2.1.5.1 CASUÍSTICA

Um total de 26 voluntários saudáveis, 13 homens e 13 mulheres, foram selecionados para participar do estudo após serem informados do objetivo da pesquisa e de assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo D).

Contudo, dois voluntários, independentemente de qualquer intercorrência, expressaram desejo de abandonar o estudo. Portanto, o ensaio foi concluído com 24 voluntários sadios, sendo 11 homens e 13 mulheres. Estes indivíduos tinham a idade média de 33 anos, peso corporal médio de 64 kg e a média de altura de 1.67 m (Tabela 1) Todos os voluntários foram devidamente informados sobre as características da pesquisa e satisfizeram os critérios recomendados pela Resolução RE nº. 478 (Brasil, 2002c):

- não fumantes;
- bom estado de saúde, idade entre 21 e 45 anos, e peso dentro do ideal $\pm 15\%$, calculado pela fórmula $PI = (h - 100)$ para homens e $PI = 0,9 \times (h - 100)$ para mulheres, em que PI é o peso ideal (kg) e h, a altura do voluntário em centímetros;

- ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;
- não devem estar em tratamento com medicamentos;
- voluntárias do sexo feminino não devem estar em estado de gravidez (comprovado através de exame laboratorial) ou em período de amamentação

A inclusão dos voluntários foi baseada nos resultados dos seguintes exames laboratoriais:

- hemograma completo;
- uréia;
- creatinina;
- fosfatase alcalina;
- glicemia;
- bilirrubina total;
- proteínas totais e albumina;
- transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP);
- ácido úrico;
- colesterol total;
- triglicérides;
- urina tipo I;
- sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C;
- β -HCG para mulheres;
- eletrocardiograma com doze derivações.

Todos os exames laboratoriais, exceto a sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C, foram realizados também no período pós-estudo.

Tabela 1 Características dos voluntários incluídos no ensaio de bioequivalência

Voluntário	Sexo	Idade	Altura (cm)	Peso (kg)	D.P.I.(%)
1	M	29	173	79	9
2	M	41	176	74	-2
4	M	22	166	66	1
5	M	25	180	71	-11
6	M	23	170	61	-13
7	M	34	178	83	6
8	M	39	176	71	-7
10	M	24	179	77	-2
11	M	36	173	82	12
12	M	30	166	69	4
13	M	30	173	77	5
14	F	32	167	68	12
15	F	25	162	51	-9
16	F	44	165	63	8
17	F	29	162	63	12
18	F	33	159	51	-4
19	F	41	155	54	9
20	F	39	153	50	6
21	F	42	164	62	7
22	F	32	157	52	0
23	F	33	159	59	10
24	F	36	159	55	4
25	F	36	169	56	-10
26	F	27	166	55	-7
média		33	167	64	
DP		6	8	11	

D.P.I.=desvio do peso ideal; D.P.= desvio padrão. Os voluntários 3 e 9 desistiram da participação no estudo por motivos pessoais.

4.2.1.5.2 PROCEDIMENTO DO ENSAIO DE BIOEQUIVALÊNCIA

O ensaio clínico de bioequivalência realizado foi do tipo aleatório, cruzado, formando-se dois grupos (A e B) com igual número de voluntários. Na fase 1, os voluntários do grupo A receberam dois comprimidos do produto Lorax[®], contendo 2 mg de lorazepam (dose total de 4 mg), empregado como produto referência (R), enquanto os do grupo B receberam dois comprimidos do produto Lorazepam Teuto, contendo 2 mg de lorazepam (dose total de 4 mg), empregado como produto teste (T). Na fase 2 o procedimento foi invertido, de modo que cada um dos voluntários recebeu os dois produtos em estudo (Tabela 2).

Entre as fases houve um período de “wash out” adequado, correspondente a, no mínimo, 10 vezes o valor da meia-vida de eliminação da lorazepam. No presente estudo, este período foi de 10 dias.

Os produtos foram administrados aos voluntários pela manhã, após jejum de 8 horas, e foram ingeridas com auxílio de 250 mL de água. Os voluntários receberam almoço, lanche e jantar padronizados respectivamente quatro, sete e dez horas após a administração.

Os voluntários não ingeriram bebidas alcoólicas, café e outras bebidas contendo xantinas no período de 48 que antecederam o ensaio e durante a sua realização. Além disso, não tomaram qualquer medicamento por uma semana antes do estudo ou durante sua realização.

Ficou esclarecido para os voluntários que após a conclusão do estudo não haveria restrições e nem proibições.

Tabela 2 Lista de randomização do ensaio de bioequivalência

Voluntário	Sexo	Fase 1	Fase 2
1	M	R	T
2	M	T	R
4	M	T	R
5	M	R	T
6	M	R	T
7	M	T	R
8	M	T	R
10	M	R	T
11	M	T	R
12	M	T	R
13	M	T	R
14	F	R	T
15	F	T	R
16	F	R	T
17	F	R	T
18	F	T	R
19	F	R	T
20	F	T	R
21	F	R	T
22	F	R	T
23	F	T	R
24	F	T	R
25	F	R	T
26	F	T	R

Os voluntários 3 e 9 desistiram da participação no estudo por motivos pessoais.

4.2.1.5.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de 8 mL de sangue em tubo heparinizado a 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0; 24,0; 48,0; 72,0; 96,0 horas após a administração dos produtos. Portanto, foram retirados de cada voluntário 128 mL de sangue por período e 256 mL no total do ensaio. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas (3000 a 4000 rpm por 10 minutos) para a separação do plasma e este permaneceu congelado a -20°C até a realização do ensaio para quantificação do fármaco.

4.2.1.5.4 QUANTIFICAÇÃO DE LORAZEPAM NAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS VOLUNTÁRIOS

A etapa analítica teve início logo após a segunda fase da etapa clínica e foi realizada conforme descrito nos itens 4.2.1.1, 4.2.1.3 e 4.2.1.4 no período de duração de 27 dias de forma a garantir a estabilidade das amostras de plasma dos voluntários.

4.2.1.5.5 AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS MEDICAMENTOS TESTE E REFERÊNCIA

A avaliação da bioequivalência entre os medicamentos Lorax[®], produzido pelo laboratório Wyeth-Whitehall Ltda (referência) e Lorazepam Teuto, produzido pelo laboratório Teuto Brasileiro, consistiu no estudo comparativo entre as biodisponibilidades dos dois produtos avaliadas sob condições padronizadas.

Empregaram-se parâmetros farmacocinéticos relacionados aos processos de absorção e eliminação do fármaco a partir da forma farmacêutica comprimido, produzidos de maneira distinta para cada um dos medicamentos avaliados.

Esses parâmetros relacionam-se à quantidade e a velocidade de absorção do fármaco e são descritos a seguir:

- **ASC_{0-t}** : expressa a área sob a curva da concentração plasmática do fármaco em função do tempo sendo representada em um gráfico. A área delimitada é determinada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao tempo t , no qual t é o tempo relativo à última concentração determinada experimentalmente (Dipiro, 1996).
- **$ASC_{0-\infty}$** : consiste na extrapolação do cálculo da ASC_{0-t} ao tempo infinito pela soma de ASC_{0-t} a razão entre a última concentração determinada experimentalmente (C_t) e a constante de eliminação da fase terminal (K_{el}) (Brasil, 2006b).

De acordo com a resolução RE 1170 de 19 de Abril de 2006, a ASC_{0-t} deve ser igual ou superior a 80% da $ASC_{0-\infty}$ (Brasil, 2006b).

- **C_{max}** : concentração plasmática máxima que o fármaco atinge após a administração.
- **T_{max}** : tempo necessário para que a concentração plasmática máxima seja atingida.

Para os parâmetros relacionados com a velocidade de eliminação do fármaco foram adotados:

- **$t_{(1/2)\beta}$** : meia-vida de eliminação plasmática do fármaco. Corresponde ao tempo para que a concentração plasmática do fármaco seja reduzida a 50%.
- **K_{el}** : constante de velocidade de eliminação do fármaco

4.2.1.5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA APLICADA AO ENSAIO DE BIOEQUIVALÊNCIA

O delineamento estatístico dos resultados foi realizado de acordo com os critérios estabelecidos pelas resoluções RE nº. 1170 (Brasil, 2006b), RE nº. 898 (Brasil, 2003d) e pela Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeia, 2004). Inicialmente, para a verificação dos efeitos de produto, grupo e período, foi realizada análise multivariada utilizando-se análise de variância (ANOVA) para os parâmetros $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} , na escala original e na escala logarítmica. Para $T_{\max}$ a escala utilizada na análise de variância foi a linear. Em seguida, determinou-se o intervalo de confiança 90 % (I.C. 90 %) para as relações entre os valores de $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} dos produtos teste e referência, utilizando-se para tal a escala logarítmica dos valores dos referidos parâmetros. Os dois produtos são considerados bioequivalentes se os intervalos de confiança de 90 % para as relações entre os valores de $C_{\max}$ e ASC_{0-t} de ambos os produtos, calculados com base nas transformações logarítmicas, estiverem entre 80 e 125%, isto é:

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

$$80 \leq \frac{ASC \text{ (teste)}}{ASC \text{ (referência)}} \leq 125$$

$C_{\max}$.=Concentração plasmática máxima; ASC.= Área sob a curva

O cálculo da análise de variância (ANOVA) e do intervalo de confiança (IC) 90% para os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, antes e após transformação logarítmica foi realizado utilizando os programas SAS (versão 612, 1996, Cary, NC, USA, fabricado pelo SAS Institute Inc.) A detecção de dados discrepantes e não paramétricos foi realizada no SPSS (versão 8.0, 1997, fabricado por Spss Inc.).

5. RESULTADOS

5.1 MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LORAZEPAM EM PLASMA HUMANO

5.1.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LORAZEPAM EM PLASMA HUMANO

O teste comparativo de recuperação feito entre os quatro solventes permitiu verificar que os melhores valores de recuperação do padrão e o padrão interno foram para o hexano e o diclorometano conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Valores, obtidos com a utilização de quatro solventes distintos, de recuperação de lorazepam (padrão) e bromazepam adicionados às amostras de plasma.

Solvente	Padrão = 10 ng/mL			Padrão Interno = 25 ng/mL		
	Amostra Extraída	Matriz extraída + Padrão	Recuperação (%)	Amostra Extraída	Matriz extraída + Padrão	Recuperação (%)
Éter	8060	9264	87	24524	26089	94
Hexano	9887	9240	107	28271	26177	108
Diclorometano	9660	9288	104	18283	26119	70
Acetonitrila	11004	9170	120	22772	26175	87

Os parâmetros de otimização do espectrômetro de massas foram ajustados com os respectivos valores: temperatura da fonte, 100 °C; temperatura de desolvatação, 320°C; fluxo do gás de desolvatação, 447 L/hr e voltagem do capilar, 3.0 kV. Os valores de energia de colisão foram 25 e 30 eV e os de voltagem do cone foram de 30 e 35 kV para lorazepam e bromazepam, respectivamente. Com isso, intensidades máximas de sinal para a relação massa/carga do lorazepam e bromazepam foram obtidas conforme mostrado nos espectros de massas das Figuras 7 e 8.

Figura 7- Espectro de massas do lorazepam obtido pela ionização em modo positivo

Figura 8 - Espectro de massas do bromazepam obtido pela ionização em modo positivo.

A ionização em modo positivo e fragmentação, gerada pela energia do gás de colisão (Argônio), das estruturas precursoras de lorazepam e bromazepam seguiram modelos propostos conforme apresentado nas

Figuras 9 e 10. Os espectros de massas gerados da fragmentação das estruturas precursoras de lorazepam e bromazepam estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

Figura 9 - Modelo de ionização e fragmentação proposto para a estrutura precursora de lorazepam obtido em modo positivo.

Figura 10 - Modelo de ionização e fragmentação proposto para a estrutura precursora de bromazepam obtido em modo positivo.

Figura 11 - Espectro de massas da fragmentação da estrutura precursora do lorazepam obtido em modo positivo.

Figura 12 - Espectro de massas da fragmentação da estrutura precursora do bromazepam obtido em modo positivo.

5.1.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LORAZEPAM EM PLASMA HUMANO

5.1.2.1 ESPECIFICIDADE

O método desenvolvido demonstrou-se específico para lorazepam e bromazepam (padrão interno). Os fármacos apresentaram boa separação dos componentes do plasma, com tempo de retenção de 5,2 e 4,7 minutos, respectivamente (Figura 13). Verificou-se que os tempos de retenção para as substâncias analisadas foram de aproximadamente, duas vezes o tempo de retenção correspondente ao volume morto da coluna (V_0), indicando com isso uma boa afinidade do analito e do padrão interno pela fase estacionária. O tempo morto (t_0) estimado foi de 2,5 minutos através da seguinte equação (Skoog et. al., 2006):

$$t_0 = \frac{\pi \cdot (r)^2 \cdot h}{2 \cdot \phi}$$

Onde:

π = pi= 3,1416

r = raio da coluna (cm)

h = altura da coluna (cm)

ϕ = fluxo aplicado na fase móvel que passa pela coluna (cm³/min)

O fator de retenção (K), que corresponde a razão entre a quantidade da substância com afinidade pela fase estacionária e a quantidade pela fase móvel, foi calculado para cada uma das substâncias analisadas segunda a equação abaixo descrita (Skoog et. al., 2006):

$$K = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Onde:

t_r = tempo de retenção do analito (min)

t_0 = tempo morto (min)

Para o analito lorazepam o fator de retenção (K) foi de 1,08 e para o padrão interno bromazepam o fator de retenção (K) foi de 0,88. Portanto, o lorazepam (t_r = 5,2 min) por ter maior afinidade, tem maior K em relação ao bromazepam (t_r = 4,7 min), pela fase estacionária.

Os cromatogramas típicos de MRM da amostra de plasma branco humano usado (Figura 14) e da amostra de plasma branco adicionado de padrão interno (Figura 15) não revelaram nenhum pico capaz de interferir nos tempos de retenção, potencializar ou suprimir os sinais cromatográficos do lorazepam e do bromazepam, indicando assim que substâncias endógenas potencialmente interferentes não estavam presentes.

Figura 13- Cromatogramas MRM do analito lorazepam (L), na concentração de 1ng/mL, com tempo de retenção de 5,2 minutos e do padrão interno bromazepam (B) com tempo de retenção de 4,7 minutos.

Figura 14 - Cromatogramas MRM da amostra de plasma branco humano

Figura 15 Cromatograma MRM da amostra de plasma branco adicionado de padrão interno (PI).

O método proposto mostrou-se específico ainda para amostras de plasma branco hemolisado (Figura 16) e branco lipêmico (Figura 17) de voluntários sadios.

Figura 16: Cromatograma MRM da amostra de plasma branco hemolisado de voluntário sadio.

Figura 17: Cromatograma MRM da amostra de plasma branco lipêmico de voluntário sadio.

5.1.2.2. RECUPERAÇÃO

A recuperação média do procedimento de purificação de amostras de plasma de controle de qualidade foi de 93,37% para lorazepam e 97,99% para bromazepam, com precisão e exatidão dentro dos limites de +/- 15% (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de recuperação de lorazepam (padrão) e bromazepam adicionados às amostras de plasma, empregando-se para purificação a mistura de hexano e diclorometano na proporção 60:40 (v/v).

Concentração de Lorazepam	CQB = 1ng/mL		CQM = 30 ng/mL		CQA = 60 ng/mL	
Tipo de amostra	Amostra Extraída	Matriz extraída + Padrão	Amostra Extraída	Matriz extraída + Padrão	Amostra Extraída	Matriz extraída + Padrão
Valores em área	485	838	11870	18563	25881	38362
	576	822	12645	17855	26703	40152
	448	657	12428	17267	27073	35409
	522	618	15018	18063	29483	36902
	497	652	13096	18643	26435	39401
Média (Área)	505,60	717,40	12811,33	18171,33	26733,83	38681,33
Área corrigida	674,13		17081,78		35645,11	
Desvio Padrão (DP)	47,57	104,03	1184,21	551,79	1557,10	2314,03
Precisão (CV%)	7,05	14,50	6,93	3,04	4,37	5,98
Recuperação (%)	93,97		94,00		92,15	
Recup. (%) Média			93,37			
DP			1,06			
CV%			1,14			

Concentração de Bromazepam	Padrão Interno = 25 ng/mL					
Tipo de amostra	Amostra Extraída	Matriz extraída + PI	Amostra Extraída	Matriz extraída + PI	Amostra Extraída	Matriz extraída + PI
Valores em área	5892	10159	6113	8974	6647	9385
	6326	10330	6046	8556	6932	10064
	5687	8466	6397	7582	7425	8216
	6109	7728	7643	8649	8086	9115
	6174	8126	6710	8591	7130	9323
Média (Área)	6037,60	8961,80	6524,17	8540,33	7190,33	9371,67
Área corrigida	8050,13		8698,89		9587,11	
Desvio Padrão (DP)	250,50	1201,24	597,20	498,67	508,90	700,55
Precisão (CV%)	3,11	13,40	6,87	5,84	5,31	7,48
Recuperação (%)	89,83		101,86		102,30	
Recup. (%) Média			97,99			
DP			7,07			
CV%			7,22			

5.1.2.3 LINEARIDADE

O método mostrou-se linear na faixa de 0,5 ng/mL a 80,0 ng/mL. A equação da reta utilizada foi $y = a + bx$ ($1/X$); onde (a) é o coeficiente angular e (b) é o coeficiente linear.

A Figura 18 apresenta a curva de calibração calculada com base nos dados obtidos pela média dos valores individuais de cada concentração das seis curvas de calibração tomadas individualmente. Os parâmetros relativos a estas curvas estão representados na Tabela 5.

Figura 18: Curva de calibração de lorazepam em plasma obtida por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa.

Tabela 5: Resultados estatísticos relativos as seis curvas de calibração do método bioanalítico para quantificação de lorazepam em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa.

Curva de calibração	Coefficiente angular(a)	Coefficiente linear(b)	Coefficiente de Correlação (r^2)	Erro de correlação da curva
1	0,049212	0,014482	0,997013	0,012105
2	0,050251	0,013246	0,993350	0,012409
3	0,050584	0,012898	0,995317	0,018198
4	0,051288	0,012668	0,998697	0,017003
5	0,050637	0,012910	0,999041	0,023571
6	0,050625	0,015028	0,993847	0,011935
Média das curvas	0,050433	0,013539	0,996211	-----
Precisão (%) entre os valores individuais das seis curvas.	1,361176	7,204819	0,243432	-----
Curva Média	0,050395	0,012959	0,995946	-----
Desvio (%)	-0,08	-4,47	-0,03	-----

*Desvio = desvio calculado entre os valores obtidos pela curva média e a média das curvas

5.1.2.4 LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO (LIQ) E LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite inferior de quantificação determinado, conforme o item 4.2.1.4.3, foi de 0,50 ng/mL com precisão de 5,89% e exatidão de 80,29%.

Este limite apresentou resposta superior a cinco vezes a qualquer interferência da amostra branca no tempo de retenção do analito conforme ilustrado na Figura 19.

A menor concentração do analito que o método bioanalítico conseguiu diferenciar confiavelmente do ruído de fundo foi de 0,25 ng/mL. Sendo portanto este valor considerado como o limite de detecção (LD).

Figura 19: Cromatograma do analito lorazepam, na concentração correspondente ao limite de quantificação inferior (LIQ) de 0,50 ng/mL

5.1.2.5 PRECISÃO

A precisão do método esteve entre 2,14 % e 2,86 % para amostras analisadas no mesmo dia (intra-dia) e entre 5,46 % e 6,91 % para amostras analisadas em dias diferentes (inter-dias). Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

5.1.2.6 EXATIDÃO

A exatidão do método para lorazepam está resumida na Tabela 6. Todas as amostras de plasma de controle de qualidade apresentaram um desvio menor que +/- 15 %.

Tabela 6: Precisão e exatidão intra-dia e inter-dias referentes a método analítico para quantificação de lorazepam em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor foi obtido a partir de seis determinações para precisão e exatidão intra-dia e réplicas de cinco determinações por dia, em três dias, para precisão e exatidão inter-dias.

Concentração (ng/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia	Inter-dias	Intra-dia	Inter-dias
1	2,74	6,54	89,25	91,45
30	2,86	5,46	96,75	98,79
60	2,14	6,91	96,89	103,47

5.1.2.7 ESTABILIDADE

5.1.7.1 ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO

A estabilidade de curta duração foi avaliada mantendo-se amostras padrão de plasma de controle de qualidade, em três níveis de concentração, à temperatura ambiente por 4 horas. Após este período estas amostras foram processadas e analisadas. Os resultados foram comparados com amostras analisadas imediatamente após o preparo (Tabela 7).

Tabela 7: Estabilidade de lorazepam em amostras de plasma, analisadas após permanência à temperatura ambiente por 4 horas. Cada resultado representa a média de três determinações.

Conc. Nominal (ng/mL)	Amostras analisadas imediatamente após o preparo			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente			
	Conc.deter (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc.deter (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	*Desvio (%)
1	0,95	5,04	95,37	1,01	3,09	100,67	6,32
30	30,03	2,79	100,11	31,46	3,05	104,86	4,76
60	60,14	2,85	100,24	63,30	2,15	105,50	5,25

*Desvio = desvio em relação às amostras analisadas imediatamente após o preparo

5.1.2.7.2 ESTABILIDADE EM CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

A avaliação dos resultados da estabilidade das amostras de controle de qualidade avaliadas por três ciclos de congelamento e descongelamento

mostram que estas se mantiveram estáveis, apresentando precisão e exatidão aceitáveis (Tabelas 8, 9 e 10).

Tabela 8: Estabilidade de lorazepam em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetida a um ciclo de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações

Conc. Nominal (ng/mL)	Amostras analisadas imediatamente após o preparo			Ciclo 1			
	Conc.dete r(ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc.dete r(ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	*Desvio (%)
1	0,95	5,04	95,37	1,01	5,74	100,77	6,32
30	30,03	2,79	100,11	29,45	30,2	98,16	-1,93
60	60,14	2,85	100,24	59,80	4,62	99,67	-0,57

*Desvio = desvio em relação às amostras analisadas imediatamente após o preparo no tempo zero

Tabela 9: Estabilidade de lorazepam em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetida a dois ciclos de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações

Conc. Nominal (ng/mL)	Amostras analisadas imediatamente após o preparo			Ciclo 2			
	Conc.dete r(ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc.dete r(ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	*Desvio (%)
1	0,95	5,04	95,37	0,92	5,07	92,19	-3,16
30	30,03	2,79	100,11	29,16	4,45	97,21	-2,90
60	60,14	2,85	100,24	63,32	0,63	105,54	5,28

*Desvio = desvio em relação às amostras analisadas imediatamente após o preparo no tempo zero

Tabela 10: Estabilidade de lorazepam em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de 20°C e submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações

Conc. Nominal (ng/mL)	Amostras analisadas imediatamente após o preparo			Ciclo 3			
	Conc.det er(ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc.det er(ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	*Desvio (%)
1	0,95	5,04	95,37	1,06	1,49	105,88	11,58
30	30,03	2,79	100,11	31,38	3,47	104,59	4,50
60	60,14	2,85	100,24	67,68	1,75	112,79	12,54

*Desvio = desvio em relação às amostras analisadas imediatamente após o preparo no tempo zero

5.1.2.7.3 ESTABILIDADE NO TEMPO E CONDIÇÕES DE ANÁLISE (PÓS-PROCESSAMENTO)

A Tabela 11 apresenta os resultados de precisão e exatidão obtidos na avaliação da estabilidade de pós-processamento que foi determinada pela utilização de amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao mesmo tratamento que as amostras de plasma de voluntários a serem analisadas, ou seja, descongelamento natural à temperatura ambiente e preparação conforme método validado previamente descrito. Estas amostras foram utilizadas para avaliar a estabilidade durante o período máximo de espera no injetor automático (correspondente a 24 horas) até a introdução da amostra no sistema cromatográfico.

Tabela 11: Estabilidade de lorazepam em amostras de plasma analisadas 24 horas após o procedimento de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações.

Conc. Nominal (ng/mL)	Amostras analisadas imediatamente após o preparo			Amostras analisadas 24 horas após o processamento			
	Conc. real (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. real (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	*Desvio (%)
1	0,95	5,04	95,37	0,97	6,04	96,63	2,10
30	30,03	2,79	100,11	32,17	0,53	107,22	7,13
60	60,14	2,85	100,24	57,57	13,06	96,66	-4,27

*Desvio = desvio em relação às amostras analisadas imediatamente após o preparo

5.1.2.7.4 ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO

A avaliação da estabilidade de longa duração mostrou que amostras mantidas a -20°C são estáveis por 235 dias. A tabela 12 apresenta resultados de precisão e exatidão entre as amostras quantificadas no tempo zero, que corresponde ao primeiro preparo, e que foram comparados aos resultados das amostras quantificadas após 235 dias.

Tabela 12: Estabilidade de longa duração em amostras de controle de qualidade armazenadas por 235 dias a temperatura de -20°C.

	CQB (ng/mL)		CQM (ng/mL)		CQA (ng/mL)	
	Concentração no tempo zero	Concentração após 235 dias	Concentração no tempo zero	Concentração após 235 dias	Concentração no tempo zero	Concentração após 235 dias
	0.91	NQ	29.17	25.88	59.52	54.89
	0.95	0.87	30.09	27.40	62.09	57.76
	1.00	0.88	30.84	27.84	58.83	56.67
Média	0.95	0.88	30.03	27.04	60.14	56.44
*D.P. (%)	0.05	0.01	0.84	1.03	1.72	1.45
*C.V.(%)	5.04	0.80	2.79	3.79	2.85	2.57
Exatidão (%)	95.37	87.97	100.11	90.13	100.24	94.07
Desvio (%)	-7,37		-9,96		-6,15	

D.P. = desvio padrão; C.V.=coeficiente de variação; NQ = não quantificável; Desvio = desvio em relação às amostras analisadas imediatamente após o preparo no tempo zero.

5.1.2.7.5 ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES PADRÃO

A estabilidade das soluções padrão de lorazepam e bromazepam em água:metanol (90:10, v/v) foi determinada pela análise diária das mesmas durante as corridas analíticas da validação e das amostras de plasma dos voluntários. Os resultados obtidos indicam que as soluções padrão permaneceram estáveis por um tempo de até 24 dias conforme mostrado na Tabela 13.

Tabela 13: Resultados da estabilidade das soluções padrão de lorazepam e bromazepam em água e metanol na proporção 90:10 (v/v), utilizadas para preparação das curvas de calibração.

Estabilidade de Soluções Padrão		24 Dias		4 ± 6 °C	
Data de início do teste		24/09/05			
Data de finalização do teste		18/10/05			
Valores de concentração obtidos através da determinação das áreas dos padrões	Padrão (40 ng/mL)		Padrão Interno (25 ng/mL)		
	Recém-Preparados	Teste	Recém-Preparados	Teste	
	37,74	38,63	24,42	26,21	
	40,00	36,74	25,25	27,63	
	39,94	N/D	23,68	N/D	
	Média (área)	39,23	37,69	24,45	26,92
CV (%)	3,28	3,55	3,21	3,73	
Desvio (%)		-3,93		10,10	
N/D = Valor não determinado; Desvio = desvio em relação às amostras analisadas imediatamente após o preparo no tempo zero.					

5.1.8 AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS MEDICAMENTOS TESTE E REFERÊNCIA DE LORAZEPAM

5.1.8.1 RESULTADOS OBTIDOS DO ENSAIO CLÍNICO DE BIOEQUIVALÊNCIA

Durante o ensaio clínico, nas fases 1 e 2, não foram registrados sintomas, de elevada gravidade, aos medicamentos administrados. Na Tabela 14 e 15 encontram-se resumidos os moderados sintomas observados e os procedimentos adotados.

Tabela 14: Resumo dos sintomas registrados durante a internação para execução do ensaio clínico fase 1 de bioequivalência de comprimidos contendo lorazepam.

Fase 1				
Voluntário	Medicamento	Evento Adverso	Procedimento	Resultado
01	R	Tontura	Observação clínica	Bom estado geral na alta
04	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
05	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
06	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
07	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
07	T	Tontura	Observação clínica	Bom estado geral na alta
07	T	Vômito	Observação clínica	Bom estado geral na alta
08	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
08	T	Tontura	Observação clínica	Bom estado geral na alta
09	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
10	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
11	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
12	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
12	T	Tontura	Observação clínica	Bom estado geral na alta
13	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
13	T	Tontura	Observação clínica	Bom estado geral na alta
14	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
14	R	Tontura	Observação clínica	Bom estado geral na alta
15	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
15	T	Tontura	Observação clínica	Bom estado geral na alta
15	T	Náuseas	Observação clínica	Bom estado geral na alta
16	R	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
16	R	Tontura	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
17	R	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
18	T	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
18	T	Tontura	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
18	T	Náusea	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
19	R	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
19	R	Tontura	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
20	T	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
20	T	Tontura	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
20	T	Náusea	Administração de Plasil®	Bom estado geral na alta
21	R	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
21	R	Tontura	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
21	R	Náusea e vômito	Administração de Plasil®	Bom estado geral na alta
22	R	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
22	R	Tontura	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
23	T	Tontura	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
23	T	Náusea e vômito	Adm. de Metoclopramida	Bom estado geral na alta
23	T	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
24	T	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
25	R	Náuseas e vômito	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
25	R	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
26	T	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta

Tabela 15: Resumo dos sintomas registrados durante a internação para execução do ensaio clínico fase 2 de bioequivalência de comprimidos contendo lorazepam.

Fase 2				
Voluntário	Medicamento	Evento Adverso	Procedimento	Resultado
01	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
01	T	Tontura	Observação clínica	Bom estado geral na alta
02	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
04	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
05	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
06	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
07	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
08	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
10	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
11	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
12	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
12	R	Tontura	Observação clínica	Bom estado geral na alta
13	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
14	T	Cefaléia	Adm. de Dipirona	Bom estado geral na alta
14	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
15	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
16	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
17	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
18	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
19	T	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
20	R	Sonolência	Observação clínica	Bom estado geral na alta
21	T	Cefaléia	Adm. de Dipirona	Bom estado geral na alta
21	T	Cefaléia	Adm. de Dipirona	Bom estado geral na alta
21	T	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
22	T	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
23	R	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
24	R	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
25	T	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta
26	R	Sonolência	Observação Clínica	Bom estado geral na alta

5.1.8.2 DESVIOS DO PROTOCOLO CLÍNICO DE BIOEQUIVALÊNCIA

Durante a realização do ensaio clínico de bioequivalência registrou-se que o voluntário 03 não compareceu para a internação da Fase 1, assim como o não comparecimento do voluntário 09 na internação da Fase 2. Portanto estes foram desistentes do estudo.

No período de coletas adicionais das amostras, durante a Fase 1, registrou-se o não comparecimento do voluntário 07 para as coletas de 24 e

72 horas, e durante a Fase 2 o não comparecimento dos voluntários 07, 19 e 22 no horário de 72 horas. Além disso, na Fase 1, para o voluntário 17, não foi possível coletar a amostra de 0,5 horas pois se perdeu o acesso venoso.

Foram registrados nove atrasos de coleta na Fase 1 e 11 atrasos de coleta na Fase 2. Nenhum destes atrasos ultrapassou o limite de 10% do intervalo de coleta e, portanto, não foram considerados significativos.

A exclusão dos dados quantificados do voluntário 22 do estudo se fez pelo fato de que os cromatogramas referentes às amostras deste apresentavam pico interferente no mesmo tempo de retenção do padrão interno, com área superior a 5% da área do pico do padrão interno.

5.1.8.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE LORAZEPAM APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS PRODUTOS TESTE E REFERÊNCIA

As Tabelas 16 e 17 apresentam, respectivamente, as concentrações plasmáticas médias de lorazepam após administração dos produtos referência e teste a 23 voluntários sadios.

Tabela 16: Concentrações plasmáticas médias, máximas e mínimas de lorazepam obtidas após administração do produto referência (Lorax[®], lote 27692) a 23 voluntários sadios

Tempo (h)	Concentração plasmática (ng/mL)					
	Produto referência (Lorax [®] , lote 27692)					
	Média	D.P.	C.V	EPM	Mínima	Máxima
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	11,21	7,22	64,36	1,50	3,55	29,14
1,0	25,52	11,85	46,46	2,47	3,18	47,35
1,5	30,31	9,99	32,97	2,08	14,69	56,26
2,0	31,68	8,36	26,38	1,74	20,14	52,50
2,5	33,72	8,63	25,58	1,80	15,59	48,70
3,0	34,50	7,98	23,13	1,66	17,02	51,38
3,5	33,77	7,81	23,14	1,63	19,13	48,23
4,0	31,71	7,80	24,61	1,63	16,67	49,06
6,0	29,44	8,61	29,26	1,80	15,28	50,43
8,0	25,37	6,97	27,47	1,45	13,36	38,82
12,0	20,46	6,24	30,48	1,30	9,44	33,39
24,0	11,51	4,63	40,23	0,97	5,36	21,60
48,0	4,19	2,70	64,42	0,56	0,82	11,92
72,0	1,46	1,58	108,32	0,33	NQ	6,95
96,0	0,55	0,96	176,69	0,20	NQ	4,07

D.P. = desvio padrão; C.V.=coeficiente de variação; E.P.M.= erro padrão da média ; NQ = não quantificável

Tabela 17: Concentrações plasmáticas médias, máximas e mínimas de lorazepam obtidas após administração do produto teste (Lorazepam Teuto lote 2332002) a 23 voluntários sadios.

Tempo (h)	Concentração plasmática (ng/mL)					
	Produto teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002)					
	Média	D.P.	C.V	EPM	Mínima	Máxima
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	19,82	14,61	73,70	3,05	2,61	59,14
1,0	33,82	11,68	34,55	2,44	11,42	58,62
1,5	35,13	9,27	26,38	1,93	13,70	57,36
2,0	34,88	9,01	25,84	1,88	17,61	56,68
2,5	33,84	8,93	26,38	1,86	16,86	52,81
3,0	33,24	7,63	22,95	1,59	15,93	51,13
3,5	32,20	8,69	27,00	1,81	15,92	53,39
4,0	30,69	6,86	22,36	1,43	12,11	45,41
6,0	27,30	6,46	23,68	1,35	11,23	40,45
8,0	24,21	6,28	25,95	1,31	11,62	43,53
12,0	19,25	6,08	31,59	1,27	8,71	33,92
24,0	11,59	4,69	40,50	0,98	5,78	24,63
48,0	4,14	3,08	74,35	0,64	NQ	15,21
72,0	1,53	1,84	120,59	0,38	NQ	8,42
96,0	0,56	1,07	190,71	0,22	NQ	4,66

D.P. = desvio padrão; C.V.=coeficiente de variação; E.P.M.= erro padrão da média ; NQ = não quantificável

A média dos perfis das concentrações plasmáticas versus tempo, referente aos dois produtos esta representada através das curvas de decaimento plasmático mostradas na Figura 20.

Figura 20: Curvas médias das concentrações plasmáticas *versus* tempo após administração dos produtos referência (Lorax[®], lote 27692) e teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) a 23 voluntários sadios. As barras verticais representam o erro padrão da média.

5.1.8.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS OBTIDOS APÓS ADMINISTRAÇÃO DOS PRODUTOS TESTE E REFERÊNCIA

As Tabelas 18 e 19 apresentam os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , T_{max} , $t_{(1/2)el}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} , obtidos após administração dos produtos referência (Lorax[®], lote 27692) e teste (Lorazepam -Teuto lote 2332002), respectivamente, aos voluntários sadios, além da relação percentual entre os valores de ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} (%).

Tabela 18: Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração do produto referência (Lorax[®], lote 27692) a 23 voluntários sadios.

Vol.	Lorax [®]					
	Cmax (ug/mL)	Tmax (h)	t(1/2) _{el} (h)	AUC _{0-t} (ugxh/mL)	AUC _{0-inf} (ugxh/mL)	%
1	38.16	3.00	19.63	768.59	794.22	96.77
2	31.79	3.00	16.19	763.31	776.20	98.34
4	47.88	3.00	11.93	597.81	636.14	93.98
5	32.55	3.50	13.64	491.37	501.75	97.93
6	36.62	3.00	11.34	527.91	557.87	94.63
7	30.37	3.50	25.86	1003.03	1081.23	92.77
8	56.26	1.50	30.00	1550.93	1727.24	89.79
10	27.54	3.00	11.21	414.21	437.69	94.64
11	39.56	1.50	16.42	807.14	820.01	98.43
12	43.82	6.00	16.50	814.50	827.53	98.43
13	33.87	1.50	14.90	699.90	722.85	96.83
14	43.25	2.50	13.35	661.80	677.42	97.69
15	39.05	2.50	15.86	924.78	938.18	98.57
16	39.07	1.50	11.77	649.76	659.10	98.58
17	51.38	3.00	15.57	1150.62	1165.27	98.74
18	32.48	4.00	12.58	639.03	651.01	98.16
19	36.47	2.00	11.07	423.56	443.53	95.50
20	39.93	3.00	17.07	978.81	1045.38	93.63
21	20.47	2.00	10.00	330.35	342.21	96.53
23	47.35	1.00	15.30	852.97	884.98	96.38
24	39.63	3.50	13.59	670.04	687.29	97.49
25	49.06	4.00	21.13	1300.50	1355.18	95.97
26	41.49	3.50	16.42	1001.64	1020.95	98.11
Média	39.05	2.83	15.71	783.59	815.36	96.43
DP	8.19	1.10	4.79	292.46	318.40	2.30
CV(%)	20.97	39.06	30.47	37.32	39.05	2.38
Mínimo	20.47	1.00	10.00	330.35	342.21	89.79
Máximo	56.26	6.00	30.00	1550.93	1727.24	98.74

Voluntários 3 e 9 :desistentes; voluntário 22: excluído

Tabela 19: Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração do produto teste (Lorazepam Teuto lote 2332002) a 23 voluntários sadios.

Lorazepam Teuto						
Vol.	Cmax (ug/mL)	Tmax (h)	t(1/2) _{el} (h)	AUC _{0-t} (ugxh/mL)	AUC _{0-inf} (ugxh/mL)	%
1	35,11	1,00	18,14	714,74	732,73	97,55
2	38,13	2,00	15,07	719,92	746,52	96,44
4	34,88	3,50	11,91	512,19	545,63	93,87
5	35,97	2,00	11,61	517,00	545,23	94,82
6	36,24	2,50	14,09	504,38	550,67	91,59
7	34,46	4,00	24,15	1029,05	1095,91	93,90
8	43,96	1,50	29,74	1609,76	1809,62	88,96
10	34,37	1,50	11,75	463,07	487,91	94,91
11	37,58	2,50	15,37	814,85	827,90	98,42
12	38,26	3,50	16,78	968,46	987,57	98,06
13	43,03	0,50	14,90	673,13	695,51	96,78
14	41,81	2,50	15,97	860,70	873,74	98,51
15	59,14	0,50	14,09	1053,11	1084,24	97,13
16	38,80	3,00	13,33	670,15	686,42	97,63
17	50,07	0,50	17,03	876,85	894,97	97,98
18	50,61	2,50	13,10	808,01	825,11	97,93
19	41,33	1,00	11,04	502,22	524,91	95,68
20	32,67	2,00	18,05	923,91	951,85	97,07
21	23,68	1,50	16,70	242,51	381,83	63,51
23	48,41	1,00	15,75	772,71	804,40	96,06
24	44,99	2,00	12,91	645,04	657,85	98,05
25	53,39	3,50	22,21	1288,39	1347,85	95,59
26	51,51	1,00	14,78	687,65	710,25	96,82
Média	41,23	1,98	16,02	776,43	816,03	94,66
DP	8,14	1,05	4,37	293,79	312,99	7,17
CV(%)	19,75	53,06	27,27	37,84	38,36	7,58
Mínimo	23,68	0,50	11,04	242,51	381,83	63,51
Máximo	59,14	4,00	29,74	1609,76	1809,62	98,51

Voluntários 3 e 9 :desistentes; voluntário 22: excluído

5.1.8.5 AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS MEDICAMENTOS

A Tabela 20 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} , em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos referência (Lorax[®], lote 27692) e teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) a 23 voluntários sadios.

Tabela 20: Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} , em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos referência (Lorax[®], lote 27692) e teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) a 23 voluntários sadios.

Fonte de Variação	Nível Descritivo (p)		
	$\ln C_{\max}$	$\ln ASC_{0-t}$	$\ln ASC_{0-inf}$
Produto	0,1755	0,7278	0,6967
Grupo	0,2488	0,0432	0,0461
Período	0,8900	0,9078	0,3887

$p > 0,05$: não há efeito

Os intervalos de confiança 90 % (IC 90 %) para as relações entre os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} , em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos referência (Lorax[®], lote 27692) e teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) a 23 voluntários sadios, são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Intervalos de confiança 90% (IC 90 %) para as relações entre os parâmetros $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) e referência (Lorax[®], lote 27692) a 23 voluntários sadios

IC 90 %		
In $C_{\max}$	In ASC_{0-t}	In ASC_{0-inf}
99 – 114 %	93 – 105 %	96 – 107 %

O poder estatístico dos testes utilizados para determinação dos intervalos de confiança 90% das relações entre os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} dos produtos teste e referência, transformados logaritmicamente, está apresentado na Tabela 22

Os coeficientes de variação intra-sujeito das relações entre os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} dos produtos teste e referência, transformados logaritmicamente, estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 22: Poder estatístico dos testes utilizados para determinação do intervalo de confiança 90% (IC 90%) das relações entre os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} dos produtos teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) e referência (Lorax[®], lote 27692) transformados logaritmicamente.

Parâmetro	Poder estatístico (%)
In $C_{\max}$	100 %
In ASC_{0-t}	100 %
In $ASC_{0-\infty}$	100 %

Tabela 23: Coeficientes de variação intra-individual das relações entre os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ dos produtos teste (Lorazepam Teuto, lote 2332002) e referência (Lorax[®], lote 27692) transformados logaritmicamente.

Parâmetro	Coeficiente de variação (%)
In $C_{\max}$	14 %
In ASC_{0-t}	12 %
In $ASC_{0-\infty}$	11 %

6. DISCUSSÃO

A determinação da bioequivalência, entre os produtos, conduzida neste estudo por um ensaio clínico do tipo aleatório, cruzado e aberto, no qual todos os voluntários dos dois grupos formados (A e B) receberam tanto o medicamento teste quanto o medicamento referência em duas fases distintas, apresenta vantagens sobre outros delineamentos, pois reduz a variabilidade intra-individual, uma vez que cada indivíduo é o seu próprio controle. Além disso a variabilidade inter-individual na comparação entre as formulações é removida. Fornecendo assim uma melhor estimativa para as diferenças existentes entre as formulações (Chow & Liu, 2002).

O período de *wash out* de 10 dias, correspondente a, no mínimo, 10 vezes o valor da meia vida de eliminação do lorazepam, assegurou que entre as fases a presença residual do fármaco administrado na primeira não persistisse depois do período de eliminação. Não sendo então, capaz de influenciar na quantificação das amostras de lorazepam da segunda fase.

A condução do desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para a quantificação em matrizes complexas como plasma, urina e sangue utilizando a cromatografia líquida acoplada ao sistema de detecção por espectrometria de massa, conforme descrito, não é uma tarefa trivial. O processamento de extração do analito da matriz, a compreensão da ionização da molécula e a fragmentação da mesma, em sua forma iônica, são extremamente importantes para o entendimento do espectro de massas gerado.

Durante o desenvolvimento do método a preocupação em se escolher um padrão interno apropriado, isto é, que tenha comportamento semelhante ao analito em todo o preparo da amostra, cromatografia e detecção por espectrometria de massa foi de grande importância. Baseado no princípio de que o melhor padrão interno a ser selecionado seja aquele que deva seguir o analito durante a extração e compensar qualquer possível inconsistência de recuperação, que deva ser eluído em conjunto com ou próximo ao analito na coluna e compensar quaisquer possíveis respostas inconsistentes resultantes de efeitos da matriz e que não deva causar interferência sobre a resposta do sinal do analito, uma opção seria

então de um padrão deuterado (analito marcado com deutério). Domingues e colaboradores (2006) quantificaram concentrações séricas de lorazepam através da técnica de cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (CG-MS) usando como padrão interno o mesmo composto deuterado (lorazepam-d₄). Köves (2006) descreve a síntese do deutério do lorazepam (²H₃ – Lorazepam) afim de ser usado como padrão interno em análises forenses. Crimele e Kintz (1996) , também com o foco em análise forense, detectaram e quantificaram a presença de lorazepam em cabelo humano através de CG-MS com a utilização do lorazepam-d₄ como padrão interno. Contudo, padrões deuterados são de difícil obtenção e elevado custo.

Sendo assim, a escolha do bromazepam como padrão interno foi feita por ter sua estrutura análoga (Figura 4) e com a diferença de 3,0 Da (daltons) da massa do analito, o que permitiu a não ocorrência de interferência, também chamado de cross talk, do sinal do padrão interno sobre o sinal analito e vice-versa. Além disso, demonstrou-se ser capaz de atender todos os quesitos anteriormente citados para um padrão interno ideal.

Durante a ionização realizada em modo positivo (ES+) pelo espectrômetro de massa, foi evidenciado a protonação das moléculas do analito (lorazepam) e do seu respectivo padrão interno (bromazepam), gerando então estruturas iônicas pseudomoleculares $[M + H]^+$. A relação massa/carga (m/z) de 321 encontrada durante a varredura executada pelo equipamento foi para o lorazepam (Figura 7), e a de m/z 316 e 318 para o bromazepam. Pelo fato do bromazepam ter um bromo em sua estrutura química, as intensidades relativas dos sinais de m/z 316 e m/z 318 obtidos no espectro de massas (Figura 8) foram iguais devido a relação natural dos isótopos existentes ($^{79}\text{Br} / ^{81}\text{Br} = 1:1$).

Em geral os benzodiazepínicos são submetidos à ionização por electrospray em modo positivo pela protonação de sua estrutura. A espécie protonada resultante é do tipo $[M + H]^+$, conforme anteriormente citado, com a perda de uma espécie neutra. Para o estudo realizado, foram propostos

dois modelos de ionização e fragmentação para as estruturas do lorazepam e bromazepam respectivamente.

Para o lorazepam, foi proposto a protonação no álcool da molécula gerando então a estrutura de m/z 321 (estrutura iônica precursora). Esta protonação envolve a perda de uma molécula de água (H_2O) gerando uma estrutura de m/z 303 que sofreu um ataque nucleófilo do nitrogênio no carbocátion seguida de ciclização e formação de um anel de seis membros apartir da contração do anel de sete membros. A perda da espécie neutra CO completa a fragmentação da estrutura precursora formando então o íon produto de m/z 275 (Figura 9).

Para a estrutura iônica precursora do bromazepam de m/z 318 são propostas, duas perdas neutras seqüenciais. A primeira perda é a de CO, gerando a estrutura de m/z 290 e em seguida a segunda perda de HCN gerando a estrutura de m/z 263. Por fim o íon produto formado de m/z 182 origina-se da perda do radical bromo (Figura 10).

Os modelos de fragmentação propostos anteriormente são confirmados e baseados na formação dos espectros de massas da fragmentação gerada tanto para o analito (Figura 11) quanto para o padrão interno (Figura 12).

Conforme descrito no item 5.1.1, a eficiência da fragmentação dos íons precursores foi obtida em função da energia de 25 e 30 eV para o lorazepam e bromazepam, respectivamente, aplicada ao gás de colisão (Argônio) na câmara de colisão. Essa energia gerada, permitiu obter a intensidade máxima para a ocorrência da dissociação dos íons precursores pela colisão induzida (CID).

Afim de melhorar a sensibilidade promovendo a ionização do analito e do padrão interno, foi adicionado ácido fórmico a fase móvel na concentração de 0,1%. A adição de TFA (ácido trifluoracético) não foi considerada, uma vez que existem indícios que o mesmo causa supressão ao sinal em electrospray positivo e negativo (Applied, 2005).

O método analítico desenvolvido para a quantificação de lorazepam em amostras de plasma apresentou boa especificidade, recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão requeridas para ensaios de bioequivalência. Além disso, a metodologia aplicada mostrou algumas vantagens em relação a outros métodos publicados.

O método proposto por Muchohi e Obiero (2005) não aplica a quantificação através da espectrometria de massas, utiliza a detecção por ultravioleta (U.V.) que é, quando comparada ao presente estudo, menos seletiva e específica para a quantificação do analito na ordem de nanogramas. Além disso, requer 12 minutos para cada análise cromatográfica utilizando um fluxo de 2,5 mL/min. enquanto neste estudo um tempo de análise de 6 minutos com fluxo de 0,5 mL/min. foi o suficiente. Desta forma, foi possível reduzir o tempo de utilização do cromatógrafo e do espectrômetro de massa, a quantidade de fase móvel necessária e o desgaste da coluna. A necessidade de redução do tempo de análise é de extrema importância, pois se deve considerar que o método desenvolvido e validado para o estudo de bioequivalência previu a análise de mais de 1000 amostras.

O procedimento de extração em fase sólida relatado por diversos autores (Kanazawa e Konishi, 1998; Lee e Kumazawa, 2003) embora seja uma maneira de reduzir o tempo no preparo da amostra, apresenta a desvantagem de expressar valores de recuperação inferiores aos obtidos através da extração tipo líquido - líquido, conforme realizada neste estudo. Durante o desenvolvimento do método, foram testados diferentes solventes para se verificar qual deles seria o mais apropriado para ser utilizado na extração. Dentre os solventes selecionados estavam: éter, diclorometano, acetonitrila e hexano. Todos na quantidade de 5,0 mL foram utilizados para o processo de extração do lorazepam e do padrão interno. De acordo com as respostas fornecidas em área pelo equipamento verificou-se que tanto o diclorometano e o hexano foram os solventes que permitiram obter a maior recuperação dos dois fármacos da matriz biológica. Sendo assim, optou-se pela mistura dos dois solventes (hexano/diclorometano) na proporção de 60/40, v/v. Foram conseguidas com isso recuperações próximas de 90%

tanto para o analito quanto para o padrão interno. Além da utilização dos dois solventes, a boa recuperação se deve ao processo de dupla extração líquido-líquido.

Com base em dados da literatura, como por exemplo os fornecidos por Muchohi e colaboradores (2005) que utilizaram também como solventes de extração a mistura de hexano com diclorometano e obtiveram recuperações abaixo de 85% para o lorazepam, optou-se aplicar a dupla extração líquido-líquido com o mesmo solvente na quantidade de 2,0 mL por etapa com o propósito de se garantir a maior recuperação possível dos fármacos da matriz biológica sem o consumo excessivo de solventes.

O limite de quantificação de um fármaco foi um parâmetro importante de ser avaliado neste estudo de bioequivalência, uma vez que as concentrações plasmáticas eram da ordem de nanogramas por mililitros. O limite inferior de quantificação (LIQ) de 0,50 ng/mL determinado neste método foi adequado e de menor concentração ao obtido no método similar utilizado por Zhu e Luo (2005) que foi de 0,70 ng/mL. Também foi 20 vezes inferior ao LIQ determinado por Muchohi e colaboradores (2005) em metodologia que utilizou a detecção por ultravioleta, e próximo ao obtido por Papini e colaboradores (2006).

A linearidade do método na faixa de 0,5 ng/mL a 80,0 ng/mL, calculada por regressão linear ($1/x$) pelo método dos mínimos quadrados, foi adequada à aplicação em estudos de bioequivalência. O coeficiente de correlação (r^2), assim como o coeficiente angular (a) e linear (b), a serem considerados para o estudo são os respectivos da curva média apresentada na Figura 18. Esses são valores absolutos calculados apartir das concentrações presentes nas seis curvas de calibração. Já os valores de inclinação, intercepto e de coeficiente de correlação (r^2) próprios da média das curvas são baseados nos valores individuais de cada curva de calibração conforme mostrado na Tabela 5. A precisão obtida entre os valores individuais das seis curvas de calibração não foi superior a $\pm 10\%$. Assim como o desvio, em relação a média dos valores individuais e aos valores absolutos obtidos, não atingiu valores de $\pm 5\%$. Portanto, isso

demonstra que a diferença dos resultados obtidos para a curva média e a média das curvas não é estatisticamente significativa.

O poder do teste estatístico no presente estudo de bioequivalência permitiu calcular a probabilidade da conclusão da análise a ser dada. Quanto maior o poder do teste, maior a probabilidade dos resultados serem válidos. Além disso, o poder estatístico do teste deve ser de, no mínimo, 80% para detectar uma diferença de 20% entre dois medicamentos (Noel, 2003). No presente estudo, o poder estatístico dos testes utilizados para determinação do intervalo de confiança 90% das relações entre os parâmetros farmacocinéticos foi de 100% para C_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} (Tabela 22). Este valor aplicado indicou que o número de voluntários utilizados para o ensaio de bioequivalência foi adequado.

Conforme o proposto na conferência Bio-International de 1989, e confirmado em 1992, fármacos exibindo variabilidade intra-sujeito de 30% ou mais deveriam ser classificados como altamente variáveis (Noel, 2003). De acordo com o poder estatístico aplicado e com os dados obtidos de coeficientes de variação intra-individual das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} dos produtos teste e referência (Tabela 23), pode-se determinar que o lorazepam é um fármaco de baixa variabilidade.

No período que decorreu a internação dos voluntários para a execução do ensaio clínico foi observado que na fase 1 (Tabela 14) foram registrados mais efeitos adversos do que na fase 2 (Tabela 15). Este registro foi atribuído ao fato de que após a administração dos medicamentos aos voluntários, estes não permaneceram em repouso nos leitos durante as coletas de sangue. Já na fase 2 com uma melhor conduta durante a coleta os efeitos adversos, como cefaléia e tontura, foram em menor frequência e tratados de forma adequada.

Durante o ensaio de bioequivalência, dois voluntários, independentemente de qualquer intercorrência, expressaram desejo de abandonar o estudo. A exclusão dos dados quantificados de um voluntário

do estudo se fez pelo fato de que os cromatogramas referentes às amostras deste voluntário apresentavam pico no mesmo tempo de retenção do padrão interno, com área superior a 5% da área do pico do padrão interno. Apesar de o número inicial ter passado de 26 para 23 voluntários, o poder estatístico aplicado foi capaz de assegurar e garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de bioequivalência.

As curvas médias de concentração plasmática *versus* tempo, obtidas após administração, dos produtos referência (Lorax[®]) e teste (Lorazepam Teuto) a 23 voluntários sadios apresentaram perfis de decaimento plasmático semelhantes, assim como as médias dos parâmetros C_{max} (referência: 39,05 ng/mL, teste 41,23 ng/mL), ASC_{0-t} (referência: 783,59 ng.h/mL, teste 776,43 ng.h/mL) e ASC_{0-inf} (referência: 815,36 ng.h/mL, teste 816,03 ng.h/mL).

A análise de variância (ANOVA) realizada para avaliação do efeito de produto, grupo e período em relação aos parâmetros farmacocinéticos avaliados demonstrou ausência destes efeitos em C_{max} . Porém, observou-se efeito de grupo em ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} , e ausência de efeito de produto e período para os referidos parâmetros.

A observação do efeito grupo na análise não invalida o ensaio de bioequivalência. Além disso, segundo a Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeia, 2005), os efeitos de grupo ou período podem ocorrer, aleatoriamente, em 10 % dos ensaios de bioequivalência. O efeito grupo ou período pode ser ignorado se: o estudo aplicou dose única; incluiu apenas voluntários sadios e normais; o fármaco não é uma molécula endógena; foi aplicado um período de *wash out* adequado entre as duas fases; o estudo preencheu todos os critérios científicos e estatísticos, tais como protocolo de ensaio, metodologia validada, dados obtidos aceitáveis, análise estatística apropriada e intervalos de confiança para os parâmetros farmacocinéticos aceitáveis. Desta forma, como o referido estudo contemplou todos os requisitos supracitados, tal efeito não interfere no resultado final observado.

Os intervalos de confiança 90 % obtidos para as razões dos parâmetros farmacocinéticos C_{max} (99% - 114%), ASC_{0-t} (93% - 105%) e ASC_{0-inf} (96% - 107%) dos medicamentos teste e referência apresentaram-se dentro do limite de 80 a 125%, caracterizando biodisponibilidades equivalentes entre os produtos. Desta forma, concluiu-se que o produto Lorazepam Teuto, produzido pelo Laboratório Teuto, pode ser administrado de maneira intercambiável ao produto referência Lorax[®], produzido por Laboratório Wyeth-Whitehall Ltda, sem prejuízo da eficácia terapêutica.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados no presente estudo, é possível concluir que:

- O método analítico desenvolvido e validado para a quantificação de lorazepam em plasma humano apresentou sensibilidade, reprodutibilidade, recuperação e estabilidade adequadas. Estas características justificaram sua utilização em ensaios de bioequivalência.
- O produto teste Lorazepam, lote 2332002, produzido pelo laboratório Teuto Brasileiro pode ser considerado bioequivalente ao produto referência Lorax[®], lote 27692, produzido pelo laboratório Wyeth-Whitehall Ltda.
- Os produtos teste Lorazepam, lote 2332002, produzido pelo laboratório Teuto Brasileiro e referência Lorax[®], lote 27692, produzido pelo laboratório Wyeth-Whitehall Ltda, são bioequivalentes e podem ser administrados a pacientes de maneira intercambiável, sem prejuízo quanto a eficácia e segurança terapêutica.

8. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 084/2005

São Paulo, 07 de junho de 2005.

Ilmo(a). Sr(a).
Valentina Porta
FBF

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 23 de maio de 2005, **APROVOU** o projeto "Avaliação de biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo 2 mg de de lorazepam produzidos por Laboratório Teuto Brasileiro e Laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda." (Protocolo CEP nº 305) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Úrsula Maria Lanfer Marquez
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

hospital universitário
universidade de são paulo

São Paulo, 17 de junho de 2005.

Il^{mo}(a). S^{ra}(a).

Dra. Valentina Porta

Laboratório de Biofarmacotécnica – Biofar

Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Avaliação de biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo 2mg de lorazepam produzidos por Laboratório Teuto Brasileiro e Laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda” - **Registro CEP: 568/05**

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária de 17 de junho de 2005, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como, seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196 de 10-10-1996, item VII.13.d.. **O primeiro relatório está previsto para 17 de junho de 2006.**

Atenciosamente,

Dra. Maria Teresa Zulini da Costa
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
LABORATÓRIO DE BIOFARMACOTÉCNICA – BIOFAR

PROTOCOLO DE ESTUDO BF 080405

AVALIAÇÃO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE COMPRIMIDOS CONTENDO 2 MG
DE LORAZEPAM PRODUZIDOS POR LABORATÓRIO TEUTO BRASILEIRO E
LABORATÓRIOS WYETH-WHITEHALL LTDA

EQUIPE DE TRABALHO:

PROFA. DRA. VALENTINA PORTA (PESQUISADORA PRINCIPAL)

PROF. DR. PAULO DE ANDRADE LOTUFO (COORDENADOR MÉDICO)

PROFA. DRA. CRISTINA H. DOS REIS SERRA

FARM. EUNICE KAZUE KANO

ABRIL DE 2005

1. INTRODUÇÃO

O lorazepam é um benzodiazepínico utilizado como ansiolítico, sedativo-hipnótico, anticonvulsivante e miorrelaxante (Korolkovas, 2000; Kanazawa et al., 2000). Os benzodiazepínicos são estruturalmente derivados da 1,4-benzodiazepin-2-ona, e apresentam propriedades físicas, químicas, farmacológicas e terapêuticas muito semelhantes (Korolkovas, 2000).

O lorazepam é indicado para o tratamento da ansiedade sob todas as formas, tratamento da insônia, do mal epilético, alívio dos sintomas da síndrome de abstinência alcoólica aguda, catatonia induzida por neurolépticos, além de ser utilizado como pré-anestésico (Korolkovas, 2000). Pode ser administrada em combinação com outros fármacos, como corticosteróides, para o controle da náusea e vômito decorrentes dos tratamentos quimioterápicos (Drug Information, 1996).

Após administração oral, lorazepam é rápido e quase completamente absorvido no trato gastrointestinal e atinge concentração plasmática máxima em cerca de duas horas. Sua biodisponibilidade é de 90 a 95%, liga-se moderadamente às proteínas plasmáticas (65%) e possui meia-vida média de eliminação de 15 horas (8-25 horas). O lorazepam é metabolizada quase que exclusivamente por conjugação hepática originando metabólitos inativos (Guerra et al., 2001; Drug Information Handbook International, 2005). É excretado no leite materno e é eliminado pela urina na forma de glicuronídeos inativos (Korolkovas, 2000).

As doses indicadas para ansiedade em adultos variam de 1 a 2 mg duas ou três vezes ao dia, podendo ser aumentada gradualmente até o máximo de 10 mg ao dia divididas em duas ou três administrações. Para insônia a dose recomendada é de 2 a 4 mg ao deitar (Korolkovas, 2000).

Em relação às interações medicamentosas, o etanol e outros depressores do sistema nervoso central podem aumentar os efeitos no sistema nervoso central do lorazepam. A administração concomitante de escopolamina com lorazepam via parenteral pode aumentar a incidência de sedação, alucinações e irritação. Existem ainda descritos casos em que a administração de loxapine em combinação com lorazepam provocaram depressão respiratória (Drug Information Handbook International, 2005).

Estão descritos na literatura vários estudos de farmacocinética do lorazepam envolvendo voluntários sadios. Samara e colaboradores (1997) avaliaram o efeito do valproato na farmacocinética e farmacodinâmica do lorazepam em voluntários sadios do sexo masculino. A influência do sexo e do ciclo menstrual na farmacocinética do lorazepam foi estudado por Guerra e colaboradores (2001) em 24 voluntários sadios de ambos os sexos. Caille e colaboradores (1983) avaliaram os perfis farmacocinéticos de formulações de administração oral e sublingual, após dose múltipla, em voluntários sadios do sexo masculino.

A biodisponibilidade de uma forma farmacêutica refere-se à extensão da absorção do(s) princípio(s) ativo(s) nela contido(s) e à velocidade com que esta absorção ocorre. Duas formas farmacêuticas são ditas bioequivalentes quando, ao serem administradas ao mesmo indivíduo, nas mesmas condições experimentais e na mesma dose molar, não apresentarem diferenças significativas em relação à biodisponibilidade (Chow & Liu, 2000).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 1996), os medicamentos genéricos devem satisfazer os mesmos padrões de qualidade, eficácia e segurança que o produto original, ou inovador, além de ser clinicamente intercambiáveis com estes últimos. Para algumas classes de produtos, inclusive formulações parenterais de compostos altamente solúveis em água, a intercambialidade é adequadamente garantida pela implementação das Boas Práticas de Fabricação e pela evidência de conformidade com especificações farmacopéicas relevantes. Entretanto, para a maioria dos produtos, incluindo grande parte das formas farmacêuticas sólidas orais, a intercambialidade deve ser demonstrada, anexando-se esses dados à documentação para requisição da autorização de comercialização de medicamento genérico ou similar. Em geral, isso pode ser feito por meio de ensaios de bioequivalência e biodisponibilidade relativa.

Desta forma, um estudo em que se avalie a velocidade e extensão de absorção de duas formulações é de extrema importância, uma vez que, irá contribuir para o desenvolvimento de formulações que apresentem a mesma biodisponibilidade que o produto de referência, garantindo assim a intercambialidade dos produtos sem prejuízo da eficácia e segurança terapêuticas.

2.OBJETIVO

Pretende-se, nesse trabalho, realizar ensaio de biodisponibilidade relativa entre os produtos Lorazepam Teuto comprimidos contendo 2 mg de lorazepam produzidos pela empresa Laboratório Teuto Brasileiro (produto TESTE) e Lorax[®] comprimidos contendo 2 mg de lorazepam, produzido pela empresa Laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda (produto REFERÊNCIA), analisando-se a presença ou não de bioequivalência entre eles.

O presente estudo será executado segundo a Resolução RE 397, de 12 de novembro de 2004.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Serão avaliadas duas formulações contendo lorazepam:

- Laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda
Produto Referência (R): Lorax[®] comprimidos contendo 2 mg de lorazepam
- Laboratório Teuto Brasileiro
Produto Teste (T): Lorazepam Teuto comprimidos contendo 2 mg de lorazepam

As amostras para realização desses ensaios, do produto referência, serão do mesmo lote das utilizadas nos testes de equivalência farmacêutica. A aquisição do produto referência será efetuada pela FIPFARMA, fundação que gerencia os recursos financeiros do Laboratório BIOFAR, ou pelo centro responsável pela equivalência farmacêutica, garantindo-se sua identificação por meio de notas fiscais que discriminem o número de lote, conforme exigência da Resolução 41/2000 (Brasil, 2000). As amostras do produto teste serão encaminhadas pela empresa patrocinadora do estudo.

O número de amostras a ser adquirido deverá ser suficiente para a realização do ensaio e guarda das amostras de retenção, estas em número adequado para repetir o ensaio *in vivo*.

Todos os medicamentos serão armazenados no laboratório analítico do BIOFAR, em armário próprio, cuja chave fica sob a responsabilidade de uma farmacêutica. O controle destas amostras será feito por preenchimento de formulário específico nos quais serão detalhadas a quantidade e finalidade do uso destes medicamentos.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DE LORAZEPAM NAS AMOSTRAS DE PLASMA

A quantificação do fármaco será realizada no Laboratório Analítico do BIOFAR, localizado à Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, que possui estrutura adequada para realização das análises de quantificação de amostras biológicas.

As amostras de plasma de voluntários que receberem lorazepam serão analisadas paralelamente a curva de calibração com seis a oito pontos e a amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações em triplicata. As amostras de plasma padrão da curva de calibração e as amostras de plasma de controle de qualidade a serem utilizadas serão obtidas adicionando-se padrão de referência de lorazepam a plasma “branco”.

3.3 ENSAIO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA

O presente protocolo de estudo foi elaborado conforme a Resolução RE 894, de 29 de maio de 2003, “Guia para elaboração de protocolo de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência”.

3.3.1. CASUÍSTICA

O estudo será realizado em humanos, de acordo com as normas estabelecidas pela Resolução 196, de 10 de outubro de 1996, que estabelece os requisitos para realização de pesquisa clínica de produtos para saúde utilizando seres humanos; com o Manual de Boas

Práticas em Biodisponibilidade e Bioequivalência; e com a Resolução RE 397, “Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos”.

Participação do estudo, no mínimo, 24 e, no máximo, 30 voluntários sadios, de ambos os sexos, devidamente informados sobre as características da pesquisa e que assinarão Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias. A prestação de esclarecimentos aos voluntários sobre o ensaio e a obtenção dos termos de consentimento serão realizadas pelos pesquisadores integrantes da equipe de trabalho, apresentados na página de título do presente projeto.

Os voluntários deverão satisfazer os seguintes critérios:

- ⇒ não fumantes ou fumantes até 10 cigarros/dia;
- ⇒ bom estado de saúde, idade entre 21 e 45 anos, e peso dentro do ideal $\pm 15\%$, calculado pela fórmula $PI = (H - 100)$ para homens e $PI = 0,9 \times (H - 100)$ para mulheres, em que PI é o peso ideal (kg) e H, a altura do voluntário (cm);
- ⇒ ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- ⇒ sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;
- ⇒ não devem estar em tratamento com medicamentos;
- ⇒ voluntárias do sexo feminino não devem estar em estado de gravidez (comprovado através de exame laboratorial) ou em período de amamentação.

A inclusão dos indivíduos será baseada também em resultados de exames clínicos e laboratoriais, além do eletrocardiograma.

O exame clínico e o eletrocardiograma serão realizados Hospital Universitário da USP, por equipe de profissionais coordenados pelo Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo.

Os exames laboratoriais serão realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas e Pesquisas Clínicas Gastão Fleury S/C Ltda, o qual é habilitado pela ANVISA a executar exames laboratoriais em voluntários para ensaios de biodisponibilidade relativa e participa de programas de qualidade conforme determinado pela Resolução 41/2000 (Brasil, 2000).

De acordo com a Resolução 41/2000 (Brasil, 2000) serão realizados os seguintes exames:

- ⇒ hemograma completo;
- ⇒ uréia;

- ⇒ creatinina;
- ⇒ fosfatase alcalina;
- ⇒ glicemia;
- ⇒ bilirrubina total;
- ⇒ proteínas totais e albumina;
- ⇒ transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP);
- ⇒ ácido úrico;
- ⇒ colesterol total;
- ⇒ triglicérides;
- ⇒ urina tipo I;
- ⇒ sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C;
- ⇒ β -HCG para mulheres;
- ⇒ eletrocardiograma com doze derivações.

Todos os exames laboratoriais, exceto a sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C, serão realizados também no período pós-estudo. Além disso, os voluntários farão outro eletrocardiograma e passarão por uma avaliação médica.

Os voluntários serão excluídos do estudo nos casos a seguir:

- ⇒ não satisfaçam os critérios de inclusão supracitados;
- ⇒ apresentem resultados fora da normalidade para os exames clínicos e laboratoriais e que o médico considere relevante;
- ⇒ apresentem mal-estar decorrente da retirada de amostras de sangue, tal como tontura, queda de pressão ou desmaio e expressem desejo de serem excluídos do estudo;
- ⇒ apresentem reações adversas ao medicamento administrado e expressem desejo de serem excluídos do estudo;
- ⇒ independentemente de qualquer intercorrência, expressem desejo de serem excluídos do estudo.

Não participarão desse ensaio alunos, docentes e funcionários envolvidos com os cursos e disciplinas do pesquisador ou dos colaboradores.

Será realizado seguro individual para todos os voluntários durante o período do ensaio, que prevê indenização de R\$ 50.000,00 em caso de morte, invalidez total ou parcial. O seguro será contratado pelo BIOFAR após a seleção dos voluntários, com a empresa Liberty Paulista Seguros.

Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e a confidencialidade dos dados obtidos.

3.3.2 PROCEDIMENTO DO ENSAIO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA

A internação para o estudo será feita no Hospital Universitário da USP, situado à Av. Prof. Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP o qual conta com todos os recursos exigidos pela ANVISA para a realização de estudos clínicos desta natureza.

O ensaio será do tipo aleatório, cruzado, formando-se dois grupos com igual número de voluntários, A e B conforme determinado pela Resolução 397 de 12 de novembro de 2004 (Brasil, 2004). Na Fase 1, os voluntários do grupo A receberão dois comprimidos do produto Lorax[®], contendo 2 mg de lorazepam (dose total de 4 mg), empregado como produto referência, enquanto os do grupo B receberão dois comprimidos do produto Lorazepam Teuto, contendo 2 mg de lorazepam (dose total de 4 mg), empregado como produto teste. Na Fase 2 o procedimento será invertido, de modo que cada um dos voluntários tenha tomado os dois produtos em estudo.

Entre as fases haverá um período de “wash out” adequado, correspondente a, no mínimo, 10 vezes o valor da meia-vida de eliminação da lorazepam. No presente estudo, este período será de, no mínimo, 10 dias.

Os produtos serão administrados aos voluntários pela manhã, após jejum de 8 horas, e serão ingeridas com auxílio de 250 mL de água. Os voluntários receberão almoço, lanche e jantar padronizados respectivamente quatro, sete e dez horas após a administração.

Os voluntários não deverão ingerir bebidas alcoólicas, café e outras bebidas xânticas 48 horas antes do ensaio e durante a sua realização. Além disso, não deverão tomar qualquer medicamento uma semana antes do estudo ou durante sua realização. Entretanto, caso haja necessidade, os coordenadores do estudo deverão ser comunicados.

Após a conclusão do estudo não haverá restrições e nem proibições.

O ensaio *in vivo* será realizado em duas fases, com intervalo adequado entre elas correspondente a no mínimo, 10 vezes a meia-vida de eliminação da lorazepam. Nas duas fases, os voluntários permanecerão no local do ensaio durante, aproximadamente 24 horas, para coletas até a décima segunda hora após a administração, retornando ao hospital para as demais coletas, mas sem internação. A coleta das amostras de sangue será realizada por pessoal qualificado, sendo realizada com material descartável.

Um profissional médico, devidamente equipado com instrumentos e medicamentos para uso em caso de emergência, estará acompanhando a execução do ensaio. Durante o período de internação o médico registrará o estado geral dos voluntários nos formulários de Avaliação clínica do voluntário e Registro de eventos adversos. Os voluntários serão ressarcidos de todos os gastos e prejuízos associados ao ensaio, tais como transporte e ausência do trabalho. Além disso, receberão almoço, lanche e jantar padronizados no primeiro dia de coleta de amostras de sangue em cada Fase.

3.3.3 COLETA TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

A coleta de amostras será realizada no Hospital Universitário da USP, localizado à Av. Prof. Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, que possui área específica para a realização de ensaios de biodisponibilidade relativa, com local apropriado para coleta de amostras e repouso dos voluntários. Essas instalações contam com 32 leitos e oferecem segurança à realização dos procedimentos e tratamento de possíveis intercorrências, e conforto aos voluntários, garantindo sua privacidade e não exposição a pacientes ou a risco de contrair doenças.

O Hospital Universitário da USP apresenta, ainda, excelente infra-estrutura para atendimento de eventuais emergências decorrentes do procedimento. Haverá supervisão médica durante todo o período do confinamento, realizada pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo. Cabe ressaltar que todas as coletas de sangue serão realizadas com material descartável e por pessoal especializado.

Serão coletadas amostras de 8 mL de sangue em tubo heparinizado a 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 6:00, 8:00, 12:00, 24:00, 48:00, 72:00, 96:00 horas após a

administração dos produtos. Assim, serão retirados, de cada voluntário, 128 mL de sangue por etapa e 256 mL no total, ao final do ensaio. As amostras de sangue coletadas serão centrifugadas para separação do plasma e este será congelado a -20°C até a realização do ensaio para quantificação do fármaco.

Ao final do estudo e após cada coleta adicional, as amostras de plasma serão transportadas até o laboratório analítico do BIOFAR em caixas com isolamento térmico, sendo o congelamento garantido com o auxílio de gelo seco. Por ocasião do recebimento das amostras pela unidade analítica do BIOFAR, as mesmas serão avaliadas em relação às suas condições gerais (integridade do frasco, congelamento ou descongelamento e presença de vazamento).

As amostras de plasma dos voluntários serão armazenadas em freezer a -20°C , o qual conta com controlador de temperatura em tempo integral, por um período de um ano após a entrega do relatório final ao patrocinador do estudo. As amostras serão descartadas apenas mediante autorização da empresa patrocinadora do estudo.

3.3.4 AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA ENTRE OS PRODUTOS

A biodisponibilidade relativa entre os produtos será determinada através da comparação dos parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção do fármaco a partir das duas formulações (Ritschel, 1992; Shargel, Yu, 1992).

Os parâmetros avaliados serão:

- { C_{max} : concentração plasmática máxima que o fármaco atinge após a administração;
- { t_{max} : tempo necessário para C_{max} ;
- { ASC_{0-t} : área sob a curva “concentração plasmática vs tempo” do tempo zero a última concentração quantificável;
- { $\text{ASC}_{0-\text{inf}}$: área sob a curva “concentração plasmática vs tempo” do tempo zero extrapolada ao infinito.

O parâmetro ASC_{0-t} relaciona-se à quantidade de fármaco absorvida, enquanto que os parâmetros C_{max} e t_{max} relacionam-se à velocidade desse processo.

Também serão calculados os seguintes parâmetros farmacocinéticos relativos à eliminação (Ritschel, 1992; Shargel, Yu, 1992):

- ⇒ $t_{(1/2)el}$: meia-vida de eliminação plasmática do fármaco;
- ⇒ k_{el} : constante de velocidade de eliminação do fármaco (β).

Os resultados obtidos serão avaliados através do teste “t” de Student, da análise da variância (ANOVA) e da construção do intervalo de confiança 90 %, conforme 397 de 12 de novembro de 2004 (Brasil, 2004). Inicialmente, será realizada análise multivariada, utilizando-se análise de variância (ANOVA), para os parâmetros C_{max} , t_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} , na escala original e na escala logarítmica. Em seguida, será determinado o intervalo de confiança 90 % (I.C. 90 %) para as relações entre os valores de C_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} dos produtos teste e referência, utilizando-se para tal a escala logarítmica. Será considerado nível de significância (α) menor que 0,05. Dois produtos são considerados bioequivalentes se os intervalos de confiança 90 % para as relações entre os valores de C_{max} e ASC_{0-t} de ambos, calculados com base nas transformações logarítmicas, estiverem entre 80 e 125 %.

A identificação de dados discrepantes será realizada através do gráfico de ‘Ramos e Folha’ e “Box-Plot” por produto e por parâmetro farmacocinético. Entretanto a retirada de qualquer dado discrepante só será permitida se acompanhada de justificativa.

A análise estatística será realizada por uma profissional com formação em bioestatística, pertencente ao quadro de funcionários do BIOFAR.

4. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

Por se tratar de um fármaco já comercializado em diversos países, normalmente bem tolerado, que será administrado a voluntários sadios em doses únicas (2 comprimidos de 2 mg), sem administração concomitante de outros fármacos e sob a supervisão de profissional médico, considera-se esta pesquisa como de risco mínimo.

Cada voluntário receberá duas doses únicas de lorazepam correspondente a 4 mg do fármaco por dose. Como se tratam de doses únicas, não haverá acúmulo do fármaco no organismo do voluntário, já que cada dose somente será administrada após eliminação completa da dose anterior. Desta forma, o risco de ocorrência de efeitos colaterais fica bastante

reduzido quando comparado ao esquema tradicional de administração de lorazepam em doses múltiplas.

Os efeitos adversos observados mais comuns relacionados à administração de lorazepam são dor no peito, fadiga, hipoglicemia, diarreia, infecção no trato urinário, anemia, fraqueza, tosse e hipertensão (Drug Information Handbook International, 2005).

Outros efeitos adversos descritos em 1% a 10% são (Drug Information Handbook International, 2005):

- Sistema cardiovascular: hipotensão;
- Sistema nervoso central: vertigens, hipoestesia, febre e insônia;
- Sistema dermatológico: celulite;
- Sistema endócrino e metabólico: hipercalcemia;
- Trato gastrointestinal: gastrite, ganho de peso, dispepsia, dor abdominal e náusea;
- Sistema neuromuscular: dor nas articulações, mialgia, dor nas pernas;
- Respiratório: bronquite, infecção no trato respiratório superior, congestão nasal, sinusite;

Além destes, existem relatados na literatura outros efeitos adversos em menos de 1% dos casos: edema, cefaléia, faringite, psicose aguda, ageusia, alopecia, anemia, angina, angioedema, arritmia, depressão, dispnéia, hepatite, impotência, erupções cutâneas, infarto do miocárdio, pancreatite, parestesia, fotossensibilidade, síncope e urticária (Drug Information Handbook International, 2005).

Alguns tipos de produtos farmacêuticos não necessitam de ensaios *in vivo* para comprovação de biodisponibilidade relativa. Entretanto, conforme os critérios estabelecidos na Resolução 135 de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003a), este não é o caso de comprimidos de lorazepam. Para esse medicamento, os ensaios *in vivo* são indispensáveis para a comprovação de bioequivalência com o produto de referência.

Embora não existam benefícios diretos aos voluntários que participarem deste estudo, o mesmo trará benefícios indiscutíveis à população, na medida em que permitirá o advento de medicamentos com qualidade biofarmacêutica comprovada.

4. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

O trabalho será executado de acordo com a seguinte programação:

Etapa	Período
Elaboração do protocolo	0,5 mês
Planejamento da etapa clínica	0,5 mês
Execução da etapa clínica	0,5 mês
Análise das amostras	0,5 mês
Análise estatística	0,5 mês
Elaboração do relatório final	0,5 mês
Total	3,0 meses

5 LOCAL DE EXECUÇÃO E INFRA-ESTRUTURA

O ensaio clínico de biodisponibilidade relativa será realizado no Hospital Universitário da USP, localizado à Av. Prof. Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP; e a quantificação do fármaco e análise estatística serão realizadas no BIOFAR - Laboratório de Biofarmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, localizado à Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 15, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP.

O Hospital Universitário da USP conta com toda a infra-estrutura necessária para coleta de amostras biológicas de voluntários sadios dentro das normas internacionais para estudos desse tipo e do disposto na Resolução 41/2000, garantindo a integridade física e psicológica dos indivíduos da pesquisa. Oferece, ainda, segurança à realização dos procedimentos, tratamentos de possíveis intercorrências e conforto aos voluntários, garantindo sua privacidade e não exposição a pacientes ou a riscos de contrair doenças. O Hospital Universitário da USP apresenta, ainda, excelente infra-estrutura para atendimento de eventuais emergências

decorrentes do procedimento. Haverá supervisão médica durante todo o período do confinamento, realizada pela equipe coordenada pelo Dr. Paulo Andrade Lotufo.

O BIOFAR está habilitado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a realizar ensaios de biodisponibilidade relativa e conta com equipe qualificada, além de todos os equipamentos necessários para armazenamento, preparação, e análise das amostras de plasma dos voluntários, incluindo congeladores com controle de temperatura em tempo integral e equipamentos para processamento de amostras (centrífugas, pipetas, cromatógrafos, etc.) devidamente calibrados e validados, conforme exigências da Resolução 41/2000.

ANEXOS AO PROTOCOLO DE ESTUDO

TERMO DE RESPONSABILIDADE

De acordo com o artigo V da Resolução 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde, o pesquisador abaixo designado, responsável pelo desenvolvimento do projeto **“AVALIAÇÃO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE COMPRIMIDOS CONTENDO 2 MG DE LORAZEPAM PRODUZIDOS POR LABORATÓRIO TEUTO BRASILEIRO E LABORATÓRIOS WYETH-WHITEHALL LTDA”**, ao assinar o presente termo, assume a responsabilidade de comunicar imediatamente à Instituição e ao patrocinador toda e qualquer complicação ocorrida durante a realização do referido projeto, que ponha em risco voluntários ou bens incluídos no trabalho.

Responsabiliza-se, outrossim, a acompanhar as diligências necessárias à imediata e integral assistência aos voluntários participantes ou à reposição ou restauração de bens eventualmente danificados durante a pesquisa.

São Paulo, 08 de abril de 2005

Profa. Dra. Valentina Porta
Pesquisadora Principal

DECLARAÇÃO

De acordo com o artigo VI da Resolução 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde, o pesquisador abaixo designado, responsável pelo desenvolvimento do projeto **“AVALIAÇÃO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE COMPRIMIDOS CONTENDO 2 MG DE LORAZEPAM PRODUZIDOS POR LABORATÓRIO TEUTO BRASILEIRO E LABORATÓRIOS WYETH-WHITEHALL LTDA”**, declara que os resultados obtidos serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não, através de publicação em revista científica especializada na área de Ciências Farmacêuticas.

São Paulo, 08 de abril de 2005

Profa. Dra. Valentina Porta
Pesquisadora Principal

DECLARAÇÃO

De acordo com o artigo VI da Resolução 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde, o pesquisador abaixo designado, responsável pelo desenvolvimento do projeto **“AVALIAÇÃO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE COMPRIMIDOS CONTENDO 2 MG DE LORAZEPAM PRODUZIDOS POR LABORATÓRIO TEUTO BRASILEIRO E LABORATÓRIOS WYETH-WHITEHALL LTDA”**, declara que os dados coletados e o material biológico obtido serão utilizados exclusivamente para os objetivos descritos no referido projeto de pesquisa.

São Paulo, 08 de abril de 2005

Profa. Dra. Valentina Porta
Pesquisadora Principal

DECLARAÇÃO

O pesquisador abaixo designado, ao assinar o presente termo, declara sua concordância em participar do projeto **“AVALIAÇÃO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE COMPRIMIDOS CONTENDO 2 MG DE LORAZEPAM PRODUZIDOS POR LABORATÓRIO TEUTO BRASILEIRO E LABORATÓRIOS WYETH-WHITEHALL LTDA”**, na qualidade de Coordenador Médico.

São Paulo, 08 de abril de 2005

Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo
Coordenador médico

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Obrigatório para Pesquisa Científica em Seres Humanos - Resoluções CNS 196/96 e 251/97)

1. Identificação do voluntário

Nome:.....Sexo:.....

Identidade:..... Nascimento:.....

Endereço:.....

Telefone:.....

2. Informações sobre a pesquisa

Título: AVALIAÇÃO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE COMPRIMIDOS CONTENDO 2 MG DE LORAZEPAM PRODUZIDOS POR LABORATÓRIO TEUTO BRASILEIRO E LABORATÓRIOS WYETH-WHITEHALL LTDA

Pesquisadores envolvidos: Profa. Dra. Valentina Porta, Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo, Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra, e Farmacêutica Eunice Kazue Kano

Avaliação de risco: risco mínimo

3. Informações ao voluntário

Justificativa e objetivos da pesquisa: (esclarecer o voluntário sobre a finalidade da pesquisa): Este estudo pretende comparar dois tipos de comprimidos contendo lorazepam, produzidos por duas indústrias diferentes. O lorazepam é um remédio usado para o tratamento de crises de ansiedade e como calmante.

Procedimentos: (esclarecer o voluntário sobre os procedimentos a que será submetido): Para ser incluído no estudo, você será submetido a um exame de eletrocardiograma, avaliação clínica e exames laboratoriais, com quatro coletas de amostras de sangue e uma de urina. Serão realizados os seguintes exames laboratoriais: hemograma completo; uréia; creatinina; fosfatase alcalina; glicemia; bilirrubina total; proteínas totais e albumina; transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP); ácido úrico; colesterol total; triglicérides; urina tipo I; sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C. As coletas de sangue e urina para exames laboratoriais serão realizadas pelo Laboratório de análises clínicas e pesquisas clínicas Gastão Fleury S/C Ltda, localizado à Av. General Waldomiro de Lima, no. 508, Jabaquara, SP, que é habilitado pela ANVISA a executar exames laboratoriais em voluntários para ensaios de biodisponibilidade. Ao final do estudo estes mesmos exames laboratoriais e clínico serão repetidos, juntamente com o eletrocardiograma. A avaliação médica e o eletrocardiograma serão realizados no Hospital Universitário localizado à Av. Prof. Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, pela equipe coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo. Você será internado no Setor de Ensaios Clínicos do Hospital Universitário da USP, localizado à Av. Prof. Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, na noite anterior ao estudo. Você não poderá levar nenhum tipo de alimento para o hospital, pois, a partir do momento da internação, você receberá dieta padronizada. No dia do estudo você tomará dois comprimidos com água. Além disso, o jejum deverá ser mantido até quatro horas depois de tomar o remédio. Para avaliar a absorção do remédio pelo organismo serão realizadas coletas de sangue nos seguintes 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 6:00, 8:00, 12:00, 24:00, 48:00, 72:00, 96:00 horas após tomar o remédio. Desta forma, em cada fase serão retirados 128 mL de sangue, e 256 mL no total ao final do ensaio. Este procedimento será repetido com os outros dois comprimidos, com intervalo de, no mínimo, dez dias. Para evitar que sua veia seja puncionada muitas vezes no dia da internação, será colocado um sistema apropriado para a retirada de sangue.

Ocorrência de efeitos indesejáveis (esclarecer os voluntários sobre possíveis efeitos indesejáveis associados ao ensaio): O lorazepam é um remédio utilizado mundialmente. Entre os países que aprovaram sua utilização estão os Estados Unidos e os países da Europa. Também no Brasil sua utilização é permitida pelo Ministério da Saúde. O lorazepam geralmente é bem tolerado. Devido a administração de duas doses de 2 comprimidos de 2 mg de lorazepam (dose total de 4 mg) o aparecimento de algum efeito desagradável é pouco provável. Entretanto é contra-indicado em pacientes com história de alergia. Algumas reações desagradáveis são: dor no peito, cansaço, diminuição do açúcar no sangue, diarreia, infecção urinária, tosse, fraqueza, aumento da pressão. Outros efeitos

adversos descritos com menor frequência são: diminuição da pressão, tontura, febre, falta de sono, celulite, gastrite, aumento de peso, dor de barriga, enjôo, dor nas articulações, dor nas pernas, bronquite e sinusite. Além destes, existem relatados raros efeitos desagradáveis: dor de cabeça, faringite, perda de cabelos, anemia, problemas no coração e no fígado, impotência, aparecimento de feridas na pele e coceiras. Entretanto, tais reações são observadas em pacientes que recebem lorazepam por muitos dias. Nas condições em que será realizado o presente estudo (administração de doses únicas de 4 mg de lorazepam) é improvável o aparecimento de algum desses efeitos. Durante a coleta de sangue, algumas pessoas podem sentir fraqueza e até mesmo desmaiar por causa da picada. Também podem surgir hematomas e dor no local da picada. Entretanto, esses efeitos são passageiros e não são graves. A coleta de amostras será acompanhada por um médico que poderá atendê-lo no caso de alguma eventualidade, além de esclarecer qualquer dúvida.

Benefícios esperados: Alguns tipos de remédio não necessitam de ensaios em seres humanos para verificar se agem da mesma forma no organismo e se podem ser substituídos entre si. Entretanto, conforme os critérios estabelecidos na Resolução 135/2003, este não é o caso de comprimidos de lorazepam. Para esses produtos, o ensaio em seres humanos é indispensável. Assim, embora não exista nenhum benefício direto aos voluntários por sua participação no estudo aqui descrito, o mesmo trará benefícios indiscutíveis à população, na medida em que permitirá a comercialização de comprimidos de lorazepam com qualidade comprovada.

Métodos alternativos existentes: Atualmente, não existem outros métodos que possam ser aplicados em estudos desse tipo.

Forma de acompanhamento e assistência: O ensaio será acompanhado por profissional médico capacitado a prestar assistência em caso de necessidade. Os pesquisadores estarão à disposição dos voluntários para quaisquer esclarecimentos nos telefones 3815-8484 (Profa. Dra. Valentina Porta, Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra e Farmacêutica Eunice Kazue Kano) e 3039-9485 (Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo).

Garantia de sigilo: Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por códigos, garantindo sua privacidade e a confidencialidade dos dados obtidos.

Ressarcimento de despesas: Cada voluntário receberá R\$ 420,00 (quatrocentos e vinte reais) como forma de ressarcimento das despesas decorrentes de sua participação na pesquisa.

Indenização (Seguro): A ocorrência de eventuais danos associados à pesquisa será devidamente indenizada por meio de seguro individual contratado para os voluntários pela empresa Liberty Seguros, que prevê indenização de R\$ 100.000,00 em caso de morte e de R\$ 50.000,00 em caso de invalidez total ou parcial.

Outros esclarecimentos: Você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida que possa surgir, em qualquer etapa do estudo e também terá a liberdade de retirar seu consentimento e sair do estudo no momento em que desejar.

4. Consentimento pós-informação

Após ter sido devidamente informado sobre a justificativa e objetivos da pesquisa e os procedimentos a que serei submetido, e receber a garantia de ser esclarecido sobre qualquer dúvida e de ter a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, consinto, de livre e espontânea vontade, em participar da pesquisa "AVALIAÇÃO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA DE COMPRIMIDOS CONTENDO 2 MG DE LORAZEPAM PRODUZIDOS POR LABORATÓRIO TEUTO BRASILEIRO E LABORATÓRIOS WYETH-WHITEHALL LTDA".

São Paulo, de2005.

Voluntário

Pesquisador

Testemunha 1

Testemunha 2

9 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCON, W.J. A implantação de medicamentos genéricos no Brasil. **Pharmaceutical Technology, Edição Brasileira**, v.8, n.5, p. 58, 2004.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAN, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, n.3, p.413-420, 1995.

ANDRAUS, M.H.; WONG, A.; SILVA, O.A.; WADA, C.Y.; TOFFLETO, O.; AZEVEDO, C.P.; SALVADORI, M.C. Determination of bromazepam in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection: application to a bioequivalence study. **Journal of Mass Spectrometry**, v.39, n.11, p.1348-1355, 2004.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p.65-79, 588.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 6.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p.61-98.

Applied Biosystems. Espectrometria de massas e suas aplicações. São Paulo: ABI EXPERT Training Center, 2006. p.3-49.

ARDREY, R.E. **Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction**. New York, Chichester: John Wiley, 2003. p.1-5. (Analytical techniques in the sciences).

ASSOCIAÇÃO DOS LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS NACIONAIS. Jornal ALANAC. Destaques. 2005. **XXVI Assembléia Anual da ALIFAR, Guatemala, maio de 2005**. Disponível em: <http://www.alanac.org.br/2007/jornalalanac/index.asp?p=destaques>. Acesso em: 12 jan. 2007.

ASTIGARRAGA, R.B.E. Ensaio bioanalítico utilizando espectrômetros de massa. **Fármacos & Medicamentos**, v.4, n.24, p.29, 2003.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.226-227, 247-251.

AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE. Medicamentos Uso Humano. Avaliação Técnico Científica. Avaliação de Biodisponibilidade/Bioequivalência (BD/BE). Disponível em:

http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AVALIACAO_TECNICO_CIENTIFICA/AVALIACAO_DISPONIBILIDADE_EQUIVALENCIA. Acesso em: 23 jan. 2007.

BOAS, O.M.G.C.V. **Apostila de farmacologia**. Alfenas, 2006. p.15-32.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública n.46, de 17 de agosto de 2006c**. Apresenta a proposta de de Resolução que altera o regulamento técnico sobre rotulagem de medicamentos (Resolução – RDC n.333, de 2003). Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B15793-1-0%5D.PDF>. Acesso em: 15 fev. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência**. Brasília: Gerência Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos, 2002a. v.1, módulo 1/3.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência**. Brasília: Gerência Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos, 2002b. v.2, módulo 3, p.50.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.344, de 12 de maio de 1998**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=20054&word=>. Acesso em: 24 fev. 2007b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.898, de 29 de maio de 2003d**. Determina a publicação do "Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência". Diário Oficial da União; Brasília, de 02 de junho de 2003. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 14 abr. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Decreto n.793, de 05 de abril de 1993** Altera os Decretos n.74.170, de 10 de junho de 1974 e n.79.094, de 5 de janeiro de 1977, que regulamentam, respectivamente, as Leis n.5.991, de 17 de janeiro de 1973, e n.6.360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=513&word=>. Acesso em: 14 mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Lei n.9279, de 14 de maio de 1996**. Regula os direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=5565&word=>. Acesso em: 14 mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução n.391, de 09 de agosto de 1999b**. Aprova o regulamento técnico para registro de medicamentos genéricos no Brasil. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=251&word=>. Acesso em: 14 mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **RDC n.333, de 19 de novembro de 2003c**. Dispõe sobre rotulagem de medicamentos e outras providências. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15220&word=>. Acesso em: 14 mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.478 de 19 de março de 2002c**. Determina a publicação do "Guia para Provas de Bioequivalência de Medicamentos Genéricos". Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=5364&word=>. Acesso em: 7 out. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade**: bioequivalência. Brasília: Gerência Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos, 2002d. v.1, módulo 2/3.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.1170, de 19 de abril de 2006b**. Determina a publicação do Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21746&word=>. Acesso em: 14 Abr. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003b**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE n.475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>. Acesso em: 14 Abr. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.16, de 02 de março de 2007a**. A Agência Nacional de

Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos, anexo I. Acompanha esse Regulamento o Anexo II, intitulado "Folha de rosto do processo de registro e pós-registro de medicamentos genéricos". Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25960&word=>. Acesso em: 04 jun. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.51, de 15 de agosto de 2007c**. Altera o item 2.3, VI, do Anexo I, da resolução RDC nº. 16, de 2 de março de 2007 e o Anexo da resolução nº. 17, de 2 de março de 2007.. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 12 dez. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Lei n.9787, de 10 de fevereiro de 1999**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências, altera a Lei n.6.360. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16622&word=>. Acesso em: 04 jan.. 2007.

BUENO, M.M. **Implantação, evolução aspectos técnicos e perspectivas da regulamentação técnica de biodisponibilidade relativa e bioequivalência de medicamentos genéricos e similares no Brasil**. São Paulo, 2005. 193p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CAILE, G.; SPENARD, J.; LACASSE, Y.; BRENNAN, J. Pharmacokinetics of two lorazepam formulations, oral and sublingual, after multiple doses. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v.4, p.31-42, 1983.

CARRIZO, F.E.E. Estudos de bioequivalência: enfoque metodológico y aplicaciones prácticas em la evaluación de medicamentos genéricos. **Revista Médica del Uruguay**, v.16, p.133-143, 2000.

CAUSON, R. 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.

CEPANEC, I.; MIKUDAS, H.; LITVIC, M.; VUKUSIC, I. Isolation and identification of a new impurity in lorazepam substance. **Pharmazie**, v.56, n.11, p.857-859, 2001.

CHEN, X.Y.; ZHONG D.F.; XU, H.Y.; SCHUG, B.; BLUME, H. Sensitive and specific liquid chromatographic - tandem mass spectrometric assay for dihydroergotamine and its major metabolite in human plasma. **Journal of Chromatography, B:**

Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.768, p.267-275, 2002.

CHOW, S.C.; LIU, J.P. **Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2000. p.16-19, 400-442.

CID CARCAMO, E. **Introducción a la farmacocinética**. Washington: OEA, 1982. 114 p. (Serie de biología: monografía n.25).

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Publicações CREMESP. HomePage.Disponível em : <http://www.cremesp.com.br>. Acesso em: 3 dez. 2007.

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S, FERRAZ, H.G. Aspectos farmacotécnicos relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.21, n.1, p.23-41, 2000.

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, n.1, p.14-19, 2000.

COOK, H.J. Panorama regulativo sobre BD/BE/Disolución en América Latina, 2006.

CORDIOLI, A.V. **Psicofármacos**: consulta rápida. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CRIMELLE, V.; KINTZ, P.; MANGIN, P. Detection and quantification of lorazepam in human hair by GC-MS/MS in a case of traffic accident. **International Journal of Legal Medicine**, v.108, n. 5, p. 265-267, 1996.

DE NUCCI, G.; MORAES, L.A.; LERNER, F.E.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.; CORSO, G. Fluconazole bioequivalence study: quantification by tandem mass spectrometry. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.21, n.2, p.200-207, 1999.

DIGHE, S.V. A review of the safety of generic drugs. **Transplantation Proceedings**, v.31, suppl.3A, p.235-245, 1999.

DIPIRO, J.T.; BLOUIN, R.A.; PRUEMER, J.M.; SPRUILL, W.J. **Concepts in clinical pharmacokinetics**: a self-instructional course. 2.ed., 1996. p.37-39.

DOMINGUEZ, K.; CROWLEY, M.; COLEMAN, D.; KATZ, R.; WILKINS, D.; KELLY, H. Withdrawal from lorazepam in critically ill children. **The Annals of Pharmacotherapy**, v.40, p.1035-1039, 2006.

DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAN, V.P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v.15, n.1, p.11-22, 1998.

ESSIEN, H.; LAI, S.J.; BLINDER, S.R.; KING, D.L. Use of direct-probe mass spectrometry as a toxicology confirmation method for demoxepam in urine following high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, Biomedical Applications**, v.683, n.2, p.199-208, 1996.

EUROPEAN AGENCY FOR EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. Human Medicines Evaluation Unit. Committee for Proprietary medicinal Products. **Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence**. London: EMEA, 2002. p.17.

FILTZGERALD, R.L.; REXIN, D.A.; HEROLD, D.A. Benzodiazepine analysis by negative chemical ionization gas chromatography / mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v.17, p.342-347, 1993.

GIBALDI, M. **Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 406p.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill Interamericana, 1996. p.290-311.

GUERRA, P.; TAVARES, B.; SOTO-MATOS, A.; GOMEZ-CRIADO, M.; CARCAS, A.; FRIAS, J. Sex and menstrual cycle influence in lorazepam pharmacokinetics. **Pharmacology and Toxicology**, v.89, p.92, 2001.

GUIDANCE for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products: general considerations. Rockville: FDA, 2003. 23p. Disponível em: <http://www.fda.gov/Cder/guidance/5356fnl.pdf>. Acesso em: 10 dez 2006.

HAILING, Q.; NA, G.; LINJING, J.; LIRPONG, Z.; QITANG, Z.; YUZHONG, G.; XIN, T. Relative bioavailability of lorazepam tablets in healthy volunteers. **Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi**, v.25, n.3, p.238-240, 2005.

HAUCK, W.W.; ANDERSON, S. Measuring switchability and prescribability: when is average bioequivalence sufficient? **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v.22, n.6, p.551-564, 1994.

HOLOVAC, M.A. **A balancing act in the United States drug industry**: pioneer and generic drugs, the orange book, marketing protection and the US consumer.

Rockville: Office of Generic Drugs, Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, 2004. p.1-7.

JACKSON, A.J., ed. **Generics and bioequivalence**. Boca Raton: CRC, 1994. 203p.

KANAZAWA, H.; KINITO, Y.; MATSUSHIMA, Y.; OKUBO, S.; MASHIGE, F. Stereospecific analysis of lorazepam in plasma by chiral column chromatography with a circular dichroism-based detector. **Journal of Chromatography, A**, v.871, p.181-188, 2000.

KANAZAWA, H.; KONISHI, Y.; MATSUSHIMA, Y.; TAKAHASHI, T. Determination of sedatives and anesthetics in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with a desalting system. **Journal of Chromatography, A**, v.797, p.227-236, 1998.

KANO, E.K. **Avaliação biofarmacêutica de formulações contendo cefadroxil: estudos *in vivo* e *in vivo* (bioequivalência)**. São Paulo, 2002. 233p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**: 1999/2000. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.3.3.

KÖVES, G.; Synthesis of deuterium labeled lorazepam. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, V.29, n.1, p. 15-22, 2006.

LACY, C.F.; AMSTRONG, L.L.; GOLDMAN, M.P. **Drug information handbook international 2005-06**. 13.ed. Hudson: Lexi-Comp, 2005. 2223p.

LEE, X.; KUMAZAWA, T.; SATO, J.; SHOJI, Y.; HASEGAWA, C.; KARIBE, C.; ARINOBU, T.; SENO, H.; SATO, K. Simple method for the determination of benzodiazepines in human body fluids by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.492, p.223-231, 2003.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G.L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system: new scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p.3-12, 2000.

MARCOLIN, M.A. **Interações farmacológicas com drogas psiquiátricas**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1998. 407p.

MARTIN, I.D.; VILADROSA, J.L. Liberación: factores fisicoquímicos. In: BERROZPE, J.D.; LANAJO, J.M.; DELFINA, J.M.P. **Biofarmacia y farmacocinética**. Madrid: Editorial Síntesis, 2000. v.2, cap.13, p.276-292.

MARZO, A. Clinical pharmacokinetic registration file for NDA and ANDA procedures. **Pharmacological Research**, v.36, p.425-450, 1997.

MATZ, L.M.; HILL, H.H. Separation of benzodiazepines by electrospray ionization ion mobility spectrometry-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.457, p.235-245, 2002.

MORAES, M.C.B.; LAGO, L. Espectrometria de massas com ionização por electrospray aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v.26, n.4, p.556-563, 2003.

MOURA, M.R.L.; REYES, F.G.R. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Revista de Nutrição**, v.15, p.223-238, 2002.

MUCHOHI, S.N.; OBIERO, K.; KOKWARO, G.O.; OGUTU, B.R.; GITHIGA, I.M.; EDWARDS, G.; NEWTON, C.R.J.C. Determination of lorazepam in plasma from children by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.824, n.1/2, p.333-340, 2005.

NEEDLEMAN, S.B.; PORVAZNIK, M. Identification of parent benzodiazepines by gas chromatography / mass spectroscopy (GC/MS) from urinary extracts treated with b-glucuronidase. **Forensic Science International**, v.73, p.49-60, 1995.

NOEL, F. Teste de bioequivalência para fármacos que apresentam farmacocinética altamente variável. **Infarma**, v.15, n.7/8, p. 68-69, 2003.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Workshop Perspectivas para o fortalecimento de mercados de medicamentos similares e genéricos em países em vias de desenvolvimento**. Brasília: ANVISA, OPAS, 2003. Disponível em: <http://www.opas.org.br/>. Acesso em: 12 jan. 2007.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N.S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **International Journal of Pharmaceutics**, v.201, p.131-150, 2000.

PAPINI, O.; BERTUCCI, C.; CUNHA, S.P.; SANTOS, N.A.G.; LANCHOTE, V.L. Quantitative assay of lorazepam and its metabolite glucuronide by reverse-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human plasma and urine samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p.389-396, 2006.

PATNAIK, R.; LESKO, L.J.; CHAN, K.; WILLIAMS, R.L. Bioequivalence assessment of generic drugs: an American point of view. **European Journal of Drug Metabolism**

and Pharmacokinetics, v.21, n.2, p.159-164, 1996. (Sixth European Congress of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics).

PISTOS, C.; STEWART, J.T. Direct injection HPLC method for the determination of selected benzodiazepines in plasma using a Hisep column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.33, p.1135-1142, 2003.

PORTA, V. **Avaliação da bioequivalência de formulações do mercado nacional contendo fluconazol**. São Paulo, 1999. 129p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

PORTA, V.; CHANG, K.H.; STORPIRTIS, S. Evaluation of the bioequivalence of capsules containing 150 mg of fluconazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v.288, n.1, p.81–86, 2005.

Portal Unimeds. Disponível em: http://www.unimeds.com.br/layouts/capa/tematico_drogas. Acesso em: 4 maio 2007.

PSIQWEB: psiquiatria geral. Farmacologia. Veja Medicamentos por Nome, Tipo, Sal... etc. Ansiolíticos - tranquilizantes. **Ansiolíticos e tranqüilizantes 1**. 15/02/2005. Disponível em: <http://virtualpsy.locaweb.com.br/index.php?sec=61&art=253>. <http://www.psiqweb.med.br/farmacologia/ansiol2.html>. Acesso em: 14 fev. 2007

QIU, X.; HU, G.; WANG, J.; DAI, Z. Pharmacokinetics and bioequivalence of lorazepam tablets in chinese healthy volunteers. **Zhongguo Linchuang Yaolixue Zazhi**, v.22, n.2, p.134-137, 2006.

RITSCHER, W.A. **Handbook of basic pharmacokinetics**. 4.ed. Hamilton: Drug Intelligence, 1992. 588p.

ROMEU, A.G. **Avaliação da bioequivalência de formulações do mercado nacional contendo doxiciclina**. São Paulo, 2002. 165p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SAMARA, E.E.; GRANNEMAN, R.G.; WITT, G.F.; CAVANANUGH, J.H. Effect of valproate on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of lorazepam. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.37, p.442-450, 1997.

SERRA, C.H.R. **Avaliação biofarmacotécnica de comprimidos contendo cefalexina**: cinética de dissolução e bioequivalência. São Paulo, 1998. 206p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SKOOG, D; HOLLER, F; CROUCH, S. **Principles of instrumental analysis**. Harcourt College Publishers, 15^o ed., secção V, cap.28, p.275, 2006. disponível em: <http://www.amazon.com/exec/obidos/search-handle-url/002-1458881-6047201?%5>

SOMMER, C.; VENDRAMINI, D.C. Fundamentos e aplicações dos testes de dissolução. **Controle de Contaminação**, v.70, p.30-34, 2005.

SOUZA, J. **Avaliação das características físico-químicas, farmacocinéticas e da biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo associação de lamivudina 150 mg e zidovudina 300 mg**. São Paulo, 2005. 275p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SPITZ, L.; BRASIL, M.A. O uso de benzodiazepínicos na prática clínica. **Revista Residência Médica**, v.1, n.1, jul./set. 1998. Disponível em: http://www.medstudents.com.br/residencia_medica/vol01n01/spitz.htm. Acesso em: 26 jan. 2007.

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

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F.S.; VILANOVA, C.M. 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, S.; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.35, n.1, p1-16, 1999.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. 7.ed. São Paulo: LTC., 1999. p.280-293.

UNITED States Pharmacopeia: USP 28; the National Formulary: NF 23. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p.2642-2644.

UNITED STATES. Code of Federal Regulations. Title 21. **Part 320 - Bioavailability and bioequivalence requirements**. Washington: US Government Printing Office, 1998. p.191-295.

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 requirements. Washington: US Government Printing Office; Rockville: CMC, 2001. p.186-200.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. Departamentos: Acadêmicos. Psicobiologia. HomePage. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (Cebrid). Folhetos sobre drogas. Tranqüilizantes. **Tranqüilizantes ou ansiolíticos.** Disponível em: [http://www.cebrid.epm.br/folhetos/tranquilizantes .htm](http://www.cebrid.epm.br/folhetos/tranquilizantes.htm). <http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/folhetos/tranquilizantes>. Acesso em: 4 maio 2007.

VIPPAGUNTA, S.; BRITTAIN, H.G.; GRANT, D.J.W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.48, p.3-26, 2001.

Waters. **Princípios básicos de espectrometria de massas.** São Paulo, 2005.

WELLEK, S. Basing the analysis of comparative bioavailability trials on an individualized statistical definition of equivalence. **Biometrical Journal**, v.35, n.1, p.47-55, 1993.

WEN-FENG, Y.; ZHANG-YING, M.; JIN-WEN, L. Determination of lorazepam in plasma by LC/MS/MS and its application in the bioequivalence study. **The Chine Journal of Modern Applied Pharmacy**, V.22, n. 4, p. 318-321, 2005.

WERMELING, D.P.H.; MILLER, J.L.; ARACHER S.M.; MANALIGOD, J.M.; RUDY, A.C. Bioavailability and pharmacokinetics of lorazepam after intranasal, intravenous and intramuscular administration. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.41, p.1225-1231, 2001. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/>. Acesso em: 14 mar. 2007.

ZENG, H.; WU, J.T.; UNGER, S.E. The investigation and the use of high flow column-switching LC/MS/MS as a high-throughput approach for direct plasma sample analysis of single and multiple components in pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27, n.6, p.967-982, 2002.

ZHU, H.; LUO, J. A fast and sensitive liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for assay of lorazepam and application to pharmacokinetic analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, p.268-274, 2005.

10. RESUMO

Desenvolveu-se método de alta sensibilidade e especificidade por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS) para quantificação do lorazepam em plasma humano visando aplicação em estudo de bioequivalência entre duas formulações de comprimidos contendo esse fármaco. A preparação das amostras de plasma foi feita por extração líquido-líquido usando hexano:diclorometano (60:40 v/v) como solvente de extração. O padrão interno usado foi o bromazepam. A separação cromatográfica ocorreu utilizando-se coluna analítica modelo Gemini® C18 110 A (150 mm x 4,6 mm; partículas de 5µm). Mistura de metanol e tampão acetato de amônio 10 mM (80:20, v/v), acrescida de 0,1% de ácido fórmico ao final da preparação, foi usada como fase móvel. A interface entre LC e MS/MS foi a fonte de ionização por eletrospray (ESI) operando em modo positivo (ES+). O analito e o PI foram monitorados e quantificados através de multiple reaction monitoring (MRM). As transições monitoradas foram m/z 320,69 > 274,96 para o lorazepam e m/z 318,00 > 182,20 para o padrão interno. O método foi validado na faixa de concentração de 0,50 a 80,0 ng/mL em plasma humano. A bioequivalência entre as formulações foi determinada através dos intervalos de confiança 90 % obtidos para as razões dos parâmetros farmacocinéticos C_{max} (99% - 114%), AUC_{0-t} (93% - 105%) e AUC_{0-inf} (96% - 107%). Concluiu-se que as duas formulações podem ser administradas de maneira intercambiável sem prejuízo da eficácia terapêutica.

Palavras chave: bioequivalência, lorazepam, bromazepam, LC-MS/MS, plasma humano

11. ABSTRACT

A method of liquid chromatography coupled to mass spectrometric detection (LC-MS/MS) with high sensitivity and specificity was developed to quantify Lorazepam in human plasma. This method was applied in a bioequivalence study between two tablet formulations. The preparation of plasma samples were performed by liquid-liquid extraction using hexane-dichloromethane (60:40 v/v) as extraction solvent. The internal standard was bromazepam. The chromatographic separation was achieved using the Gemini® C18 110A (150 mm x 4.6mm; 5µm particles) analytical column. The mobile phase was prepared from a mixture of methanol and 10mM of ammonium acetate (80:20, v/v), and finally adding 0.1% of formic acid. The LC and MS/MS interface was the electrospray ionization source (ESI), operating in positive mode (ESI+). The analyte and internal standard were monitored and quantified through multiple reaction monitoring (MRM). The monitored transitions were m/z 320.69 > 274.96 for lorazepam and m/z 318.00 > 182.20 for the internal standard. The method was validated over the range 0.50 to 80.0 ng/mL in human plasma. The bioequivalence between the two formulations was determined inside the 90% confidence interval for the pharmacokinetic parameters, C_{max} (99% - 114%), AUC_{0-t} (93% - 105%) and AUC_{0-inf} (96% - 107%). It was concluded that the two formulations can be administered in an interchangeable manner without losing the therapeutic efficiency.

Keywords: Bioequivalence, lorazepam, bromazepam, LC-MS/MS, human plasma.