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

Determinação da bioequivalência do metronidazol a partir de
comprimidos revestidos

Marina de Freitas Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica

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

Silva, Marina de Freitas
S586d Determinação da bioequivalência do metronidazol a partir de comprimidos revestidos / Marina de Freitas Silva. -- São Paulo, 2009.
183p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Serra, Cristina Helena dos Reis

1. Bioequivalência : Farmacocinética 2. Biodisponibilidade : Farmacocinética 3. Espectrometria de massa : Química analítica 4. Antiinfecioso : Farmacodinâmica I. T. II. Serra, Cristina Helena dos Reis, orientador.

615.7f CDD

Marina de Freitas Silva

Determinação da bioequivalência do metronidazol a partir de
comprimidos revestidos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
orientador/presidente

Profa. Dra. Jacqueline de Souza
1º. examinador

Profa. Dra. Valentina Porta
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

**À Deus,
pelo dom da vida.**

**Aos meus pais, Vilma e César,
pelo eterno apoio e pelo amor incondicional.**

**À minha irmã, Maísa,
pela constante presença.**

**À minha vó, Áurea,
pelo carinho.**

**Às minhas afilhadas, Lara e Beatriz,
pela alegria contagiante.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra, pela oportunidade, pelo incentivo, pela dedicação e por sua compreensão em todos os momentos.

Às Profas. Valentina Porta e Vladi Olga Consiglieri, pela atenção, carinho e nobres conselhos.

À minha família, pela constante torcida.

Às minhas amigas de infância, Fabíola, Bárbara e Daiana, por estarem sempre presentes.

Aos amigos de Ribeirão Preto, Paula, Tharin, Maira, Marília, Bárbara, Renata, Roberta, Leticia, Priscila, Renata, Turma 75 e muitos outros, pelos momentos inesquecíveis.

Aos funcionários do Biofar, Eunice Kano, Eunice Emiko, Simone, Eremita, Valdilene, Tatiana e Ting, pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho.

Aos pós-graduandos, Eduardo, Yara, Francinalva, Karin, André, Samanta, pela amizade e incentivo.

Aos voluntários que participaram da etapa clínica deste estudo.

Às técnicas do laboratório de farmacotécnica, Claudinéia e Carla, pela amizade e disponibilidade em todos os momentos.

Aos secretários, Bete, Jorge, Elaine e Marjô, pela competência profissional e prestatividade.

Às bibliotecárias, Leila e Marina, pela revisão das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

À FUNED e ao CNPq, pelo suporte financeiro, que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, tornaram possível a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xx
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1. BIOEQUIVALÊNCIA E BIODISPONIBILIDADE	7
3.1.1. HISTÓRICO	8
3.1.2. CONCEITOS.....	9
3.1.2.1. BIODISPONIBILIDADE	9
3.1.2.2. BIODISPONIBILIDADE RELATIVA	10
3.1.2.3. BIODISPONIBILIDADE ABSOLUTA	10
3.1.2.4. BIOEQUIVALÊNCIA	10
3.2. ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA/BIODISPONIBILIDADE RELATIVA	11
3.2.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO <i>IN VIVO</i>	13

3.2.2. CRONOGRAMA DE COLETAS.....	14
3.2.3. VOLUNTÁRIOS	15
3.2.4. ETAPA ANALÍTICA.....	16
3.2.4.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO	16
3.2.5. ETAPA ESTATÍSTICA	17
3.2.6. APLICAÇÃO DOS ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA E BIODISPONIBILIDADE RELATIVA	19
3.3. ASPECTOS REGULATÓRIOS	21
3.3.1. PRODUTO FARMACÊUTICO INTERCAMBIÁVEL	23
3.3.2. EQUIVALENTE TERAPÊUTICO	23
3.3.3. EQUIVALENTE FARMACÊUTICO	24
3.3.4. ALTERNATIVA FARMACÊUTICA	24
3.3.5. MEDICAMENTO REFERÊNCIA	25
3.3.6. MEDICAMENTO INOVADOR.....	26
3.3.7. MEDICAMENTO GENÉRICO	26
3.3.8. MEDICAMENTO SIMILAR.....	27
3.4. METRONIDAZOL.....	28
3.4.1. MECANISMO DE AÇÃO.....	29
3.4.2. FARMACOCINÉTICA	30
3.4.2.1. ABSORÇÃO	30
3.4.2.2. DISTRIBUIÇÃO	31
3.4.2.3. METABOLISMO E ELIMINAÇÃO	31
3.4.3. INDICAÇÕES E USOS	32

3.4.4. CONTRA INDICAÇÕES.....	33
3.4.5. DOSES E ADMINISTRAÇÃO	33
3.4.6. EFEITOS ADVERSOS.....	34
3.4.7. INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS.....	35
3.4.8. ASPECTOS ANALÍTICOS	35
3.4.8.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-MS) APLICADA ÀOS ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA	37
3.4.8.1.1. INSTRUMENTAL	38
3.4.8.1.2. APLICAÇÕES EM MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	40
3.5. ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA ENVOLVENDO O METRONIDAZOL.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1. MATERIAL	43
4.1.1. AMOSTRAS.....	43
4.1.2. SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA	43
4.1.3. SOLVENTES, REAGENTES E MATERIAL	44
4.1.4. EQUIPAMENTOS	45
4.2. MÉTODO	46
4.2.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL EM PLASMA HUMANO	46
4.2.2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO.....	46
4.2.2.1. METRONIDAZOL	46
4.2.2.2. ZIDOVUDINA.....	47

4.2.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	47
4.2.4. PREPARO DE AMOSTRAS DE PLASMA DE CONTROLE DE QUALIDADE.....	48
4.2.5. PURIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE PLASMA PARA QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL	50
4.2.6. CONDIÇÕES PARA A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	50
4.2.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL EM PLASMA HUMANO.....	51
4.2.7.1. ESPECIFICIDADE.....	52
4.2.7.2. LINEARIDADE.....	52
4.2.7.3. LIMITE DE DETECÇÃO	53
4.2.7.4. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	54
4.2.7.5. RECUPERAÇÃO.....	54
4.2.7.6. PRECISÃO.....	55
4.2.7.7. EXATIDÃO	55
4.2.7.8. ESTABILIDADE.....	56
4.2.7.8.1. ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO.....	56
4.2.7.8.2. ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO	57
4.2.7.8.3. ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO	57
4.2.7.8.4. ESTABILIDADE DE CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO.....	57
4.2.7.8.5. ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO	58
4.2.7.9. VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE DILUIÇÃO.....	58

4.2.8. QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL NAS AMOSTRAS DE PLASMA ..	59
4.3. ETAPA CLÍNICA DO ENSAIO DE BIOEQUIVALÊNCIA	59
4.3.1. CASUÍSTICA	60
4.3.2. PROCEDIMENTO DO ENSAIO DE BIOEQUIVALÊNCIA	63
4.3.3. ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS	65
4.3.4. PERÍODO DE JEJUM E ALIMENTAÇÃO	65
4.3.5. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	65
4.3.6. TRANSPORTE DAS AMOSTRAS	66
4.3.7. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	66
4.4. AVALIAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS PRODUTOS	66
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
5.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL EM PLASMA HUMANO	71
5.1.1. ESPECIFICIDADE	71
5.1.2. LINEARIDADE	73
5.1.3. LIMITE DE DETECÇÃO	74
5.1.4. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	74
5.1.5. RECUPERAÇÃO	75
5.1.6. PRECISÃO	76
5.1.7. EXATIDÃO	76
5.1.8. ESTABILIDADE	77

5.1.8.1. ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO	77
5.1.8.2. ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO.....	78
5.1.8.3. ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES-PADRÃO	79
5.1.8.4. ESTABILIDADE DE CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO	80
5.1.8.5. ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO	82
5.1.9. VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE DILUIÇÃO	84
5.2. ETAPA CLÍNICA DE BIOEQUIVALÊNCIA.....	88
5.3. AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS MEDICAMENTOS TESTE E REFERÊNCIA	88
5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	98
6. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
8. ANEXOS	124
ANEXO A	125
ANEXO B	129
ANEXO C	135
ANEXO D	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Obtenção das amostras plasma de metronidazol para a curva de calibração	48
Tabela 2	Obtenção de amostras de plasma de controle de qualidade de metronidazol	49
Tabela 3	Parâmetros relacionadas à detecção por espectrometria de massas	51
Tabela 4	Características dos voluntários incluídos no ensaio de bioequivalência dos comprimidos contendo 250 mg de metronidazol	62
Tabela 5	Desenho amostral para ensaio de bioequivalência de comprimidos contendo 250 mg de metronidazol, seguindo delineamento cruzado 2 X 2	64
Tabela 6	Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação de metronidazol em plasma por Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas na faixa de concentração de 0,05 e 8,00 µg/mL	74
Tabela 7	Recuperação média do procedimento de purificação das amostras de plasma para metronidazol (padrão) e para zidovudina (padrão interno)	76
Tabela 8	Precisão e exatidão intra-dia e inter-dias referentes ao método analítico para quantificação de metronidazol em amostras de plasma por CLAE com detecção por espectrometria de massas	77
Tabela 9	Resultados referentes ao estudo de estabilidade do metronidazol em amostras analisadas após manutenção a temperatura ambiente por 4 horas	78
Tabela 10	Resultados referentes ao estudo de estabilidade do metronidazol em amostras de plasma de controle de qualidade, analisadas logo após o preparo e mantidas a -20°C por 46 dias	79
Tabela 11	Resultados referentes ao estudo de estabilidade do metronidazol em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas a temperatura de -20°C e submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento	81
Tabela 12	Resultados referente a estudo de estabilidade do metronidazol em amostras de plasma analisadas 24 e 48 horas após o procedimento de purificação	83
Tabela 13	Resultados referente ao processo de validação da diluição	85

Tabela 14	Concentrações plasmáticas médias do metronidazol após a administração oral dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl [®] , lote 702824) aos 22 voluntários sadios	90
Tabela 15	Parâmetros farmacocinéticos referentes à absorção do metronidazol após a administração oral do produto teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) aos 22 voluntários sadios	93
Tabela 16	Parâmetros farmacocinéticos referentes à absorção do metronidazol após a administração oral do produto referência (Flagyl [®] , lote 702824) aos 22 voluntários sadios	94
Tabela 17	Parâmetros farmacocinéticos referentes à eliminação do metronidazol após a administração oral do produto teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) aos 22 voluntários sadios	96
Tabela 18	Parâmetros farmacocinéticos referentes à eliminação do metronidazol após a administração oral do produto referência (Flagyl [®] , lote 702824) aos 22 voluntários sadios	97
Tabela 19	Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação de efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos após a administração oral do produto teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl [®] , lote 702824) aos 22 voluntários sadios	99
Tabela 20	Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro C_{max} , transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl [®] , lote 702824) aos 22 voluntários sadios	100
Tabela 21	Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro ASC_{0-t} , transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl [®] , lote 702824) aos 22 voluntários sadios	101
Tabela 22	Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro $ASC_{0-\infty}$, transformado em escala logarítmica, obtido após administração	

dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) aos 22 voluntários sadios 102

Tabela 23 Intervalos de confiança 90% (IC 90%), razões entre as médias e valores do poder estatístico para as relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) aos 22 voluntários sadios 105

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 Tipos de avaliações de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência e suas respectivas aplicações	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do metronidazol	29
Figura 2	Representação esquemática dos componentes de um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo	39
Figura 3	Cromatogramas obtidos por CLAE-MS/MS referente à: (A) plasma branco adicionado de padrão interno – zidovudina e (B) Controle de Qualidade Médio – plasma de voluntário sadio adicionado de padrões – metronidazol e zidovudina	72
Figura 4	Curva de calibração do método analítico para quantificação de metronidazol em plasma por CLAE – MS/MS na faixa de concentração de 0,05 a 8,00 µg/mL	73
Figura 5	Curvas médias de decaimento plasmático após a administração oral dos produtos Teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e Referência (Flagyl®, lote 702824) aos 22 voluntários sadios	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA = Análise de variância

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC = Área sob a curva “concentração plasmática *versus* tempo”

ASC_{0-t} = Área sob a curva “concentração plasmática *versus* tempo” do tempo zero ao tempo t

$ASC_{0-\infty}$ = Área sob a curva “concentração plasmática *versus* tempo” do tempo zero extrapolada ao infinito

BPFC = Boas práticas de fabricação e controle de qualidade

CEP = Comitê de ética em pesquisa

CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência

CI = Clearance

cm = centímetros

Conc. = Concentração

Conc. det. = Concentração determinada

Conc. nom. = Concentração nominal

CQA = Controle de qualidade alta

CQB = Controle de qualidade baixo

CQM = Controle de qualidade médio

C_t = Última concentração determinada experimentalmente

CV = coeficiente de variação

DCB = Denominação comum Brasileira

DCI = Denominação comum internacional

DP = Desvio-padrão

DPI = Desvio do peso ideal

EMA = European Medicines Agency

FDA = Food and Drug Administration

FUNED = Fundação Ezequiel Dias

g = Gramas

h = Horas

H = Altura

HIV = Síndrome da imunodeficiência adquirida

IC 90% = Intervalo de confiança 90%

K_a = Constante de absorção

K_{el} = Constante de eliminação

Kg = Quilogramas

L = Litro

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

M = Molar

mM = milimolar

mg = miligramas

μ g = microgramas

min = minutos

mL = mililitros

μ L = microlitros

MSMS = detector de espectrometria de massas

p = Intervalo de confiança

P = Padrão

PDA = Detector de arranjo fotodiodo

PI = Peso ideal

R = Medicamento referência

REBLAS = Rede Brasileira de laboratórios analíticos de saúde - ANVISA

rpm = Rotações por minuto

SCB = Sistema de classificação biofarmacêutica

t = Tempo

T = Medicamento teste

$t_{(1/2)el}$ = Meia-vida eliminação

t_{max} = Tempo correspondente à concentração plasmática máxima

TCLE = Termo de consentimento livre e esclarecido

UV = Ultravioleta

v = Volume

Vd = Volume de distribuição

RESUMO

O metronidazol é usado no tratamento de infecções causadas por protozoários e naquelas causadas por microrganismos anaeróbicos, no tratamento das formas intestinais e extra-intestinais de amebíase, em tricomoníase e em infecções bacterianas aeróbicas graves. Após administração oral, a absorção é rápida e completa sendo amplamente distribuído, atinge concentração plasmática máxima em 1-2 horas. A meia-vida de eliminação do metronidazol é de 6-12 horas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a equivalência terapêutica por meio da bioequivalência entre duas formulações de comprimidos revestidos contendo metronidazol, produzidos por dois fabricantes distintos, permitindo assim a intercambiabilidade entre as formulações.

O ensaio de bioequivalência entre o produto teste (FUNED metronidazol) e o produto referência (Flagyl® - Aventis Pharma Ltda.) foi do tipo randomizado, cruzado e aberto. O medicamento foi administrado em dose única de 250 mg de metronidazol aos 24 voluntários sadios. Amostras de sangue foram coletadas até 48 horas após a administração e analisadas por método, desenvolvido e validado, de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE – MS/MS).

As curvas de decaimento plasmático obtidas para o produto teste (FUNED metronidazol) e para o produto referência (Flagyl® - Aventis Pharma Ltda.) foram semelhantes, assim como os parâmetros farmacocinéticos C_{max} (teste: 6,66 µg/mL; referência: 6,77 µg/mL), t_{max} (teste: 1,26 h; referência: 1,90 h), ASC_{0-t} (teste: 73,42 µgxh/mL; referência: 73,56 µgxh/mL), $ASC_{0-\infty}$ (teste: 75,15 µgxh/mL; referência: 75,23 µgxh/mL) e $t_{1/2el}$ (teste: 8,00 h; referência: 7,76 h).

Os intervalos de confiança 90% para a razão de C_{max} (92,2 – 106,4 %), ASC_{0-t} (97,2 – 102,5 %) e $ASC_{0-\infty}$ (97,1 – 102,8 %) encontram-se entre 80 e 125 %, intervalo proposto pela ANVISA e FDA para a bioequivalência. A comparação estatística por meio de análise de variância (ANOVA) dos parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ indica claramente não haver diferença significativa entre os dois produtos contendo 250 mg de metronidazol. Baseado nos resultados farmacocinéticos e estatísticos, conclui-se que os dois produtos são bioequivalentes e, podem ser considerados intercambiáveis na terapêutica.

ABSTRACT

Metronidazole is used to treat infections caused by protozoa and those caused by anaerobic microorganisms. It is the drug of choice for the treatment of amebiasis in the intestinal and extra-intestinal forms, trichomoniasis and bacterial aerobic diseases. After oral administration, its absorption is rapid, complete and widely distributed, reaching maximum plasma concentration in 1 to 2 hours. The half-life of elimination of metronidazole is 6 to 12 hours. The objective of this study was to evaluate the therapeutic equivalence through bioavailability between two formulations of tablets containing metronidazole, produced by two different manufacturers, thus allowing the interchangeability between the formulations.

The bioequivalence assay between the test product (FUNED Metronidazole) and reference product (Flagyl® - Aventis Pharma Ltda.) was a randomized, crossover and open study. The drug was given at a 250 mg metronidazole single dose to 24 healthy volunteers. Blood samples were collected until 48 hours after administration and analyzed by method, developed and validated in high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC - MS / MS).

The plasma decay curves obtained for the product test (FUNED metronidazole) and the reference product (Flagyl® - Aventis Pharma Ltda.) were statistically similar in the same way as the pharmacokinetic parameters C_{max} (test: 6.66 µg/mL, reference: 6.77 µg/mL), t_{max} (test: 1.26 h; reference: 1.90 h), AUC_{0-t} (test: 73.42 µg·h/mL, reference: 73.56 µg·h/mL) $AUC_{0-\infty}$ (test: 75.15 µg·h/mL, reference: 75.23).

The 90% confidence intervals for the ratio of C_{max} (92.2 - 106.4%), AUC_{0-t} (97.2 - 102.5%) and $AUC_{0-\infty}$ (97.1 - 102.8%) are between 80 and 125%, range proposed by ANVISA and FDA for bioequivalence assays. This statistical parameters comparison using analysis of variance (ANOVA) C_{max} , AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ clearly indicate no significant difference between the two products containing 250 mg of metronidazole. Based on the pharmacokinetic and statistical results, it is possible to conclude that the two products are bioequivalent and could be considered interchangeable in therapy.

1.INTRODUÇÃO

O metronidazol é um derivado nitroimidazol sintético (Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008; Drug Information Handbook, 2005). É o fármaco de escolha para tratamento das formas intestinais e extra-intestinais da amebíase, tricomoníase e infecções bacterianas aeróbicas graves. Também é indicado para balantidíase, giardíase e vaginite causada *por Gardnerella vaginalis*. É ativo contra bactérias anaeróbicas dos gêneros Bacteroides, Clostridium, Fusobacterium, Peptococcus e Peptostreptococcus. Em infecções anaeróbicas graves, é utilizado no tratamento de abscesso cerebral, infecções intra-abdominais e pélvicas, osteomielite, artrite séptica e endocardite. É utilizado também para profilaxia de infecções pós-operatórias em pacientes que irão sofrer cirurgia colorretal eletiva classificada como contaminada ou potencialmente contaminada (Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008).

Após administração oral, a absorção de metronidazol é rápida e completa. É amplamente distribuído pelo organismo e liga-se fracamente às proteínas plasmáticas (menos de 20%), atingindo concentração plasmática máxima em 1 a 2 horas (Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008; Drug Information Handbook, 2005).

O volume de distribuição do metronidazol é de 0,8 L/kg e sua biotransformação, principalmente hepática, origina os metabólitos 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol, ácido 2-metil-5-nitroimidazol-1-ilacético e seus conjugados glicurônicos (Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008).

O metronidazol e seus metabólitos são excretados especialmente na urina (60 a 80% da dose administrada, sendo 20% na forma inalterada) e parte nas fezes (6 a 15%). A meia-vida de eliminação do metronidazol varia de 6 a 12 horas (Drug Information Handbook, 2005; Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008).

A dose oral recomendada de metronidazol para tratamento de amebíase em adultos é de 500 mg a 750 mg a cada 8 horas por 5 a 10 dias. Para tricomoníase, recomenda-se uma dose oral de 250 mg a cada 8 horas por 7 dias ou 375 mg duas vezes ao dia por 7 dias ou dose única de 2g (Drug Information Handbook, 2005).

Para garantir a intercambiabilidade entre medicamentos referência e candidatos à genéricos, bem como a eficácia clínica e segurança dos produtos similares, a legislação vigente no Brasil exige a realização de estudos de bioequivalência. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1996), os

medicamentos genéricos devem satisfazer os mesmos padrões de qualidade, eficácia e segurança que o produto original, ou inovador, além de serem clinicamente intercambiáveis com estes últimos.

Para algumas classes de produtos, inclusive formulações parenterais de compostos altamente solúveis em água, a intercambiabilidade 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 intercambiabilidade 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 (WHO, 1996).

A bioequivalência entre medicamentos pode ser avaliada pela comparação dos parâmetros farmacocinéticos relacionados à biodisponibilidade do fármaco a partir de produtos farmacêuticos distintos. Os estudos de bioequivalência permitem a comparação em relação à extensão da absorção do(s) princípio(s) ativo(s) e à velocidade com que esta absorção ocorre a partir da forma farmacêutica (ANVISA, 2003; Chow & Liu, 2000).

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). Neste sentido, os ensaios de bioequivalência tem como objetivo demonstrar que um produto apresenta, ou não, diferenças significativas em relação ao desempenho biológico quando comparado a outro previamente aprovado (Ritschel, 1992).

Os produtos submetidos ao estudo foram o Flagyl® 250 mg comprimido revestido produzido por Aventis Pharma (formulação referência) e o FUNED Metronidazol 250 mg comprimido revestido produzido por Fundação Ezequiel Dias – FUNED (formulação teste).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral no presente trabalho foi avaliar a equivalência terapêutica por meio da bioequivalência entre duas formulações de comprimidos revestidos contendo metronidazol, produzidos por dois fabricantes distintos, confirmando assim a intercambiabilidade entre as formulações.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver, validar e otimizar um método analítico preciso e exato para quantificação de metronidazol em plasma humano por meio de CLAE-MS/MS;
- ✓ Determinar os parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção e eliminação do fármaco após a administração de comprimidos revestidos de metronidazol (250 mg) a 24 voluntários sadios;
- ✓ Realizar os cálculos matemáticos comparando as razões e os valores de IC 90% entre os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ para os produtos analisados;
- ✓ Realizar tratamento estatístico e avaliar a confiabilidade do experimento.

3.REVISÃO DA LITERATURA

3.1. BIOEQUIVALÊNCIA E BIODISPONIBILIDADE

A ação terapêutica de um fármaco depende da existência de uma concentração efetiva no local de ação durante certo período de tempo. A quantificação da concentração plasmática é uma medida indireta preditiva, uma vez que a concentração da corrente sanguínea entra em equilíbrio com o local de ação. Desta forma, a biodisponibilidade de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica assume um papel crítico na eficácia clínica, sendo imprescindível a caracterização da formulação adequadamente (INFARMED, 2009).

A absorção é um pré-requisito para a atividade terapêutica de fármacos de ação sistêmica quando administrados por via extravascular. Muitas vezes considerada sinônimo de absorção ou como propriedade das formas farmacêuticas relacionadas à efetividade dos fármacos, a biodisponibilidade tem sido associada às referências de qualidade de medicamentos. Segundo o FDA, o conceito de biodisponibilidade é definido pela quantidade e velocidade de absorção do fármaco, a partir de um produto farmacêutico e que se encontra disponível no sítio de ação (Lachman *et al.*, 1986).

Os estudos de biodisponibilidade, por meio da determinação da concentração sanguínea de fármaco em função do tempo, avaliam a linearidade farmacocinética, determinam o coeficiente de variação do fármaco intra e interindividual, investigam as diversas variáveis envolvidas na administração do fármaco (por exemplo, administração concomitante de fármacos, efeito da alimentação, estado do paciente, entre outros) e comparam medicamentos (por exemplo, medicamento teste e referência em um teste de bioequivalência) (Welling, 1991).

A bioequivalência estima a biodisponibilidade relativa entre dois produtos, focando na comparação do desempenho biofarmacotécnico destes produtos, velocidade e extensão de absorção do fármaco. Normalmente, nos estudos de bioequivalência, um produto teste é comparado a um produto referência, por meio de critérios específicos de avaliação com limites pré-definidos (Pearce *et al.*; 2004; Chen *et al.*; 2001).

Esses estudos visam acima de tudo garantir eficácia e segurança ao paciente por meio da intercambiabilidade entre medicamentos genérico e referência, uma vez que os medicamentos genéricos são considerados cópias e não trazem nenhuma inovação em sua formulação (Storpiertis *et al.*, 2008).

3.1.1.HISTÓRICO

O termo biodisponibilidade surgiu na literatura científica no início da década de 70, com a publicação de relatos de diferenças entre as curvas de decaimento plasmático provenientes da administração de diferentes formulações de digoxina (Porta, 1999). Entretanto, desde 1912, utilizam-se conceitos de absorção após a administração de composto exógeno apresentados em algumas publicações (Bueno, 2005).

Por volta de 1980, surgiram questões envolvendo a quantificação de metabólitos e a importância de seu papel na determinação da bioequivalência, considerando a importância na biodisponibilidade (Jackson *et al.*, 2004; Rhodes, 1999). A razão deste dilema é que, algumas vezes, o fármaco atinge níveis aceitáveis dentro do intervalo de confiança 90% e o metabólito não e vice-versa. Atualmente, criou-se o consenso de que para maioria dos medicamentos, a quantificação apenas da molécula principal já é suficiente, uma vez que esta é mais sensível a diferenças de formulações do que a determinação do metabólito (Jackson *et al.*, 2004).

Os principais fatores que desencadearam inúmeros estudos de bioequivalência foram os elevados custos envolvidos na triagem clínica completa de novos medicamentos e o surgimento de cópias de medicamentos inovadores, além do desenvolvimento da tecnologia bioanalítica, especialmente a cromatografia de alta eficiência, que melhoraram a especificidade, a sensibilidade e a precisão na determinação de fármacos juntamente com seus produtos de biotransformação presentes em quantidades reduzidas nos líquidos biológicos (Consiglieri & Storpiertis, 2000; Marzo & Monti, 1998).

Os ensaios clínicos seguem princípios éticos e científicos de experimentação e são responsáveis pelas bases da avaliação de eficácia e segurança de fármacos ou medicamentos. Na atualidade, a farmacologia clínica desenvolve principalmente duas atividades: estudos farmacocinéticos e elaboração, execução e análise de ensaios clínicos para avaliar a segurança, qualidade e a eficácia dos medicamentos em seres humanos (Brioschi, 2006; Brasil, 1996).

A confiabilidade dos resultados dos estudos de bioequivalência está na dependência do planejamento adequado e execução correta do protocolo dos estudos clínicos, analíticos e estatísticos. Os estudos clínicos devem ser elaborados com bastante clareza e segurança, seguindo os parâmetros estabelecidos na Declaração de Helsinque e Resolução 196/96, que trata das diretrizes e normas de pesquisa clínica em seres humanos (Brioschi, 2006; Brasil, 1996).

3.1.2.CONCEITOS

3.1.2.1. BIODISPONIBILIDADE

Biodisponibilidade indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em forma de dosagem, a partir de sua curva de concentração/tempo na circulação sistêmica ou na excreção urinária (Brasil, 1999a).

Segundo o FDA (United States, 2004a), biodisponibilidade é a velocidade e a extensão pelas quais um fármaco é absorvido a partir de um produto farmacêutico e torna-se disponível no sítio de ação.

O EMEA (European Medicine Agency, 2002) define como sendo a velocidade e a extensão pelas quais a substância ativa ou metabólito ativo é absorvido a partir da forma farmacêutica e torna-se disponível no sítio de ação. Entretanto, como a maioria das substâncias é indicada para ação sistêmica, e considerando-se que a substância que está na circulação sistêmica estará em continua troca com a

substância presente no local de ação, a biodisponibilidade pode ser definida como a extensão e a velocidade pelas quais a substância ativa é liberada da forma farmacêutica para a circulação sistêmica.

Apesar das três definições relacionarem velocidade e extensão de absorção, apenas a legislação brasileira sugere formas de obtenção destas medidas, por meio de curvas de concentração *versus* tempo, a partir de concentração plasmática ou excreção urinária (Kano, 2008).

3.1.2.2. BIODISPONIBILIDADE RELATIVA

Segundo a ANVISA, biodisponibilidade relativa é o quociente da quantidade e velocidade de princípio ativo que chega à circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um produto de referência e de um produto considerado similar ao referência que contenham o mesmo princípio ativo (Brasil, 2007b).

3.1.2.3. BIODISPONIBILIDADE ABSOLUTA

Segundo Shargel e Yu (1999), a biodisponibilidade absoluta é a fração da dose administrada que é efetivamente absorvida pelo organismo. Pode ser determinada calculando-se a área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo, tendo-se como referência uma injeção intravenosa, pois neste caso, a biodisponibilidade é de 100%.

3.1.2.4. BIOEQUIVALÊNCIA

Bioequivalência consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre os produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo composição qualitativa e quantitativa idênticas de princípio(s) ativo(s), e que tenham biodisponibilidade comparável, quando estudados em um mesmo desenho experimental (Brasil, 1999a).

Segundo FDA (United States, 2004a), bioequivalência entre dois medicamentos é caracterizada pela ausência de diferenças significativas na velocidade e na extensão pela qual o fármaco ou metabólito ativo, presentes em equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas, torna-se disponível no sítio de ação, quando administrados na mesma dose molar, e sob as condições similares, em um teste com um desenho apropriado.

De acordo com o guia sobre a investigação de bioequivalência publicado pelo EMEA em 2008, dois medicamentos são considerados bioequivalentes se as biodisponibilidades (velocidade e extensão da absorção) após a administração da mesma dose molar estiverem dentro de limites aceitáveis pré-definidos para intervalo de confiança 90% que são de 80 a 125%. Estes limites são estabelecidos para garantir eficácia e segurança comparáveis no desempenho *in vivo* (European Medicine Agency, 2008).

3.2. ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA/BIODISPONIBILIDADE RELATIVA

Bioequivalência entre dois produtos é avaliada normalmente por estudos com o seguinte delineamento: dose única, dois períodos de eliminação (*wash out*) apropriado de no mínimo sete meias vidas do fármaco, dois tratamentos, duas seqüências, aberto, randomizado, cruzado comparando doses iguais dos medicamentos teste e referência em voluntários adultos de ambos os sexos, saudáveis e em jejum noturno e por 4 horas após a administração do fármaco (Shargel & Yu, 1999).

O ensaio de bioequivalência envolve medidas de comparação de biodisponibilidade de medicamento genérico e medicamento referência (Benet, 1999), deve ser necessariamente precedido de um ensaio de equivalência farmacêutica e a comparação entre os perfis de dissolução também é necessária e recomendável (Storpiertis *et al.*, 2004).

O estudo é realizado por meio de quantificação do fármaco e/ou metabólito ativo na circulação (sangue, plasma ou soro) ou através de quantificação na urina, quando justificado. Alternativamente, o estudo poderá ser realizado comparando as medidas farmacodinâmicas (Brasil, 2006b) e se justificam apenas em dois tipos de situações: modificações de uma formulação já existente no mercado ou versões genéricas e similares de formulações referência.

Em geral, os resultados são avaliados por um órgão oficial que estabelece os padrões de proximidade entre os perfis de biodisponibilidade. Cada padrão estabelecido é constituído de um ou mais critérios de aceitação para cada medida de biodisponibilidade considerada necessária na avaliação, como por exemplo, C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ (Consiglieri, 1996).

Antes da realização dos estudos *in vivo* (bioequivalência) existem as exigências da realização dos testes que compreendem a equivalência farmacêutica fundamentada em:

- ✓ Questões éticas: devem-se obter comprovações da qualidade dos medicamentos antes de submeter voluntários sadios a ensaios de bioequivalência;
- ✓ A constatação de que o teste de bioequivalência será realizado em medicamentos que não apresentem diferenças superiores a 5% de teor e tenham preferencialmente sido fabricados até 6 meses antes do teste, aliado a validação do processo de fabricação e as Boas Práticas de Fabricação e Controle de Qualidade (BPFC);
- ✓ Em casos onde o método para determinar equivalência farmacêutica não esteja descrito em compêndios oficiais, o fabricante do genérico deve desenvolver tais métodos e este deve ser validado por laboratórios de

equivalência com certificação REBLAS (Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos de Saúde – ANVISA);

- ✓ No caso de medicamentos isentos de estudos de bioequivalência, a equivalência farmacêutica é o principal requisito que sustenta a intercambiabilidade (Storpiertis *et al.*, 2004).

3.2.1.DELINEAMENTO DO ESTUDO *IN VIVO*

O estudo convencional é do tipo aberto, aleatório, cruzado. Os voluntários recebem os medicamentos teste e referência em fases distintas, em esquema de dose simples ou múltipla, se necessário. Podendo ainda ser realizado em paralelo, quando se fizer necessário, como, por exemplo, em estudos que envolvam fármacos com meia vida de eliminação muito longa (Brasil, 2006b; Brasil, 2003b; Rolim, 2001).

As vantagens de se utilizar este tipo de estudo são:

- ✓ Cada indivíduo serve como seu próprio controle, o que permite uma comparação do indivíduo com ele mesmo, para as diferentes formulações;
- ✓ Minimizar a variabilidade intraindividual na comparação das formulações, o que torna o teste de diferenças de tratamento mais poderoso;
- ✓ Com uma aleatorização apropriada de indivíduos para a seqüência de administração das formulações, o planejamento produz as melhores estimativas não viciadas para a diferença (razão) entre as formulações (Brasil, 2003b).

O volume de líquido, normalmente a água, utilizado na administração do produto farmacêutico é padronizado, geralmente utiliza-se 200 mL (Brasil, 2006b).

A ANVISA recomenda estudos de dose única, que são mais sensíveis as diferenças entre as formulações. No entanto, estudos de dose múltipla são aceitos em casos que sejam reconhecidamente necessários para reduzir a variabilidade intraindividual no processo de absorção do fármaco (Brasil, 2006b).

Estudos de bioequivalência incluindo a alimentação devem ser realizados nos seguintes casos:

- ✓ Formas farmacêuticas de liberação prolongada ou controlada (estudo deve ser realizado adicionalmente com o estudo em jejum);
- ✓ Formas farmacêuticas orais de liberação prolongada, com revestimento gastrorresistente;
- ✓ Formas farmacêuticas orais de liberação imediata, cujos fármacos tenham a absorção influenciada pela presença de alimentos, resultando em alterações clinicamente significativas e na indicação da administração do medicamento com alimentos (Brasil, 2006b).

3.2.2. CRONOGRAMA DE COLETAS

O cronograma de coletas deve caracterizar o perfil plasmático do fármaco ou do metabólito adequadamente (concentração *versus* tempo) contemplando um tempo de 3 a 5 meias-vidas de eliminação ou um tempo superior (Brasil, 2006b) e para ser representativo, este cronograma deve representar o t_{max} , independente do número de amostras, como demonstrado por Kano (2008), onde cronogramas de coletas com 9 amostras foram semelhantes aos cronogramas contendo 22 amostras, desde que estes cronogramas caracterizassem o t_{max} , ou seja, desde que o cronograma de coletas contemple o t_{max} . O período de eliminação (*wash out*), intervalo entre uma fase e outra, deve ser de no mínimo sete meias-vidas de eliminação (Brasil, 2006b).

Fármacos com meia-vida de eliminação superior a 24 horas podem ter cronograma de coleta alternativo, que possibilite determinar a área sob a curva truncada em 72 horas (ASC_{0-72}) ou pode-se realizar o estudo em paralelo, onde cada voluntário participa do estudo tomando apenas uma das formulações, neste caso o cronograma de coletas pode ser superior a 72 horas para melhor caracterização da eliminação do fármaco na curva de decaimento plasmático (Brasil, 2006b).

3.2.3.VOLUNTÁRIOS

O número de voluntários deverá sempre assegurar poder estatístico suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de bioequivalência. O número de voluntários pode ser calculado com base no coeficiente de variação dos resultados relativos aos parâmetros farmacocinéticos obtidos para o fármaco e no poder do teste, não sendo permitido número de voluntários inferior a 12. E na falta de dados relativo ao coeficiente de variação do fármaco, o pesquisador pode optar por utilizar o número mínimo de 24 voluntários. O protocolo deve prever ainda possíveis exclusões (*dropouts*) (Brasil, 2006b).

A seleção de voluntários para estudos de bioequivalência tem como objetivo minimizar a variabilidade e permitir a detecção de diferenças entre os produtos farmacêuticos (Romeu, 2002).

Os voluntários do sexo masculino, feminino ou de ambos os sexos devem ter idade superior a 18 anos e estarem aptos a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Quando forem selecionados voluntários de ambos os sexos, a seleção deve ser feita de forma que o número de voluntários do sexo masculino seja igual ao número de voluntários do sexo feminino, e que esteja distribuído aleatoriamente pelas sequências do estudo. Em casos em que o medicamento é de uso de uma população específica, como por exemplo, de um determinado sexo e/ou faixa etária, o estudo deve ser conduzido com voluntários que atendam estes critérios (Brasil, 2006b).

Os voluntários devem ser saudáveis, e estarem dentro do peso normal, sendo aceitos desvios de $\pm 15\%$, levando-se em consideração altura e estrutura física. A ANVISA recomenda que sejam evitados voluntários com histórico de abuso de álcool e fumantes, e no caso de serem incluídos indivíduos fumantes, deve-se identificá-los (Brasil, 2006b). Os critérios de inclusão devem ser suficientes para selecionar este tipo de voluntário (Storpiertis *et al.*, 2004).

3.2.4. ETAPA ANALÍTICA

A etapa analítica é aquela onde o fármaco é quantificado e, portanto, não pode haver dúvidas sobre os resultados obtidos. Durante o planejamento da etapa analítica, deve-se estabelecer o analito a ser quantificado (fármaco inalterado, metabólito ou pró-fármaco), a matriz biológica a ser utilizada (soro, plasma, sangue total ou urina) e o método analítico adequado (Storpiotis *et al.*, 2004). As amostras biológicas são retiradas antes da administração do fármaco e após em intervalos apropriados com a finalidade de obter um perfil adequado da concentração do fármaco *versus* tempo (Shargel & Yu, 1999).

O método analítico deve ser específico para cada analito, preciso, exato e relativamente simples, de modo a minimizar erros. A metodologia deve ser previamente validada e os parâmetros de validação devem estar estabelecidos (Brasil, 2003a) e devem garantir que um determinado método analítico seja confiável e reprodutível quando utilizado para quantificar determinado analito em uma matriz biológica (Briscoe *et al.*, 2007).

3.2.4.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

O método bioanalítico deve estar validado de acordo com a RE 899/2003 e descrito em procedimento operacional padrão (POP) (Brasil, 2006b; Brasil, 2003a), e tem por finalidade dar suporte ao estudo, permitindo assim uma interpretação confiável dos dados que serão obtidos (Shah, 2007).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a qualidade dos dados e a confiabilidade dos resultados (Shah, 2007; Brasil, 2003a). Deste modo, determinam-se os seguintes parâmetros:

- ✓ Precisão;
- ✓ Exatidão;
- ✓ Linearidade;
- ✓ Limite de detecção (LD);
- ✓ Limite de quantificação (LQ);
- ✓ Reprodutibilidade;
- ✓ Estabilidade:
 - curta duração;
 - longa duração;
 - soluções padrão;
 - ciclos de congelamento e descongelamento;
 - pós-processamento;
- ✓ Recuperação (Brasil, 2003a).

São aceitos desvios de 15% para todos os pontos da curva de calibração e os controles de qualidade (CQ) nas concentrações determinadas (baixa, média e alta); exceto para o LQ, para o qual são aceitos desvios de até 20%. Os controles de qualidade são utilizados para a avaliação de uma corrida (Brasil, 2003a). Já para o parâmetro de recuperação, são desejáveis valores próximos a 100%, mas são permitidos valores menores desde que os resultados obtidos sejam precisos e exatos, ou seja, desvios inferiores a 15% (Shah, 2007; Brasil, 2003a).

3.2.5. ETAPA ESTATÍSTICA

A etapa estatística inicia-se com o planejamento do estudo e o cálculo do número adequado de voluntários, considerando a variabilidade do fármaco, as possíveis desistências ou a exclusão de voluntários, caso ocorram. O planejamento inclui a elaboração da lista de randomização e o tratamento estatístico a que os dados serão submetidos (Shargel & Yu, 1999).

Os parâmetros farmacocinéticos serão obtidos a partir das curvas de concentração sanguínea do fármaco *versus* tempo, e analisados estatisticamente para determinação da bioequivalência (Brasil, 2006b).

São calculados a partir dos seguintes parâmetros farmacocinéticos:

- ✓ ASC_{0-t} (área sob a curva de 0 a t), obtido através do gráfico de concentração plasmática *versus* tempo;
- ✓ $ASC_{0-\infty}$ (área sob a curva de 0 a infinito), obtido por extrapolação utilizando a constante de eliminação (K_{el}), este parâmetro deve ser igual ou superior a 80% ASC_{0-t} , exceto em casos em que é feito ASC truncada;
- ✓ C_{max} e t_{max} , referentes ao pico de concentração máxima, estes parâmetros são obtidos diretamente sem interpolação dos dados;
- ✓ $t_{1/2el}$ (meia vida de eliminação), porém não há necessidade de tratamento estatístico para este parâmetro (Brasil, 2006b).

Deve-se justificar a exclusão de voluntários que apresentam dados discrepantes, até o limite de 5% do número de voluntários (Brasil, 2006b). Os produtos são considerados bioequivalentes quando os valores de IC 90% (Intervalo de confiança de 90%) estão entre 80 e 125% (Brasil, 2006b; Benet, 1999).

Para o intervalo de confiança, temos que se a regra de $\pm 20\%$ é adotada para medidas farmacocinéticas sem transformação, o nível de significância é usualmente escolhido como 5% ($\alpha=0,05$) e o coeficiente de 90% de confiança é utilizado para $\mu_T - \mu_R$. Para medida farmacocinética com transformação logarítmica, usando a regra 80/125, o nível de significância a ser escolhido também é usualmente de 5%, resultando um intervalo de 90% de confiança para $\mu_T - \mu_R$. Assim, o intervalo de confiança $100(1-2\alpha)\%$, (L_1 , U_1) para $\mu_R - \mu_T$ significa que se o estudo for repetido por exemplo, B vezes, então $100(1-2\alpha)\%$ vezes, B intervalos aleatórios irão cobrir $\mu_T - \mu_R$, isto é, irá conter $\mu_T - \mu_R$. Ou em termos de probabilidades, $Pr(\mu_R - \mu_T \in (L_1, U_1)) = 1-2\alpha$. Desta maneira, o intervalo de confiança 90% representa que se o teste de bioequivalência for repetido n vezes, os resultados estarão dentro do intervalo estipulado em 90 % das vezes (ANVISA, 2003).

Durante a etapa estatística, realiza-se a análise multivariada, utilizando a análise de variância (ANOVA), que tem como objetivo estudar a variabilidade nos

dados observados particionando a soma de quadrados total das observações em componentes dos efeitos fixos e dos erros aleatórios (ANVISA, 2003).

Na ANOVA, são avaliados efeitos de seqüência e voluntário, efeito de formulação, efeito de período e efeito residual. Os efeitos de seqüência e de voluntário medem a diferença entre os grupos de voluntários definidos naquela seqüência. O efeito de formulação é o que realmente é determinado no estudo de bioequivalência. O efeito de período mede as diferenças entre os dois períodos e o efeito residual mede se existe diferença entre os efeitos residuais das formulações (Bueno, 2005; Jackson, 1999). Por exemplo, para o delineamento *crossover* padrão 2x2, devemos particionar a soma de quadrados total das $2(n_1+n_2)$ observações em componentes dos efeitos residuais, do efeito de período, do efeito de fármaco e do erro (ANVISA, 2003).

Para reduzir a possibilidade de falhas em detectar pequenas diferenças entre os produtos avaliados, o poder do teste estatístico é determinado para calcular a probabilidade da conclusão da análise ser válida e deve ser maior do que 80%. O poder do teste dependerá do tamanho da amostra, variabilidade dos resultados e nível desejado de significância (Brasil, 2003b).

3.2.6.APLICAÇÃO DOS ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA E BIODISPONIBILIDADE RELATIVA

Várias são as finalidades para a utilização de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, alguns tipos de avaliações estão apresentados no Quadro 1 (Bueno, 2005).

Quadro 1 Tipos de avaliações de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência e suas respectivas aplicações e situações em que estes estudos são realizados

Tipos de avaliações	Aplicações
Bioequivalência de medicamentos	Estes estudos são necessários por ocasião do registro de medicamentos genéricos e similares, excetuando casos de bioisenções e ensaios <i>in vitro</i> que substituem estes estudos descritos na RE 897 de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2007a; Brasil, 2007b; Brasil, 2003d)
Medicamentos que contêm princípios ativos novos na terapêutica	Utiliza estudos de biodisponibilidade para definir os parâmetros farmacocinéticos que até então são desconhecidos (Bueno, 2005)
Novas formulações contendo fármacos já conhecidos	Utiliza estes estudos para comparar a biodisponibilidade das formulações e determinar os parâmetros farmacocinéticos da nova formulação (Bueno, 2005)
Formas farmacêuticas de liberação modificada	Utiliza estes estudos para comparar a biodisponibilidade das formulações e determinar os parâmetros farmacocinéticos da formulação com liberação modificada (Bueno, 2005)
Medicamentos contendo vários fármacos	Novos medicamentos contendo vários fármacos já utilizados em separado na prática clínica devem passar por estes estudos, a fim de comparar as biodisponibilidades com as formulações referências
Alterações de formulação de um medicamento	Para efeitos de alterações pós-registro, alterações que impactam mais sobre a formulação podem necessitar novos testes de biodisponibilidade e bioequivalência ou novas formulações contendo concentrações superiores as já registradas (Brasil, 2003e)

Alterações de posologia/esquema terapêutico	Utilizam-se estes estudos para determinar os parâmetros farmacocinéticos no novo esquema terapêutico.
---	---

3.3. ASPECTOS REGULATÓRIOS

A indústria farmacêutica iniciou o programa de genéricos na década de 60 nos Estados Unidos que tinha o objetivo de provar eficácia e segurança por meio de ensaios de bioequivalência (Dias, 2003; Serra, 1998), porém foi apenas em 1984 que os norte-americanos estabeleceram critérios que viriam a ser adotados mundialmente. O principal objetivo do governo norte-americano era buscar alternativas legais de reduzir os custos dos tratamentos de saúde e ampliar o acesso da população. Este objetivo foi atingido, uma vez que os medicamentos genéricos não precisam arcar com despesas de pesquisa e desenvolvimento farmacotécnico e marketing (Pró-genéricos, 2009).

No Brasil, a implantação do programa de genéricos teve início com a promulgação da lei nº 9.787 em 10 de fevereiro de 1999. A legislação brasileira baseou-se em legislações mais avançadas provenientes dos Estados Unidos (FDA – Food and drug administration) e do Canadá (Health Canada) (Pró-genéricos, 2009; Brasil, 1999a) e determina os seguintes itens que posteriormente foram regulamentados pela Resolução 391/1999 e revogada pela RDC 10/2001 (Brasil, 2001; Brasil, 1999b):

1. Os critérios e condições para o registro e o controle de qualidade dos medicamentos genéricos;
2. Os critérios para as provas de biodisponibilidade de produtos farmacêuticos em geral;

3. Os critérios para a aferição da equivalência terapêutica, mediante as provas de bioequivalência de medicamentos genéricos, para a caracterização de sua intercambiabilidade;
4. Os critérios para a dispensação de medicamentos genéricos nos serviços farmacêuticos governamentais e privados, respeitada a decisão expressa de não intercambiabilidade do profissional prescritor (Brasil, 2001; Brasil, 1999a; Brasil, 1999b).

A intercambiabilidade dos genéricos foi primeiramente definida pela ANVISA na Resolução 391, de 9 de agosto de 1999, que posteriormente foi revogada pela Resolução RDC 10, de 02 de janeiro de 2001, republicada como a Resolução RDC 135, de 29 de maio de 2003 e novamente revogada pela Resolução RDC 16, de 02 de março de 2007, onde estão descritos os requisitos e critérios técnicos para registro de genéricos, incluindo os procedimentos referentes à intercambiabilidade (Pró-genéricos, 2009; Brasil, 2007a; Brasil, 2003c; Brasil, 2001; Brasil, 1999b).

Conforme determina a legislação no Brasil, os genéricos podem chegar ao consumidor depois de passarem por uma das três situações a seguir:

1. Testes de bioequivalência que são realizados em seres humanos, e garantem que os genéricos apresentam a mesma extensão e velocidade de absorção dos fármacos correspondentes aos medicamentos de referência;
2. Equivalência farmacêutica, garantindo que a composição do produto teste é semelhante ao do medicamento de referência ou preenchendo requisitos de bioensaios por correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV)
3. Pelos requisitos proposto pelo sistema de classificação biofarmacêutica proposto por Amidon e colaboradores em 1995 (Pró-genéricos, 2009; Amidon *et al.*, 1995).

Existe um esforço da comunidade científica, técnica e das agências regulatórias na tentativa de complementar e harmonizar os conceitos relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência. Outros conceitos também são inseridos tais como equivalentes farmacêuticos, equivalentes terapêuticos e alternativas farmacêuticas; estes conceitos apresentam pequenas diferenças entre as definições apresentadas pelas agências regulatórias (Kano, 2008).

A seguir estão descritas as principais definições dadas por algumas agências regulatórias.

3.3.1.PRODUTO FARMACÊUTICO INTERCAMBIÁVEL

Considera-se como um produto farmacêutico intercambiável aquele que apresenta equivalência terapêutica a um medicamento referência, comprovados, essencialmente, os mesmos efeitos de eficácia e segurança (Brasil, 1999a).

3.3.2.EQUIVALENTE TERAPÊUTICO

De acordo com a ANVISA, equivalentes terapêuticos são quando dois medicamentos são considerados equivalentes farmacêuticos e, após a administração na mesma dose molar, seus efeitos em relação à eficácia e segurança são essencialmente os mesmos, o que é avaliado por meio de estudos de bioequivalência apropriados, ensaios farmacodinâmicos, ensaios clínicos ou estudos *in vitro* (Brasil, 2007a).

De acordo com a definição apresentada pelo FDA (United States, 2004a), equivalentes terapêuticos são apenas os produtos farmacêuticos que são equivalentes farmacêuticos e, seus efeitos em relação à eficácia e segurança forem os mesmos, quando administrados aos pacientes conforme descrito nas bulas.

O EMEA (European Medicine Agency, 2002) define equivalentes terapêuticos como produtos farmacêuticos que contêm a mesma substância ativa ou metabólito ativo, e que clinicamente, apresentem a mesma eficácia e segurança.

3.3.3.EQUIVALENTE FARMACÊUTICO

É definido como sendo medicamento que contém o(s) mesmo(s) fármaco(s), isto é o mesmo sal ou éster da molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos, quando comparado com o medicamento referência. Deve cumprir com as mesmas especificações 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).

Segundo o FDA (United States, 2004a), equivalentes farmacêuticos são definidos como sendo medicamentos que contenham o(s) mesmo(s) fármaco(s), isto é o mesmo sal ou éster da molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos. Devem cumprir com as mesmas especificações farmacopéicas 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.

O EMEA (European Medicine Agency, 2002) define equivalentes farmacêuticos como sendo produtos farmacêuticos que contém as mesmas quantidades de fármacos na mesma forma farmacêutica e que cumprem requisitos de qualidade iguais ou comparáveis.

3.3.4.ALTERNATIVA FARMACÊUTICA

São produtos farmacêuticos contendo a mesma molécula terapeuticamente ativa, porém de diferentes sais, ésteres ou complexos. Os medicamentos podem ser

substituídos quando apresentam o mesmo ativo ou o mesmo sal ou éster (Shargel & Yu, 1999).

A ANVISA (2007b) define alternativas farmacêuticas como sendo medicamentos que contém a mesma molécula terapeuticamente ativa, ou seu precursor, mas não necessariamente na mesma quantidade, forma farmacêutica, sal ou éster. Deve cumprir, individualmente, com as 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.

O FDA (United states, 2004a) define alternativas farmacêuticas como sendo medicamentos que contém a mesma molécula terapeuticamente ativa, ou seu precursor, mas não necessariamente na mesma quantidade, forma farmacêutica, sal ou éster. Devem cumprir, individualmente, com as especificações farmacopéicas 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.

Segundo o EMEA (European Medicine Agency, 2002), alternativas farmacêuticas são produtos farmacêuticos que contém o mesmo fármaco, mas diferem em relação à forma química, à forma farmacêutica ou ao teor.

3.3.5.MEDICAMENTO REFERÊNCIA

Medicamento referência é definido como sendo o medicamento inovador registrado junto ao órgão federal responsável pela vigilância federal e comercializado no país, cuja eficácia, segurança e qualidade, foram comprovados cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro (Brasil, 1999a).

O medicamento referência é, geralmente, o medicamento inovador cuja biodisponibilidade foi determinada durante o desenvolvimento do produto e que teve sua eficácia e segurança comprovadas por meio de ensaios clínicos, antes da obtenção do registro para comercialização. Neste caso, a empresa fabricante desenvolveu a formulação e a forma farmacêutica adequadas à via de administração e ao objetivo terapêutico do medicamento, estabelecendo e validando os processos de fabricação, bem como as especificações que deverão ser reproduzidas posteriormente, lote a lote (Storpiotis *et al.*, 2004).

3.3.6.MEDICAMENTO INOVADOR

Medicamento inovador é definido pela RDC nº 16/2007 como sendo o medicamento comercializado no mercado nacional composto por, pelo menos um fármaco ativo, sendo que esse fármaco deve ter sido objeto de patente, mesmo já extinta, por parte da empresa responsável por seu desenvolvimento e introdução no mercado do país de origem, ou o primeiro medicamento a descrever um novo mecanismo de ação, ou aquele definido pela ANVISA que tenha comprovado eficácia, segurança e qualidade (Brasil, 2007a).

3.3.7.MEDICAMENTO GENÉRICO

De acordo com a lei nº 9.787/1999, medicamento genérico é definido como sendo um medicamento similar ao medicamento referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após expiração ou renúncia patentária ou de direitos de exclusividade, comprovada sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela DCB (denominação comum brasileira) ou, na sua ausência, pela DCI (denominação comum internacional) (Brasil, 1999a).

A intercambiabilidade entre medicamentos genéricos e o seu respectivo medicamento referência, baseia-se no conceito de equivalência terapêutica entre os mesmos, geralmente assegurada pela comprovação de equivalência farmacêutica, bioequivalência e pelas boas práticas de fabricação e controle de qualidade (BPFC), uma vez que os medicamentos apresentarão a mesma eficácia clínica e o mesmo potencial para gerar efeitos adversos (Storpiertis *et al.*, 2004).

Para o medicamento genérico, o fabricante deve investir no desenvolvimento farmacotécnico do produto, para que este cumpra com as mesmas especificações *in vitro* que o medicamento referência. Entretanto reconhece-se que processos de fabricação diferentes, equipamentos distintos e matérias-primas de fornecedores diferentes, possam gerar diferenças terapêuticas. Em decorrência disto, medicamentos genéricos são aprovados por órgãos regulatórios mediante a apresentação de resultados de estudos de bioequivalência que comprovam a intercambiabilidade e tenham rigorosos critérios de aprovação, tratados estatisticamente e que não sejam significativamente diferentes ou mediante aos estudos de intercambiabilidade para incluir os genéricos isentos de bioequivalência, como por exemplo, através de estudos de CIVIV ou para formulações de menores dosagens, quando a formulação de maior dosagem já passou por ensaios de bioequivalência e atingiu os critérios de aceitação (Motola & Ponti, 2006; Storpiertis *et al.*, 2004).

Em geral, os medicamentos genéricos apresentam custos menores do que os medicamentos referência, isto porque os medicamentos inovadores surgem graças ao investimento de milhões de dólares na descoberta de novas moléculas com atividade terapêutica e o investimento agressivo em marketing (Dias, 2003).

3.3.8.MEDICAMENTO SIMILAR

É definido como sendo um medicamento que contém o(s) mesmo(s) princípio(s) ativo(s), apresenta a mesma concentração, mesma forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, preventiva ou diagnóstica,

do medicamento referência registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em relação às características de forma e tamanho do produto, prazo de validade, rotulagem, excipientes e veículos, devendo ser identificado por nome comercial ou marca (Brasil, 1999a).

No Brasil, para que um novo produto adquira o status de similar, e também para a renovação de registro dos produtos já comercializados, são necessários a realização de estudos que demonstrem a equivalência terapêutica dos mesmos em relação a um produto de referência (Koono, 2005).

3.4. METRONIDAZOL

Metronidazol (Figura 1), 1-(2 hidroximetil)-2-metil-5-nitroimidazol, é um fármaco derivado sintético do 5-nitroimidazol que apresenta atividade antimicrobiana e é usado no tratamento de infecções por bactérias anaeróbicas e protozoários (Moda *et al.*, 2008; Wibawa *et al.*, 2001; Menelaou *et al.*, 1999). O fármaco apresenta alta solubilidade em água e é solúvel em álcool (WHO, 2006; Drug Information Handbook, 2005), além de ser altamente permeável (WHO, 2006). O princípio ativo apresenta estabilidade à temperatura ambiente e às condições normais do ar, mas escurece quando exposto de forma prolongada à luz (Drug Information Handbook, 2005).

Figura 1 Estrutura química do metronidazol

Em 2009, diferentes produtos contendo metronidazol encontravam-se disponíveis no mercado brasileiro. O medicamento referência (Flagyl®) foi encontrado na forma de comprimidos revestidos de uso oral nas dosagens de 250 e 400 mg; neste mesmo período, existiam 15 produtos registrados como medicamentos genéricos e cinco formulações como medicamentos similares na dosagem de 250 mg; e na dosagem de 400 mg, existiam três formulações genéricas (Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008).

Neste mesmo período, também foram encontrados produtos de uso tópico contendo metronidazol isolado e em associação com nistatina, para os quais o medicamento referência é Flagyl®. Para as formas farmacêuticas contendo metronidazol isolado existiam cinco formulações genéricas e uma similar e para as formulações contendo metronidazol em associação foram encontrados dois genéricos (Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008).

3.4.1.MECANISMO DE AÇÃO

O metronidazol é um pró-fármaco que necessita de ativação pela redução do grupo nitro por organismos suscetíveis. A toxicidade seletiva contra patógenos anaeróbicos e microaerófilos como os protozoários sem mitocôndrias, *T. vaginalis*, *E. histolytica* e *G. lamblia* e várias bactérias anaeróbicas deriva de seu metabolismo energético diferente daquele das células aeróbicas (Goodman & Gilman, 2001).

O grupo nitro reduzido se comporta como aceptor de elétrons para proteínas transportadoras de elétrons. As formas reduzidas produzem lesões bioquímicas às bactérias e protozoários, tais como a perda da estrutura helicoidal do DNA, ruptura do cordão e conseqüentemente inibição da síntese de ácido nucléico, o que leva à morte da célula dos protozoários e bactérias (Drug Information Handbook, 2005; Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008; Lamp *et al.*, 1999).

3.4.2.FARMACOCINÉTICA

3.4.2.1. ABSORÇÃO

O metronidazol é rápida e completamente absorvido após a ingestão oral, alcançando concentrações na faixa de 8 a 13 µg/mL no plasma em 15 minutos a 4 horas após uma dose única de 500 mg. As concentrações máximas são alcançadas entre 1 a 2 horas, sendo que as concentrações eficazes médias do composto variam de 0,1 a 8 µg/mL para a maior parte dos protozoários e bactérias suscetíveis (AHFS Drug Information, 2005; Goodman & Gilman, 2001; Lamp *et al.*, 1999).

A presença de alimentos não modifica a quantidade de metronidazol absorvido, mas pode diminuir a concentração plasmática máxima (C_{max}) e retardar o tempo para obter o C_{max} deste fármaco (AHFS Drug Information, 2005).

3.4.2.2. DISTRIBUIÇÃO

O volume de distribuição é aproximadamente igual ao volume de água corporal total, equivalendo a aproximadamente 0,8 L/kg. O fármaco aparece predominantemente no plasma, sendo que menos de 20% encontra-se ligado às proteínas plasmáticas, e apenas uma pequena porcentagem aparece como o metabólito 2-hidroxi metil (United States, 2004b; Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008).

O metronidazol apresenta boa penetração nos tecidos e distribuição nos líquidos corporais, incluindo as secreções vaginais, líquido seminal, saliva, leite materno, fluido cefalorraquidiano e sistema nervoso central, excetuando a placenta (Drug Information Handbook, 2005; Goodman & Gilman, 2001; Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008; Lamp *et al.*, 1999).

3.4.2.3. METABOLISMO E ELIMINAÇÃO

O metronidazol é intensivamente metabolizado pelas enzimas hepáticas microssomais do citocromo P 450 dependente do sistema monooxigenase para formar dois principais metabólitos ativos (Hoffmann *et al.*, 1995).

O hidróxi metabólito, 1-(2-hidróxi etil)-2-hidróxi metil-5-nitroimidazol, apresenta atividade antimicrobiana clinicamente significativa de aproximadamente 30 a 65% da atividade do metronidazol. O metabólito ácido, 1-ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol, tem apenas 5% da atividade do metronidazol e é detectado apenas em pacientes com disfunções renais. Os conjugados glucurônicos e sulfatos e os produtos de oxidação dos hidróxi metabólitos também são detectados (Lamp *et al.*, 1999).

A meia vida de eliminação do metronidazol está entre 6 e 12 horas e a do hidróxi metabólito está entre 6 e 18 horas, sendo portanto mais longa do que a do fármaco (Hoffmann *et al.*, 1995).

Após uma dose oral, mais de 75% do metronidazol marcado com carbono 14 (^{14}C) são eliminados na urina, em grande parte como metabólitos; apenas cerca de 10% são recuperados como fármaco inalterado (Goodman & Gilman, 2001; Lamp *et al.*, 1999).

3.4.3.INDICAÇÕES E USOS

Este fármaco é usado no tratamento de infecções causadas por protozoários e infecções causadas por microrganismos anaeróbicos (Goodman & Gilman, 2001; Menelaou *et al.*, 1999; Galmier *et al.*, 1998).

O metronidazol é o fármaco utilizado no tratamento de formas intestinais e extra-intestinais da amebíase, tricomoníase e infecções bacterianas aeróbicas graves. Também é indicado para balantidíase, giardíase e vaginite causada por *Gardnerella vaginalis* (Latha *et al.*, 2009; Lettsch *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2009) e vaginites causadas por diferentes bactérias (Latha *et al.*, 2009; Friedicks *et al.*, 2009). Apresenta atividade contra bactérias anaeróbicas dos gêneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus* e *Peptostreptococcus*. Em infecções anaeróbicas graves, é utilizado no tratamento de abscesso cerebral, infecções intra-abdominais e pélvicas, osteomielite, artrite séptica e endocardite. É usado também para profilaxia de infecções pós-operatória em pacientes que irão sofrer cirurgia colorretal eletiva classificada como contaminada ou potencialmente contaminada (Dicionário Terapêutico Guanabara, 2008).

A combinação de metronidazol e espiramicina é comum e está fundamentada na atividade complementar e sinérgica destes compostos, que são indicados para o tratamento de infecções dentárias causadas por bactérias anaeróbicas (Sagan *et al.*, 2005).

Desde a descoberta de *Helicobacter pylori* em biopsias gástricas em 1982, e o reconhecimento de que esta bactéria está associada às principais desordens gástricas, metronidazol foi um dos primeiros fármacos a serem utilizados com

sucesso na erradicação de infecções por *H. pylori*, sendo o componente principal de terapias muti-fármacos (Kim *et al.*, 2009).

Assim, utiliza-se metronidazol concomitantemente com a amoxicilina em combinação com uma terapia supressora de ácido ou com sais de bismuto (Jain *et al.*, 2009; Rosandic *et al.*, 2002; Menelaou *et al.*, 1999). A associação de metronidazol, tetracilina e sais de bismuto também é reconhecidamente utilizada para o mesmo tratamento de infecções por *H. pylori* (Spénard *et al.*, 2005) ou com algum outro antibiótico substituindo a tetraciclina (Wibawa *et al.*, 2001) como por exemplo claritromicina (Ueki *et al.*, 2009).

Além das indicações citadas acima, encontra-se descrito na literatura por Kenawy e colaboradores (2009) que o metronidazol também apresenta atividade contra fungos. Este trabalho utilizou em seus experimentos kelpisic como organismos fúngicos.

3.4.4.CONTRA INDICAÇÕES

Metronidazol é contra indicado em casos de hipersensibilidade previamente conhecida ao ativo ou a algum dos excipientes utilizados; ou em pacientes com tricomoniase, durante o primeiro trimestre de gestação; podendo portanto ser administrado no início da gestação em outras doenças sob orientação médica (United States, 2004b).

3.4.5.DOSES E ADMINISTRAÇÃO

O metronidazol cura as infecções genitais causadas por *T. vaginalis* em mulheres e homens em mais de 90% dos casos. O esquema de tratamento mais usado é de 2 g de metronidazol como dose oral única. Para pacientes que não

toleram dose única de 2 g, existe um esquema alternativo de doses de 250 mg de metronidazol administradas três vezes ao dia ou doses de 375 mg, duas vezes ao dia durante sete dias (Goodman & Gilman, 2001).

A dose recomendada em tratamentos amebecidas é de 500 a 750 mg de metronidazol administrado por via oral, três vezes ao dia, durante 10 dias. A dose diária para crianças é de 35-50 mg/kg fracionadas em 3 doses durante 10 dias (Goodman & Gilman, 2001).

Um esquema típico de tratamento intravenoso para infecções anaeróbicas graves é uma dose de ataque de 15 mg/kg seguida 6 h mais tarde pela dose de manutenção de 7,5 mg/kg a cada 6 h, durante 1 a 10 dias. Juntamente com outros antibióticos, o metronidazol mostrou-se eficaz para a profilaxia de infecções bacterianas pós-cirúrgicas mistas (Goodman & Gilman, 2001).

No combate a infecções por *Helicobacter pylori*, recomenda-se a administração de 400 mg de metronidazol associado a 1 g de amoxicilina de 12 em 12 horas (Rosandic *et al.*, 2002) ou 500 mg de metronidazol, 500 mg de amoxicilina e 500 mg de claritromicina por 14 dias (Fischbach *et al.*, 2009).

3.4.6.EFEITOS ADVERSOS

Os efeitos colaterais raramente apresentam gravidade que leve a interrupção do tratamento (Goodman & Gilman, 2001), sendo que os principais efeitos adversos relatados na literatura incluem efeitos gastrintestinais tais como náusea, anorexia, vômito, diarreia, desconforto abdominal, boca seca e gosto metálico (DiPiro *et al.*, 2005; Goodman & Gilman, 2001).

Cabe ressaltar também os efeitos neurotóxicos como cefaléia, tontura, vertigem e, muito raramente, encefalopatia, convulsões, incordenação e ataxia, que justificam a interrupção do tratamento com metronidazol, assim como nos casos de insensibilidade ou parestesia das extremidades. Urticária, rubor e prurido são

indicadores de sensibilidade ao fármaco que necessitam de interrupção do medicamento (Goodman & Gilman, 2001).

3.4.7.INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

Tem sido reportado um aumento do efeito anticoagulante da warfarina com o uso concomitante ao metronidazol. A administração simultânea com fármacos que induzem as enzimas microssomais do fígado pode aumentar a meia vida de eliminação do metronidazol, como tem sido relatado no uso em conjunto com a fenitoína (United States, 2004b).

A administração simultânea de fármacos que diminuem a atividade de enzimas microssomais hepáticas, como no caso da cimetidina, pode prolongar a meia-vida e diminuir o clearance do metronidazol. O uso de metronidazol por um período curto de tempo tem sido associado à elevação dos níveis séricos de lítio e aparecimento de sinais de toxicidade em pacientes estabilizados com doses relativamente elevadas deste fármaco (United States, 2004b).

As bebidas alcoólicas não devem ser consumidas durante a terapia com metronidazol e por pelo menos um dia depois de cessado seu uso, porque podem ocorrer cólicas abdominais, náuseas, vômitos, dores de cabeça, rubor. Reações psicóticas têm sido relatadas em pacientes que estão utilizando metronidazol e álcool concomitantemente (United States, 2004b).

3.4.8.ASPECTOS ANALÍTICOS

Métodos analíticos com emprego de Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV (CLAE – UV) têm sido descritos na literatura em estudos de biodisponibilidade e comparação dos parâmetros farmacocinéticos com metronidazol

envolvendo voluntários sadios (Spénard *et al.*, 2005; Sprandel *et al.*, 2004; Idkaidek *et al.*, 2000; Galmier *et al.*, 1998; Yeung *et al.*, 1998; Hoffmann *et al.*, 1995; Jessa *et al.*, 1995).

As técnicas cromatográficas descritas apresentam algumas desvantagens para a sua aplicação nos estudos bioequivalência como múltiplos passos e procedimentos para extração do metronidazol das amostras biológicas, com extensas corridas cromatográficas (Galmier *et al.*, 1998), e procedimentos de extração fase sólida que são trabalhosos e caros para a preparação de amostras (Yeung *et al.*, 1998) ou precipitação de proteínas (Menelaou *et al.*, 1999; Pollak, 1996).

Outros métodos descrevem extração líquido-líquido com grandes volumes de solvente (Sagan *et al.*, 2005; Nascimento, *et al.*, 2005; Midha, *et al.*, 1973; Idkaidek *et al.*, 2000; Fraselle *et al.*, 2007) ou dupla extração líquido-líquido, resultando em um grande consumo de solventes (Hoffmann *et al.*, 1995) e maior tempo despendido para realização das análises, que é uma questão importante em estudos de bioequivalência considerando o grande número de amostras que devem ser analisadas neste tipo de ensaio (Armando *et al.*, 2009; Porta *et al.*, 2008). O método proposto por Wibawa e colaboradores (2001) utiliza pequenos volumes de amostra de plasma e solvente, mas tem um extenso tempo de corrida (8 minutos).

A quantificação de metronidazol é feita principalmente por meio da utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção ultravioleta (UV) normalmente com comprimentos de onda (λ) fixado entre 313-318 nm (Hoffmann *et al.*, 1995; Pollak, 1996; Wibawa *et al.*, 2001; Yeung *et al.*, 1998; Galmier *et al.*, 1998; Jessa *et al.*, 1996; Spénard *et al.*, 2005; Han *et al.*, 1997) ou detector de arranjo de fotodiodo (PDA) com comprimentos de onda (λ) fixado entre 313-315 nm (Nascimento, *et al.*, 2005; Menelaou *et al.*, 1999).

Apenas um trabalho publicado por Sagan e colaboradores (2005) apresenta um método que utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa (MS / MS).

3.5. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-MS) APLICADA ÀOS ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

Os métodos bioanalíticos devem ter precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise. Assim, a validação destes métodos visa garantir, por meio de estudos experimentais, que os mesmos atendam às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados (Brasil, 2003a).

Os métodos bioanalíticos podem ser desenvolvidos utilizando diferentes técnicas, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e estas combinadas com espectrometria de massa (MS) tais como CLAE-MS, CLAE-MS/MS, CG-MS, CG-MS/MS, e utilizados na determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma ou urina. Também se aplicam outras técnicas analíticas, tais como métodos microbiológicos e imunológicos, ou para outras matrizes biológicas, embora, nestes casos, pode-se observar um alto grau de variabilidade (Brasil, 2003a).

Amostras biológicas oferecem grande complexidade para a separação e análise de substâncias específicas em função da presença de inúmeros interferentes. Diante disto, o desenvolvimento de técnicas cromatográficas com alto poder de resolução e com os objetivos de aumentar o número de amostras analisadas e reduzir os efeitos interferentes da matriz biológica, tem sido o grande desafio para os cientistas (Pól & Hyötyläinen, 2008).

Novas fases estacionárias com maior eficiência de separação foram implantadas em cromatografia líquida. Adicionalmente, a resolução de sistemas analíticos pode ser aumentada com a adição de outro mecanismo de separação que

são obtidos com o uso de detectores mais seletivos, tais como espectrômetro de massas (Pól & Hyötyläinen, 2008).

A seletividade, sensibilidade e adequabilidade para compostos com uma ampla gama de massas e polaridades são os principais atrativos da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas (CLAE-MS). Essas vantagens justificam o uso, cada vez mais freqüente, da técnica em métodos bioanalíticos (Díaz-Cruz & Barceló, 2007; Petrovic & Barceló, 2007; Saint-Marcoux *et al.*, 2007).

3.5.1. INSTRUMENTAL

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica baseada na determinação da massa atômica ou molecular de uma espécie individual numa amostra. Na espectrometria de massas, moléculas gasosas são ionizadas, aceleradas por um campo elétrico para um analisador, numa região de alto vácuo, e então separadas de acordo com sua relação massa/carga. A grande quantidade de energia que normalmente é fornecida à molécula para que ocorra a ionização, faz com que esta fragmente, resultando em espectros de massas característicos de cada substância. O espectro de massas corresponde a abundância relativa dos íons em função da razão massa/carga (razão m/z) (Andrey, 2003).

O método de espectrometria de massas tradicional, com o emprego do quadrupolo, é uma técnica mais amena e, portanto produz poucos fragmentos e gera íons quasimoleculares estáveis, $[M+H]^+$ ou $[M+H]^-$, pelo ganho ou perda de prótons, e o nível de fragmentação dependerá da afinidade da molécula por prótons. Entretanto, a técnica pode fornecer uma análise confiável devido à co-fragmentação das moléculas da matriz além das moléculas-alvo. Porém esta técnica apresenta algumas limitações na identificação de compostos. Em contrapartida, o espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo possibilita distinguir compostos com a mesma massa molecular, desde que estes sejam isóbaros, que são elementos químicos com mesmo número de massa e diferentes números atômicos,

por diferentes fragmentos obtidos após uma colisão induzida com gás inerte (Díaz-Cruz & Barceló, 2007; Harris, 1998).

O triplo quadrupolo é o espectrômetro de massas mais utilizado. A montagem do equipamento é linear e contém três quadrupolos como mostrado na Figura 2. Apenas a primeira e a terceira são quadrupolos analisadores de massa. O segundo quadrupolo (central) tem uma tensão fixa. Assim, todos os íons de massa podem passar neste quadrupolo, que é utilizado como uma célula de colisão incidindo com as propriedades dos íons (de Hoffman, 1996).

Figura 2 Representação esquemática dos componentes de um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo

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). Assim, a unidade resultante da medida determinante pelo espectrômetro m/z de um íon, sendo a massa (m) em Daltons (Da) sobre a carga fundamental (z). Lembrando que 1.0 Da é igual a 1/12 de um átomo do isótopo de carbono 12 (^{12}C), que são elementos químicos com o mesmo número atômico e diferentes número de massas (Sampaio, 2007).

3.5.2. APLICAÇÕES EM MÉTODOS BIOANALÍTICOS

O uso da técnica de espectrometria de massas no monitoramento terapêutico de fármacos é cada vez mais frequente, como por exemplo, na determinação de imunossupressores, antifúngicos, antirretrovirais, antidepressivos e antipsicóticos (Saint-Marcoux *et al.*, 2007) e em estudos bioanalíticos: bioequivalência e farmacocinética (Xu *et al.*, 2007).

O sucesso da união da cromatografia líquida (CLAE) e espectrometria de massas (MS), que inicialmente acreditava-se que eram técnicas incompatíveis, tem sido amplamente realizada em análise de amostras biológicas. E observando a ampla utilização desta técnica, conclui-se que a CLAE-MS é uma ferramenta extremamente poderosa. Destacam-se o emprego desta técnica para o monitoramento em fluidos biológicos de substâncias de origem vegetal, extensivamente investigados e de uso clínico promissor, tais como, flavonóides naturais, alcalóides, saponinas e sesquiterpenóides (Xing *et al.*, 2007).

3.6. ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA ENVOLVENDO O METRONIDAZOL

Estudos de biodisponibilidade foram descritos por Mattila e colaboradores (1983) que compararam os parâmetros farmacocinéticos do metronidazol e do tinidazol após administração dos fármacos por diferentes vias em 22 voluntários sadios. Mustofa e Santoso (1991) publicaram um trabalho sobre farmacocinética com quantificação do fármaco em saliva.

Spénard e colaboradores (2005) apresentaram um trabalho sobre os efeitos da alimentação e da formulação na biodisponibilidade relativa de metronidazol, biscalitrato de bismuto e tetraciclina administrados no tratamento de erradicação de *Helicobacter pylori*, em 23 voluntários.

A bioequivalência entre comprimidos revestidos de administração oral e a biodisponibilidade de comprimidos vaginais de metronidazol foram comparadas por Hoffmann e colaboradores (1995) em 15 voluntárias sadias. As Formulações teste e referência foram bioequivalentes após a administração oral e apresentaram concentrações mínimas efetivas para maioria das bactérias. Após a administração vaginal, o fármaco atinge a circulação sistêmica e, portanto pode ser adequadamente quantificado, obtendo concentrações mínimas efetiva para este fármaco.

A bioequivalência entre duas formulações de metronidazol foi avaliada por Aboofazeli e Shafaati (2003) e Gatchev e colaboradores (2006). As formulações obtiveram resultados de IC 90% dentro da faixa de 80 a 125% para os parâmetros de C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ conforme proposto pelas principais agências regulatórias, portanto as formulações foram consideradas bioequivalentes (Gatchev *et al.*, 2006; Aboofazeli & Shafaati, 2003).

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1.AMOSTRAS

Foram avaliadas duas formulações contendo metronidazol:

- ✓ **Produto designado Referência (R):** Flagyl® comprimido revestido contendo metronidazol 250 mg, produzido por Aventis Pharma Ltda;

Lote analisado: 702824

Data de Validade: 01/2010

- ✓ **Produto designado Teste (T):** FUNED Metronidazol comprimido revestido contendo metronidazol 250 mg, produzido por Fundação Ezequiel Dias – FUNED;

Lote analisado: 07100833

Data de Validade: 10/2009

4.1.2.SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA

Todas as análises foram realizadas com padrão secundário de metronidazol lote 108/07, teor de pureza de 99,98 %, fornecido pela FUNED, com validade até 05/08/2011 e padrão secundário de zidovudina (padrão interno) lote AR 124/07, teor de pureza de 100,21 %, fornecido pela FUNED, com validade até 01/10/2008.

4.1.3.SOLVENTES, REAGENTES E MATERIAL

Foram utilizados os seguintes solventes, reagentes e materiais:

- ✓ Água ultrapura obtida em equipamento Millipore, modelo mili Q Academic;
- ✓ Acetonitrila grau cromatográfico J.T.Baker;
- ✓ Metanol grau cromatográfico J.T.Baker;
- ✓ Acetato de etila grau cromatográfico J.T.Baker;
- ✓ Ácido fórmico PA Merck;
- ✓ Acetato de Amônio PA Sigma;
- ✓ Plasma branco de voluntários;
- ✓ Nitrogênio White Martins;
- ✓ Gelo seco;
- ✓ Membranas filtrantes de acetato de celulose regenerado Sartorius de 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 μm ;
- ✓ Balões volumétricos Pyrex[®] de 25, 50 e 1000 mL;
- ✓ Provetas Pyrex[®] de 200 e 500 mL;
- ✓ Ponteiros descartáveis Brand[®];
- ✓ Tubos de ensaio com rolha esmerilhada de 10 mL;
- ✓ Tubos cônicos de 10 mL;
- ✓ Material médico: seringas descartáveis BD de 5 e 10 mL, agulhas descartáveis BD 25 x 7, 40 x 12, escalpe BD 21G, escalpe Safe-t-Intima[®] 20G, heparina sódica frasco-ampola 5000 UI Ariston, algodão hidrofílico não-estéril Cremer, soro fisiológico 0,9% de 250 mL, luvas descartáveis não-

estéreis Supermax[®], tubos para coleta de sangue Vacuteiner[®] de 10 mL contendo heparina;

- ✓ Coluna cromatográfica: Varian[®], modelo Microsorb[®] de C18 com 150 mm de comprimento e 4,5 mm de diâmetro, contendo partículas de 5 µm;
- ✓ Pré-coluna: Phenomenex[®], modelo AJO-4287 de C18 com 3 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro, contendo partículas de 5 µm.

4.1.4.EQUIPAMENTOS

Utilizaram-se os seguintes equipamentos:

- ✓ Balança analítica Toledo, modelo AB-204S;
- ✓ Banho ultrassônico Odontobrás, modelo 2840D;
- ✓ Banho termostático Fisaton, modelo 577;
- ✓ Centrifuga Heraeus, modelo Megafuge 2.0 D37520;
- ✓ Sistema de filtração à vácuo Phenomenex;
- ✓ Agitadores de tubo do tipo vórtex Phoenix, modelo AP 56;
- ✓ Pipetas automáticas de volume fixo de 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µL Brand Transferpette;
- ✓ Pipeta automática de volume variável de 10 a 100 µL e 100 a 1000 µL Eppendorf;
- ✓ Pipetador automático de 0,5 a 5 mL Brand Dispensette;
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, composto por uma bomba quaternária LC-10ADvp, degaseificador DGU-14^A, injetor automático de

amostras SIL-10ADvp, unidade de controle SCL-10ADvp, detector de massas triplo-quadrupolo de alta eficiência Micromass[®] Quattro LC; software MassLyn NT v 4.0 data system.

4.2. MÉTODO

4.2.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL EM PLASMA HUMANO

No presente trabalho, desenvolveu-se e validou-se um método preciso, exato, sensível e reprodutível para quantificação de metronidazol em plasma humano com emprego de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas, utilizando zidovudina como padrão interno. Esta metodologia está descrita a seguir.

4.2.2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

4.2.2.1. METRONIDAZOL

Foram preparadas duas soluções estoque em metanol nas concentrações de 500 e 5000 µg/mL. Estas soluções foram armazenadas em frasco âmbar em freezer a -20°C.

A partir das soluções estoque, prepararam-se as soluções padrões de trabalho diluídas em uma mistura de água e metanol na proporção de 90:10, v/v nas

seguintes concentrações: 0,5 µg/mL, 1,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 40,0 µg/mL, 60,0 µg/mL e 80,0 µg/mL. Estas soluções foram armazenadas em frasco âmbar e conservadas em geladeira a 4°C, sendo que a estabilidade das mesmas foi monitorada diariamente em corrida analítica.

4.2.2.2. ZIDOVUDINA

Preparou-se uma solução estoque de zidovudina (padrão interno) na concentração de 100 µg/mL em uma mistura de água e metanol na proporção de 90:10, v/v. Esta solução foi armazenada em geladeira a 4°C em frasco âmbar, e a estabilidade da mesma foi monitorada diariamente durante as corridas analíticas.

4.2.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para garantir a estabilidade das amostras de plasma da curva de calibração, estas foram preparadas diariamente a partir de soluções padrão de 0,5 µg/mL, 1,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 40,0 µg/mL, 60,0 µg/mL e 80,0 µg/mL de metronidazol em uma mistura de água e metanol na proporção de 90:10, v/v. Tomaram-se alíquotas 25 µL de solução padrão de metronidazol preparada em água e metanol na proporção de 90:10, v/v e 50 µL de solução-padrão de zidovudina a 100 µg/mL em uma mistura de água e metanol na proporção de 90:10, v/v. Adicionaram-se 225 µL de plasma branco e as amostras foram homogeneizadas em agitadores de tubos do tipo vórtex por 30 segundos. A Tabela 1 apresenta as diluições realizadas para a obtenção das amostras de plasma padrão para a curva de calibração.

Tabela 1 Obtenção das amostras de plasma de metronidazol para a curva de calibração

Concentração de solução padrão de metronidazol (µg/mL)	Alíquota (µL)	Volume de plasma branco (µL)	Concentração final de metronidazol (µg/mL)
0,5	25	225	0,05
1,5	25	225	0,15
5,0	25	225	0,50
10,0	25	225	1,00
20,0	25	225	2,00
40,0	25	225	4,00
60,0	25	225	6,00
80,0	25	225	8,00

4.2.4. PREPARO DE AMOSTRAS DE PLASMA DE CONTROLE DE QUALIDADE

Foram preparadas duas soluções estoque para o preparo das amostras de controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) em plasma. Para a solução de 500 µg/mL, pesou-se 25 mg de padrão de metronidazol em balão volumétrico de 50 mL e completou-se com metanol até atingir o volume. A solução de 10 µg/mL foi obtida através do seguinte processo de diluição, foi pipetado 1 mL

da solução estoque de 500 µg/mL e transferido para um balão 50 mL e completou-se o volume com metanol.

Para a preparação de amostras de controle de qualidade CQB, CQM e CQA em plasma, transferiram-se alíquotas de soluções estoque de metronidazol em metanol, nas concentrações de 10 µg/mL ou 500 µg/mL, conforme descrito na Tabela 2, para balões volumétricos de 25 mL e completou-se o volume com plasma branco. Este último foi adicionado e homogeneizado lentamente a fim de evitar que houvesse formação de espuma. Após atingir o volume final, as amostras de controle de qualidade foram agitadas vigorosamente, garantindo assim a homogeneidade das mesmas.

Após o preparo das amostras, estas foram alíquotadas em frascos criogênicos de polipropileno de 4 mL, devidamente identificados. Um conjunto de amostras recém-preparadas (amostra zero) foi analisado e as demais foram armazenadas no freezer a -20°C.

Tabela 2 Obtenção de amostras de plasma de controle de qualidade de metronidazol

Controle de Qualidade	Concentração da solução-padrão de metronidazol	Alíquota	Volume de plasma	Concentração final de metronidazol
CQB	10 µg/mL	375 µL	25 mL	0,15 µg/mL
CQM	500 µg/mL	175 µL	25 mL	3,50 µg/mL
CQA	500 µg/mL	350 µL	25 mL	7,00 µg/mL

4.2.5.PURIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE PLASMA PARA QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL

A purificação das amostras de plasma: branco, curva de calibração, controle de qualidade e voluntários que receberam medicamentos contendo metronidazol foram realizadas por meio de extração líquido-líquido com acetato de etila.

Adicionaram-se 250 µL de plasma a tubos de ensaio contendo 50 µL de zidovudina (padrão interno) na concentração de 100 µg/mL em uma mistura de água e metanol na proporção de 90:10, v/v, as amostras foram homogeneizadas por 10 segundos em agitadores de tubo do tipo vórtex. A extração do plasma foi feita por adição de 3,0 mL de acetato de etila, os tubos de ensaio foram fechados com o auxílio de rolhas esmerilhadas e homogeneizados por 60 segundos em agitadores de tubo do tipo vórtex em velocidade intermediária, para evitar perdas de amostras. Em seguida, os tubos passaram por centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm e a fase aquosa foi congelada utilizando gelo seco. Verteu-se a fase orgânica em tubos cônicos e a fase aquosa foi desprezada. Posteriormente, o solvente da fase orgânica foi evaporado sob corrente de nitrogênio em Banho-maria a 40 °C. O resíduo seco foi ressuspenso em 300 µL de fase móvel para ser injetado 50 µL no sistema cromatográfico.

4.2.6.CONDIÇÕES PARA A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura de tampão acetato de amônio 10 mM e acetonitrila na proporção de 80:20 v/v, contendo 0,1% de ácido fórmico. Filtrou-se a solução com membrana filtrante de 47 mm de diâmetro e poros de 0,22 µm, desgaseificando em banho ultrassônico por 10 minutos. A fase móvel foi eluída com fluxo de 1 mL/minuto, utilizando splitter.

Como fase estacionária empregou-se a coluna da marca Varian®, modelo Microsorb®, C18 com poros de 5 µm e 150 mm de comprimento e 4,5 mm de

diâmetro e pré-coluna da marca Phenomenex[®], modelo AJO-4247, C18 com poros de 5 µm e 3 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro.

O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massa com eletrospray-positivo. A aquisição foi realizada no modo de ionização múltipla (MRM), monitorando-se as transições de m/z 171,97>127,97 para o metronidazol e 268,08>126,96 para a zidovudina (padrão interno). Para a análise dos extratos reconstituídos, foram injetados 50 µL no sistema cromatográfico. Os principais parâmetros relacionados ao sistema de detecção por espectrometria de massas estão descritos resumidamente na Tabela 3.

Tabela 3 Parâmetros relacionadas à detecção por espectrometria de massas

Parâmetro	Valor
Temperatura de fonte (°C)	100
Temperatura de dessolvatação (°C)	300
Fluxo do gás de dessolvatação (L/h)	405
Voltagem do capilar (kv)	3,00
Voltagem do cone (v)	25
Energia de colisão (v)	15

4.2.7.VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL EM PLASMA HUMANO

A validação foi realizada seguindo as diretrizes da RDC 899/2003 da ANVISA (Brasil, 2003a), foram determinados os parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, estabilidade, recuperação, precisão, exatidão, estabilidade e exatidão e precisão do processo de diluição.

4.2.7.1. ESPECIFICIDADE

Os termos especificidade ou seletividade se referem à sua capacidade de resposta a um determinado composto de interesse associado a uma matriz com várias substâncias químicas detectáveis ou não. Como existem poucos métodos que respondem a um único analito, o termo seletividade é usualmente o mais empregado (Borges, 2006).

Esse parâmetro foi investigado pela análise de seis amostras de plasma diferentes, sendo que eram quatro amostras de plasma branco, uma amostra de plasma hemolisado e uma amostra de plasma lipêmico, em comparação com uma solução contendo o padrão em concentração próxima ao limite de quantificação e o padrão interno.

O plasma branco foi obtido de voluntários sadios após a centrifugação de sangue coletado em tubo contendo anticoagulante, neste caso heparina, e isento do fármaco e de padrão interno. O plasma lipêmico é obtido da mesma maneira após o voluntário receber uma refeição rica em gordura. E o plasma hemolisado é obtido quando o sangue é congelado e então centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm.

4.2.7.2. LINEARIDADE

Por linearidade, entende-se como sendo a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diferentes e diretamente

proporcionais à concentração do analito da amostra, dentro de um intervalo especificado (Brasil 2003a).

Para a construção da curva de calibração adicionou-se padrão de metronidazol às amostras de plasma branco de voluntários em oito concentrações diferentes (0,5 µg/mL, 1,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 40,0 µg/mL, 60,0 µg/mL e 80,0 µg/mL), em seis repetições. Na análise da curva de calibração ainda foram incluídas amostras de plasma branco e plasma branco adicionado de padrão interno. O intervalo da curva de calibração incluiu o limite de quantificação e os valores de 80% da concentração mais baixa e 120% da concentração mais alta do intervalo que se pretendiam analisar. As amostras utilizadas na curva de calibração cuja linearidade está na faixa de 0,05 a 8,0 µg/mL foram preparadas conforme descrito no item 4.2.3.

A correlação linear foi estabelecida entre o inverso da concentração, considerando variável independente ($1/x$) e a área sob o pico do sinal cromatográfico, considerando variável dependente (y). Os parâmetros de correlação foram estimados por meio do método dos mínimos quadrados.

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

4.2.7.3. LIMITE DE DETECÇÃO

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

Para estabelecer este parâmetro, utilizaram-se amostras de plasma com concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível detectável.

4.2.7.4. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

É definido como a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2003a).

Para estabelecer este parâmetro, utilizaram-se amostras de plasma com concentrações decrescentes do fármaco em seis repetições até o menor nível quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, que de acordo com a legislação vigente deve ser menor ou igual a 20% (Brasil, 2003a).

4.2.7.5. RECUPERAÇÃO

A recuperação indica a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. São desejáveis valores próximos a 100% de recuperação para o fármaco e para o padrão interno, no entanto admitem-se valores menores desde que sejam obtidos resultados precisos e exatos (Brasil, 2003a).

A recuperação foi determinada comparando-se os resultados obtidos a partir das análises de amostras de plasma branco adicionadas de metronidazol e padrão interno, submetidas ao processo de extração, conforme foi descrito no item 4.2.5, aos resultados de análises de amostras de plasma branco extraídas da mesma maneira e posteriormente adicionadas ao padrão de metronidazol e ao padrão interno que não foram submetidos ao processo de extração. Este parâmetro foi determinado a partir de três concentrações diferentes para o metronidazol (concentrações das amostras de controle de qualidade) em seis repetições.

4.2.7.6. PRECISÃO

A precisão do método foi realizado por meio da repetibilidade do método é determinada por meio dos resultados obtidos em análises de amostras em três concentrações diferentes (baixa, média e alta), em cinco repetições por concentração e foi calculada utilizando a seguinte equação:

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

As análises foram feitas comparando-se os resultados obtidos de uma mesma corrida cromatográfica (precisão intradia) e de corridas em dias diferentes (precisão interdias).

4.2.7.7. EXATIDÃO

A exatidão do método deve ser determinada utilizando-se, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, cinco repetições por concentração. Tal parâmetro é determinado em uma mesma corrida analítica (exatidão intradia) e em corridas diferentes (exatidão interdias). Lembrando que o desvio não deve exceder 15 %, exceto para o limite de quantificação que é de 20 % (Brasil, 2003a).

Este parâmetro foi determinado pela análise de três concentrações diferentes de controle de qualidade com cinco repetições em uma mesma corrida (intradia) ou em três corridas diferentes (interdias), e calculado utilizando a seguinte equação:

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

4.2.7.8. ESTABILIDADE

A estabilidade é determinada de acordo com as condições de manuseio e armazenamento da amostra (United States, 2001) e visa garantir que o fármaco não sofre alteração entre a coleta e a análise da amostra (Causon, 1997).

Conforme é recomendado pela RDC 899/2003, foram analisados os seguintes parâmetros de estabilidade (Brasil, 2003a):

- ✓ Estabilidade à temperatura ambiente por 4 horas, denominada de curta duração;
- ✓ Estabilidade de longa duração, que deve exceder o tempo entre a primeira coleta e a análise da última amostra, de acordo com o protocolo de bioequivalência;
- ✓ Estabilidade das soluções-padrão utilizadas na preparação diária da curva de calibração;
- ✓ Estabilidade de amostras de plasma, mantidas a -20°C e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento;
- ✓ Estabilidade de pós-processamento, ou seja, amostras pós-processadas são mantidas à temperatura ambiente por 24 e 48 horas.

4.2.7.8.1. ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO

A avaliação foi realizada em triplicata utilizando amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações diferentes, submetidas ao descongelamento natural e mantidas à temperatura ambiente por 4 horas. Após este

período as amostras foram analisadas e os resultados comparados com os da amostra recém-preparada e imediatamente analisada.

4.2.7.8.2. ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO

Este parâmetro avaliou a estabilidade das amostras durante o período de tempo em que foram mantidas em congelador, que está compreendido entre a data da coleta das amostras de plasma de voluntários que receberam o metronidazol e a data de término da etapa analítica. Os resultados das amostras de controle de qualidade analisadas em triplicata, em três concentrações diferentes, e mantidas a -20°C por 46 dias, foram comparados aos resultados de amostras recém-preparadas e imediatamente analisadas.

4.2.7.8.3. ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO

A avaliação da estabilidade das soluções padrão em uma mistura de água e metanol na proporção de 90:10, v/v foi feita diariamente durante a validação e análise das amostras de voluntários, com monitoramento das áreas dos sinais cromatográficos obtidos. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos a partir das soluções padrão recém-preparadas e analisadas em seguida.

4.2.7.8.4. ESTABILIDADE DE CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

A determinação deste parâmetro foi feita utilizando amostras de controle de qualidade em triplicata e em três concentrações diferentes, submetidas a ciclos com

as seguintes condições: congelamento à -20 °C por 12 horas e descongelamento em temperatura ambiente, e repetidos sucessivamente até completar três ciclos. A concentração do fármaco nas amostras de plasma de controle de qualidade foi determinada nos três ciclos e, no tempo zero, correspondente ao momento em que as amostras de controle de qualidade foram preparadas e analisadas, antes do congelamento.

4.2.7.8.5. ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO

Este parâmetro avaliou a estabilidade das amostras processadas, contemplando o período de espera no auto-injetor do cromatógrafo. Foram analisadas amostras de controle de qualidade em triplicatas processadas e mantidas por 24 e 48 horas em temperatura ambiente.

4.2.7.9. VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE DILUIÇÃO

Alguns voluntários apresentaram amostras com concentrações acima do limite máximo de quantificação de 8,0 µg/mL, nestes casos efetuou-se a diluição tomando-se 125 µL da amostra do voluntário e adicionando-se 125 µL de plasma branco do próprio voluntário. A validação deste processo de diluição foi realizada pela análise da amostra diluída paralelamente com a análise da amostra de CQA diluído (controle de qualidade alto) em triplicata, tomando-se 125 µL do CQA e adicionando-se 125 µL de plasma branco. Após agitação em vórtex por 10 segundos, prosseguiu-se a extração conforme descrito na metodologia analítica 4.2.5.

Para a validação desse processo de diluição, foram aceitos resultados com precisão, exatidão e desvios em relação a concentração média obtida inferiores a 15 % a partir de uma triplicata de CQA.

4.2.8. QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL NAS AMOSTRAS DE PLASMA

A quantificação de metronidazol nas amostras de plasma foi realizada conforme a metodologia analítica descrita no item 4.2.6.

As amostras de plasma dos voluntários que receberam metronidazol foram analisadas paralelamente à curva de calibração com oito pontos e à análise das amostras de plasma de controle de qualidade em triplicata, quadruplicata ou quintuplicata, dependendo da quantidade de voluntários analisados por corrida analítica, em três concentrações diferentes:

- ✓ Controle de qualidade baixo (CQB): 0,15 µg/mL;
- ✓ Controle de qualidade médio (CQM): 3,50 µg/mL;
- ✓ Controle de qualidade alto (CQA): 7,00 µg/mL;

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

4.3. ETAPA CLÍNICA DO ENSAIO DE BIOEQUIVALÊNCIA

A etapa clínica do estudo de bioequivalência foi terceirizada e realizada em centro certificado pela ANVISA. O centro escolhido foi a Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos Ltda, Toledo, Paraná. No entanto, o protocolo e os critérios de inclusão, o delineamento do estudo clínico, bem como a lista de randomização foram definidos pelos pesquisadores do Biofar, na ocasião do ensaio clínico (2008).

Centro este certificado pela ANVISA segundo a Resolução RE n° 686, de 06 de março de 2006 (Brasil, 2006a) e de acordo com legislação vigente RDC 41/2000 (Brasil, 2000).

O estudo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Maringá, e avaliado pelo CEP da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (ambos apresentados no ANEXO A).

A unidade de internação foi HCO (Centro Hospitalar do Oeste), Toledo, Paraná possui área exclusiva para ensaios clínicos, posto de enfermagem, laboratório de processamento de amostra e sala de lazer. A enfermaria da unidade de internação dispõe de carrinho de emergência com medicação e equipamentos para urgência: desfibrilador, monitor, oxímetro, respirador, e material para cirurgia de pequeno porte para qualquer eventualidade. Além disso, o centro tem acesso a Unidade de Terapia Intensiva (UTI), disponível no hospital.

4.3.1.CASUÍSTICA

O estudo foi realizado em seres humanos, de acordo com as normas éticas internacionais e nacionais para ensaios desta natureza e com regulamentação estabelecida pela ANVISA (Brasil, 1996).

Foram selecionados para este estudo 24 voluntários sadios, sendo 12 do sexo masculino e 12 do sexo feminino, com idade média de 28,4 anos, peso e altura médios de 66,3 Kg e 169,2 cm, respectivamente (Tabela 4), devidamente informados sobre as características da pesquisa e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), em duas vias (ANEXO B).

Os voluntários satisfizeram os seguintes critérios:

- ✓ Não fumantes;

- ✓ Bom estado de saúde, idade entre 21 e 45 anos e peso ideal $\pm 15\%$, calculado pela fórmula $PI = H - 100$ para homens e $PI = 0,9 (H - 100)$ para mulheres, onde PI é peso ideal (Kg) e H é altura do voluntário em (cm);
- ✓ Ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- ✓ Sem antecedentes de hipersensibilidade aos medicamentos;
- ✓ Voluntários do sexo feminino não estavam em estado de gravidez (comprovada por meio de exame laboratorial) ou em período de amamentação.

A inclusão do voluntário também foi fundamentada nos seguintes exames laboratoriais:

- ✓ Hemograma completo;
- ✓ Uréia;
- ✓ Creatinina;
- ✓ Fosfatase alcalina;
- ✓ Glicemia;
- ✓ Bilirrubina total;
- ✓ Proteínas totais e albumina;
- ✓ Transaminase oxalacética;
- ✓ Transaminase pirúvica;
- ✓ Colesterol total;
- ✓ Ácido úrico;
- ✓ Triglicérides;
- ✓ Sorologias para HIV e Hepatites B e C;
- ✓ β -HCG (para mulheres);
- ✓ Análise da urina completa;
- ✓ Eletrocardiograma completo com 12 derivações.

Tanto os exames clínicos quanto os exames laboratoriais foram repetidos no pós-estudo, excetuando as sorologias para HIV e Hepatites B e C.

Tabela 4 Características dos voluntários incluídos no ensaio de bioequivalência dos comprimidos contendo 250 mg de metronidazol

Voluntário	Sexo	Idade (anos)	Altura (cm)	Peso (Kg)	DPI (%)
1	M	32	183	81,0	-2
2	M	21	168	60,0	-12
3	M	33	169	68,3	-1
4	M	24	186	87,3	2
5	M	31	173	78	7
6	M	32	171	72,5	2
7	M	22	174	75,3	2
8	M	37	166	62,7	-5
9	M	26	175	81,2	8
10	M	42	171	62,8	-12
11	M	24	174	73,7	0
12	M	29	165	66,0	2
13	F	25	168	60,6	-1
14	F	23	171	63,7	0
15	F	21	156	54,1	7
16	F	22	162	51,3	-8
17	F	30	163	55,4	-2
18	F	27	167	62,5	4
19	F	25	171	66,0	3
20	F	45	171	69,8	9
21	F	35	162	60,5	8
22	F	24	159	61,0	15
23	F	26	169	60,6	-2
24	F	25	166	56,5	-5
Média		28,4	169,2	66,3	1,0
DP		6,5	6,8	9,3	6,5

DPI = Desvio padrão do peso ideal; DP = desvio padrão; M = masculino; F = feminino

4.3.2.PROCEDIMENTO DO ENSAIO DE BIOEQUIVALÊNCIA

De acordo com a RDC 10 de 02 de janeiro de 2001, durante o estudo de bioequivalência deve-se, no caso de medicamentos genéricos e similares de liberação imediata com várias dosagens, mesma forma farmacêutica e formulações equivalentes, fabricados pelo mesmo produtor e no mesmo local de fabricação, utilizar a maior dosagem, e assim ficam isentas deste tipo de estudo os medicamentos de menor dosagem, caso os perfis de dissolução dos fármacos, entre todas as dosagens, sejam comparáveis (Brasil, 2001). Apesar de a maior dosagem do medicamento referência do metronidazol (Flagyl®) ser 400 mg, o estudo foi conduzido com a dosagem de 250 mg, pois a FUNED, fabricante do medicamento a ser testado, não produzia a dosagem de 400 mg por ocasião do estudo.

O ensaio foi do tipo aleatório, cruzado, formando-se dois grupos com igual número de voluntários, A e B conforme determinado pela Resolução nº 1170 de 19 de abril de 2006 (Brasil 2006b) e apresentados na Tabela 5. No período 1, os voluntários do grupo A receberam um comprimido de Flagyl® contendo metronidazol 250 mg empregado como produto Referência, enquanto que os do grupo B receberam um comprimido de FUNED Metronidazol contendo metronidazol 250 mg considerado como o produto Teste. No período 2 o procedimento foi repetido, invertendo-se os grupos, de modo que cada voluntário recebeu cada um dos produtos em estudo, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 Desenho amostral para ensaio de bioequivalência de comprimidos contendo 250 mg de metronidazol, seguindo delineamento cruzado 2 X 2

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

R = Produto Referência (Flagyl®, lote 702824, produzido por Aventis Pharma Ltda); T = Produto Teste (FUNED Metronidazol®, lote 07100833, produzido por Fundação Ezequiel Dias - FUNED); M = masculino; F = feminino

4.3.3.ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS

Conforme o desenho amostral na Tabela 5, a administração dos medicamentos aos voluntários foi feita pela manhã, após jejum de 8 horas, com o auxílio de 200 mL de água à temperatura ambiente.

4.3.4.PERIODO DE JEJUM E ALIMENTAÇÃO

O período de jejum antes da administração dos medicamentos foi de, no mínimo, oito horas e após a administração da medicação, os voluntários ainda permaneceram em jejum por mais 4 horas. O jejum feito pelos voluntários consistiu na abstinência de ingestão de alimentos e de água.

Os voluntários receberam almoço, lanche e jantar padronizados, respectivamente, quatro, sete e onze horas após a administração dos medicamentos.

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

4.3.5.COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de 8 mL de sangue em tubo heparinizado nos seguintes intervalos de tempo: 0:00; 0:20; 0:40; 1:00; 1:20; 1:40; 2:00; 2:30; 3:00; 4:00; 6:00; 8:00; 12:00; 24:00; 36:00; 48:00 horas após a administração dos

medicamentos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3500 rpm e o plasma aliquoteado em duplicata em frascos criogênicos de propileno de 4 mL. Os frascos foram armazenados em freezer a -20°C até o momento das análises.

4.3.6. TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

As amostras de plasma foram transportadas para o laboratório analítico em caixas com isolamento térmico, sendo o congelamento garantido com o auxílio de gelo seco. Por ocasião do recebimento das amostras pela unidade analítica, as mesmas foram avaliadas em relação às suas condições gerais (integridade do frasco, congelamento ou descongelamento e presença de vazamento) e o registro de temperatura em termômetros adequados.

4.3.7. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

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

4.4. AVALIAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS PRODUTOS

A bioequivalência entre os produtos contendo metronidazol (Referência e Teste) foi determinada a partir das amostras de plasma provenientes do estudo

clínico, por meio da comparação dos parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção do fármaco a partir das duas formulações (Ritschel, 1992; Shargel & Yu, 1999).

Os parâmetros avaliados foram:

- ✓ Parâmetros relacionados à quantidade de fármaco absorvida:
 - ASC_{0-t} : Área parcial sob a curva de decaimento plasmático do fármaco, determinada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao tempo t , no qual t é o tempo relativo à última concentração determinada experimentalmente;
 - $ASC_{0-\infty}$: Área parcial sob a curva de decaimento plasmático do fármaco, determinada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao infinito, ou seja, $ASC_{0-t} + C_t/k_{el}$, no qual C_t é a última concentração determinada experimentalmente e k_{el} é a constante de eliminação na fase terminal. Recomenda-se que ASC_{0-t} seja igual ou superior a 80% de $ASC_{0-\infty}$.

- ✓ Parâmetros relacionados à velocidade de absorção do fármaco:
 - C_{max} : Concentração plasmática máxima que o fármaco atinge após administração, determinada diretamente a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo, sem interpolação;
 - t_{max} : Tempo necessário para atingir C_{max} , é o indicador de velocidade do processo de absorção, determinado diretamente a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo, sem interpolação.

Também foram calculados os seguintes parâmetros farmacocinéticos em relação à eliminação:

- $t_{(1/2)el}$: Meia-vida de eliminação plasmática do fármaco, calculada por meio de fórmula:

$$t_{\left(\frac{1}{2}\right)el} = \frac{0,693}{K_{el}}$$

- k_{el} : Constante de velocidade de eliminação do fármaco, determinada a partir da equação que define a parte terminal de decaimento plasmático em função do tempo;
- Cl: Clearance é definido como o volume de plasma ou sangue depurado do fármaco por unidade de tempo, e calculada por meio de fórmula:

$$Cl = K_{el} \times Vd$$

- Vd: Volume de distribuição é definido como o volume aparente no qual o fármaco encontra-se dissolvido em concentração igual a do plasma, e calculada por meio de fórmula:

$$Vd = \frac{Dose}{Conc. plasmática}$$

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada conforme recomendado pela ANVISA (Brasil, 2003b). Foi determinado o poder do teste para calcular a probabilidade da conclusão da análise ser válida.

Os resultados foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e da construção do intervalo de confiança 90%. Foi realizada análise multivariada, utilizando-se a análise de variância (ANOVA), para parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, na escala logarítmica. Em seguida, foi determinado o intervalo de confiança 90% (IC 90%) para as relações entre os valores de C_{max} , ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ dos produtos Teste e Referência, utilizando-se a escala logarítmica. Foi considerado nível de significância (α) menor que 0,05. Dois produtos possuem a mesma

biodisponibilidade se os intervalos de confiança 90% para as relações entre os valores de $C_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ de ambos, calculados com base nas transformações logarítmicas, estiverem entre 80 e 125%, ou seja:

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

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

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

no qual:

$C_{\max}$ = concentração plasmática máxima;

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

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

5.RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METRONIDAZOL EM PLASMA HUMANO

5.1.1.ESPECIFICIDADE

O método desenvolvido mostrou-se específico para o metronidazol e a zidovudina (padrão interno), obtendo-se boa separação destes entre si e dos componentes do plasma branco, lipêmico ou hemolisado, com tempos de retenção de 3,00 minutos para o metronidazol e 3,80 minutos para zidovudina (Figura 3).

(A)

(B)

Figura 3 Cromatogramas obtidos por CLAE-MS/MS referente à: (A) plasma branco adicionado de padrão interno – zidovudina e (B) Controle de Qualidade Médio – plasma de voluntário sadio adicionado de padrões – metronidazol e zidovudina

5.1.2.LINEARIDADE

O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 0,05 a 8,00 µg/mL, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,999, a curva de calibração está representada na Figura 4 e os parâmetros relativos à curva de calibração estão apresentados na Tabela 6.

Esta faixa de linearidade é adequada à aplicação do método aos estudos de bioequivalência e farmacocinética, considerando a possibilidade de diluição de amostras que apresentaram resultados superiores ao último ponto de calibração (8,00 µg/mL).

Figura 4 Curva de calibração do método analítico para quantificação de metronidazol em plasma por CLAE – MS/MS na faixa de concentração de 0,05 a 8,00 µg/mL

Sendo: x= Concentração plasmática (µg/mL); y= Razão entre áreas de pico de metronidazol por padrão interno (zidovudina), r^2 = coeficiente de determinação.

Tabela 6 Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação de metronidazol em plasma por Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas na faixa de concentração de 0,05 e 8,00 µg/mL

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	0,227
Coeficiente linear (b)	0,016
Coeficiente de determinação (r^2)	0,999

5.1.3.LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção para o método foi 0,025 µg/mL; que foi adequado para a realização deste estudo.

5.1.4.LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

É importante salientar que o limite de quantificação do fármaco é um parâmetro de elevada importância, tendo em vista que no estudo de bioequivalência foi administrada dose única (250 mg metronidazol) a cada voluntário em cada uma das fases, resultando em baixas concentrações plasmáticas do fármaco (aproximadamente 100 ng/mL), especialmente nas amostras relativas aos últimos tempos de coleta. O método desenvolvido mostrou-se adequado, pois apresentaram especificidade e sensibilidade adequadas à aplicação para os estudos de farmacocinética, biodisponibilidade e bioequivalência, nos quais a detecção de

pequenas concentrações é de extrema importância, visto que valores inferiores à curva de linearidade, não entram nos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos.

A quantificação do fármaco com precisão e exatidão adequados é imprescindível para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção e eliminação do fármaco. Neste trabalho, o limite de quantificação foi de 0,05 µg/mL, inferior aos limites obtidos pelo Nascimento e colaboradores (2005) e Sagan e colaboradores (2005) que foi 0,06 µg/mL e 0,15 µg/mL, respectivamente.

O limite de quantificação do método foi de 0,05 µg/mL, com precisão de 2,52% e exatidão de 100,26%.

5.1.5.RECUPERAÇÃO

Neste trabalho, as amostras foram purificadas por um processo simples de extração líquido - líquido, utilizando acetato de etila como solvente extrator, o que possibilitou boa recuperação do metronidazol e do padrão interno em relação aos outros solventes, principalmente em relação aos solventes aquosos.

Nos trabalhos publicados por Wibawa e colaboradores (2001) e Fraselle e colaboradores (2007), são utilizadas misturas de solventes com componentes aquosos, que apesar de gerar bons resultados de recuperação, não são viáveis neste tipo de estudo, devido ao grande número de amostras, uma vez que existe uma grande demora na etapa em que há a eliminação do solvente (secagem). Portanto, solventes orgânicos apresentam vantagens sobre solventes aquosos.

Durante o desenvolvimento do método, outros solventes orgânicos foram utilizados em testes de recuperação, como por exemplo, o éter etílico, porém os resultados foram inferiores aos 82,0% obtidos com o acetato de etila.

A recuperação média com o acetato de etila foi de 82,00% para o metronidazol e de 82,09% para a zidovudina, com precisão e exatidão dentro dos

limites especificados, o que indicou que o procedimento de extração descrito para o método bioanalítico apresentou eficiência adequada (Tabela 7).

Tabela 7 Recuperação média do procedimento de purificação das amostras de plasma para metronidazol (padrão) e para zidovudina (padrão interno)

Concentração de metronidazol ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	
	Padrão (CV %)	Padrão interno (CV %)
0,15	89,04 (3,00)	88,91 (2,18)
3,50	74,04 (11,51)	77,72 (11,14)
7,00	83,20 (12,23)	79,36 (10,21)
Média	82,09 (9,21)	82,00 (7,37)

Cada valor representa uma média de seis repetições. CV = coeficiente de variação.

5.1.6.PRECISÃO

A precisão do método analítico variou entre 1,84 e 7,20% para as amostras analisadas no mesmo dia (intradia) e entre 6,04 e 10,65% para as amostras analisadas em dias diferentes (interdias). Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

5.1.7.EXATIDÃO

A exatidão do método analítico variou entre 101,16 e 103,85% para as amostras analisadas no mesmo dia (intradia) e entre 97,95 e 99,94% para as amostras analisadas em dias diferentes (interdias). Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 Precisão e exatidão intradia e interdias referentes ao método analítico para quantificação de metronidazol em amostras de plasma por CLAE com detecção por espectrometria de massas

Concentração de metronidazol (µg/mL)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intradia	Interdias	Intradia	Interdias
0,15	7,20	10,65	103,39	97,85
3,50	3,25	6,10	103,85	99,94
7,00	1,84	6,04	101,16	98,47

Cada valor representa uma média de seis determinações para precisão e exatidão intradia e seis determinações por 4 dias para precisão e exatidão interdias.

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

5.1.8. ESTABILIDADE

5.1.8.1. ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO

A estabilidade de curta duração foi avaliada mantendo-se amostras de plasma de controle de qualidade, em três concentrações, descongeladas e mantidas à temperatura ambiente por 4 horas. Após este período estas amostras foram processadas e analisadas imediatamente. Os resultados foram comparados com os de amostras recém-preparadas e analisadas em seguida, sendo aceitos desvios entre $\pm 15\%$ (Tabela 9).

Tabela 9 Resultados referentes ao estudo de estabilidade do metronidazol em amostras analisadas após manutenção a temperatura ambiente por 4 horas

Conc. nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Amostras recém-preparadas e analisadas em seguida			Amostras preparadas após 4 horas à temperatura ambiente			
	Conc.	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	det. ($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)	det. ($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)	(%)
0,15	0,14	5,05	93,71	0,14	4,12	96,29	2,76
3,50	3,44	3,28	98,20	3,44	1,52	98,31	0,12
7,00	6,92	0,78	98,86	6,39	1,07	91,25	-7,70

Cada resultado representa a média de três determinações. Conc = concentração. Det. = determinada. Desvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

5.1.8.2. ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO

As amostras de plasma de controle de qualidade preparadas com a adição de metronidazol conforme descrito no item 4.2.4, mantiveram-se estáveis por, pelo menos, 46 dias. As amostras foram processadas após 46 dias e analisadas imediatamente. Os resultados foram comparados com os de amostras recém-

preparadas e analisadas imediatamente, sendo aceitos desvios entre $\pm 15\%$ (Tabela 10).

Tabela 10 Resultados referentes ao estudo de estabilidade do metronidazol em amostras de plasma de controle de qualidade, analisadas logo após o preparo e mantidas a -20°C por 46 dias

Conc. nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Amostras recém-preparadas e analisadas em seguida			Amostras armazenadas a -20°C durante 46 dias			
	Conc.	Precisão	Exatidão	Conc.	Precisão	Exatidão	Desvio
	det. ($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)	det. ($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)	(%)
0,15	0,14	5,05	93,71	0,14	4,34	91,10	-2,79
3,50	3,44	3,28	98,20	3,75	5,51	107,15	9,12
7,00	6,92	0,78	98,86	7,23	2,37	103,33	4,51

Cada resultado representa a média de três determinações. Conc = concentração. Det. = determinada. Desvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

5.1.8.3. ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES-PADRÃO

A estabilidade das soluções-padrão do metronidazol e da zidovudina em metanol foi determinada, e os resultados obtidos apresentaram-se dentro dos limites especificados, com desvio médio de $-4,88\%$ para o padrão e $7,32\%$ para o padrão interno.

5.1.8.4. ESTABILIDADE DE CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

As amostras de controle de qualidade foram analisadas e mantiveram-se estáveis à -20°C por três ciclos de congelamento e descongelamento, após os ciclos de descongelamento, as amostras foram processadas e analisadas imediatamente. Os resultados obtidos foram comparados com as amostras de controle de qualidade recém-preparadas e analisadas imediatamente, sendo aceitos desvios entre $\pm 15\%$, e estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 Resultados referentes ao estudo de estabilidade do metronidazol em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas a temperatura de -20°C e submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento

Conc. nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas e analisadas em seguida			Ciclo 1				Ciclo 2				Ciclo 3			
	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,15	0,14	5,05	93,71	0,13	2,20	87,02	-7,14	0,13	7,05	89,72	-4,26	0,14	3,49	93,89	0,19
3,50	3,44	3,28	98,20	3,27	0,94	93,41	-6,06	3,56	5,13	101,72	3,59	3,45	2,10	98,70	0,50
7,00	6,92	0,78	98,86	6,21	0,32	88,69	-10,29	7,00	1,58	99,96	1,10	6,09	2,93	86,93	-12,07

Cada valor representa uma média de três determinações. Conc. = concentração. Det. = determinada. Desvio = desvio padrão em relação à amostra recém-preparada.

5.1.8.5. ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO

A estabilidade pós-processamento, representada pela estabilidade ao longo das condições da análise, foi determinada utilizando-se 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 (4.2.5). Estas amostras foram utilizadas para avaliar a estabilidade durante o período de espera máximo no injetor automático até a introdução da amostra no sistema cromatográfico, período correspondente a 24 horas. Foi avaliada também a estabilidade por 48 horas à temperatura ambiente.

Os resultados obtidos foram comparados com as amostras de controle de qualidade recém-preparadas e analisadas imediatamente, sendo aceitos desvios entre $\pm 15\%$, e estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 Resultados referente a estudo de estabilidade do metronidazol em amostras de plasma analisadas 24 e 48 horas após o procedimento de purificação

Conc. nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas e analisadas em seguida			Amostras analisadas 24 horas após o processamento				Amostras analisadas 48 horas após o processamento			
	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,15	0,14	5,05	93,71	0,14	2,06	92,52	-1,26	0,15	6,42	99,11	5,76
3,50	3,44	3,28	98,20	3,14	1,47	89,58	-8,78	3,52	1,44	100,58	2,42
7,00	6,92	0,78	98,86	6,37	2,03	90,96	-7,99	6,55	0,43	93,55	-5,38

Cada amostra representa uma média de três determinações. Conc = concentração. Det. = determinada. Desvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

As amostras de metronidazol em plasma a -20°C permaneceram estáveis ao serem submetidos aos três ciclos de congelamento e descongelamento. A análise de amostras de plasma descongeladas e mantidas à temperatura ambiente por 4 horas e de amostras de plasma processadas e mantidas por 24 e 48 horas à temperatura ambiente demonstraram estabilidade, indicando adequabilidade do método ao longo do tempo e às condições de análise deste tipo de ensaio. A estabilidade de longa duração foi determinada pelo tempo correspondente ao intervalo entre a primeira fase do ensaio clínico e o último dia de análise das amostras. As amostras de metronidazol em plasma mantidas a -20°C permaneceram estáveis durante este período, correspondente a 46 dias.

5.1.9.VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE DILUIÇÃO

Treze amostras de plasmas de voluntários do estudo, após a análise cromatográfica, apresentaram valores de concentração de metronidazol acima do último ponto da curva de calibração ($8,00\text{ }\mu\text{g/mL}$) e, portanto foram submetidas ao processo de diluição. A diluição foi feita na proporção de 1:2, ou seja, $125\text{ }\mu\text{L}$ de plasma branco e $125\text{ }\mu\text{L}$ de plasma de voluntário, com resultados acima de $8,00\text{ }\mu\text{g/mL}$, conforme está descrito no item 4.2.7.9. Concomitantemente à diluição das amostras de voluntários, foi feita a validação da diluição do CQA (Controle de qualidade alto) que apresenta concentração inicial de $7,00\text{ }\mu\text{g/mL}$. Foram obtidos resultados com precisão e exatidão dentro dos limites preconizados pela RE 899/2003 (Brasil, 2003a) de no máximo 15 % e os resultados da validação estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 Resultados referente ao processo de validação da diluição

Corrida analítica	CQA diluído (1:2)						
	CQA inicial (µg/mL)	Conc. exp. (µg/mL)	Conc. corrigida (µg/mL)	Conc. média (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
		3,41	6,82			97,38	-2,62
Reanálise	7,00	3,52	7,04	7,02	1,37	100,54	0,54
		3,60	7,20			102,86	2,86

Conc. = concentração. Exp. = experimental.

5.1.10. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A METODOLOGIA DESENVOLVIDA

O método desenvolvido mostrou-se adequado para quantificação de metronidazol em amostras de plasma provenientes de ensaio de bioequivalência. Esta adequação é comprovada por meio dos resultados referentes à validação do método, tais como, especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade.

Na literatura estão apresentados alguns trabalhos que descrevem a quantificação de metronidazol em plasma (Fraselle *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2005; Sagan *et al.*, 2005; Spénard *et al.*, 2005; Wibawa *et al.*, 2001; Idkaidek, Najib, 2000; Menelaou *et al.*, 1999; Jessa *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 1995; Midha *et al.*, 1973) ou em soro (Galmier *et al.*, 1998; Pollak, 1996).

A detecção do metronidazol é realizada, na maioria dos trabalhos que emprega cromatografia líquida de alta eficiência, por detector ultravioleta (UV) com

comprimento de onda na faixa de 313 a 318 nm. Os tempos de análise destes métodos são elevados e os processos de purificação das amostras são mais complexos, pois estes trabalhos utilizaram precipitação de proteínas, extração líquido-líquido com grande volume de solventes ou mesmo cartuchos de extração de fase sólida que apresentam altos custos.

As amostras biológicas obtidas dos voluntários e destinadas aos estudos de bioequivalência/biodisponibilidade devem passar por um tratamento prévio à sua análise no cromatógrafo. As principais razões que justificam tais procedimentos são: a conhecida complexidade das matrizes biológicas, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a baixa concentração das substâncias a serem analisadas. O objetivo do pré-tratamento é uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (Queiroz *et al.*, 2001). A purificação do metronidazol por meio da extração líquido-líquido simples ou dupla é muito utilizada, em função das características da polaridade da molécula (Fraselle *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2005; Sagan *et al.*, 2005; Goodman & Gilman, 2001; Idkaidek *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 1995).

O trabalho publicado por Sagan e colaboradores (2005) relata o desenvolvimento de método utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espectrofotometria de massas, no entanto o método de purificação desenvolvido neste trabalho utiliza grande volume de solventes em várias etapas de preparo das amostras. Já o trabalho publicado por Fraselle e colaboradores (2007) apresenta elevado grau de dificuldade para a etapa analítica, pois além de grandes volumes de solvente, é necessário que as amostras permaneçam em repouso por uma noite (*overnight*). Além disso, estes trabalhos apresentaram elevado tempo de corrida (10 e 30 minutos, respectivamente), que são significativamente maiores quando comparados com o método desenvolvido no presente trabalho (5 minutos). Adicionalmente, a utilização de grande volume de solvente e a complexidade da técnica torna este procedimento inadequado para a utilização deste método no processamento de amostras em ensaios de bioequivalência, uma vez que é necessário considerar que este tipo de ensaio gera grande número de amostras (Porta *et al.*, 2008).

O tempo de corrida de cada análise cromatográfica foi de 5 minutos, significativamente inferior aos publicados na literatura por Sagan e colaboradores (2005), Wibawa e colaboradores (2001), Idkaidek e Najib (2000) e Galmier e colaboradores (1998), que apresentam tempos de análises cromatográficas entre 6 e 10 minutos. A diminuição no tempo de análise possibilita um aumento da vida útil da coluna cromatográfica, além de permitir maior número de análises por tempo com conseqüente redução da duração da etapa analítica de um ensaio de bioequivalência.

Apenas no trabalho de Nascimento e colaboradores (2005), está descrita uma técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com PAD (detector de arranjo de fotodiodo) ajustado em 315 nm, que apresenta um processo de purificação das amostras mais simples, consistindo de precipitação de proteínas com ácido perclórico, porém o tempo de corrida é maior do que o proposto no presente trabalho (11 minutos).

Uma consideração importante é a escolha da utilização de padrão externo ou interno. O padrão externo é utilizado em comparação com a resposta do analito e uma reta de calibração é gerada a partir dessa resposta do padrão externo. Sempre que possível, utiliza-se padrão interno, pois este deve ter estrutura semelhante ao analito. O padrão interno é adicionado nas etapas de pré-tratamento das amostras. Os resultados da análise do padrão interno são utilizados para estabelecer uma razão entre a resposta do analito e a do padrão interno, possibilitando, assim, minimizar os erros decorrentes de possíveis perdas durante o preparo das amostras (Causon, 1997). Neste trabalho, utilizou-se zidovudina como padrão interno que apresentou-se adequado por causa da seletividade do método desenvolvido.

No presente trabalho, a fase móvel utilizada foi composta por tampão acetato, na concentração de 10 mM, e acetonitrila na proporção de 80:20, acrescida de 0,1% de ácido fórmico. Esta fase foi eluída a um fluxo de 1,0 mL/minuto, utilizando um splitter.

Os resultados obtidos após a avaliação dos parâmetros de validação demonstram que o método cromatográfico apresentou-se específico, sensível,

preciso e exato, justificando sua aplicação em estudos de bioequivalência e farmacocinética.

5.2. ETAPA CLÍNICA DE BIOEQUIVALÊNCIA

Durante a primeira fase do ensaio clínico (Fase 1) participaram 24 voluntários sadios, sendo 12 do sexo masculino e 12 do sexo feminino. O voluntário 5, do sexo masculino, não compareceu a internação da segunda fase do ensaio clínico (Fase 2), sendo excluído; portanto, 23 voluntários concluíram o estudo clínico, sendo que 11 do sexo masculino e 12 do sexo feminino.

5.3. ETAPA ANALÍTICA DE BIOEQUIVALÊNCIA

O produto Teste FUNED Metronidazol, lote 07100833 produzido pela FUNED e o produto Referência Flagyl[®], lote 702824 produzido pela Aventis Pharma, foram classificados como equivalentes farmacêuticos, por conterem o mesmo fármaco, na mesma dosagem e forma farmacêutica, com qualidade assegurada, cumprindo as especificações farmacopeicas (ANEXO D). Entretanto, esta classificação não atesta a intercambiabilidade entre estes produtos, sendo necessária a realização do estudo *in vivo* para que se obtenham conclusões definitivas sobre a bioequivalência dos produtos em estudo.

O ensaio de bioequivalência entre os produtos Teste (FUNED Metronidazol) e Referência (Flagyl[®]), pertencentes aos lotes acima citados, foi realizado por meio de um estudo quantitativo direto, com delineamento randomizado, cruzado e aberto, no qual todos os voluntários receberam ambos os produtos avaliados, em duas fases distintas.

O desenho cruzado e randomizado apresenta algumas vantagens e por isso é utilizado em estudos de bioequivalência, tais como, redução a variabilidade interindividual, pois cada voluntário constitui seu próprio controle e fornece a melhor estimativa imparcial para as diferenças entre as formulações (Chow & Liu, 2000).

O período de eliminação (*washout*) pode ser definido como o intervalo de tempo entre os tratamentos para o qual o efeito de uma formulação administrada em um tratamento não interfere no próximo (Brasil, 2003b). Neste trabalho, o intervalo de *washout* foi de uma semana, que é superior a 10 tempos de meia-vida do metronidazol, garantindo assim a completa eliminação do fármaco.

O voluntário 21 foi excluído, pois o cromatograma referente à amostra zero da fase 1 apresentou interferente significativo com o mesmo tempo de retenção do metronidazol e por esta razão o referido voluntário foi excluído na etapa analítica e estatística.

As concentrações plasmáticas médias de metronidazol, após a administração do produto teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) aos 22 voluntários sadios, estão apresentados na Tabela 14. Os valores individuais estão apresentados no ANEXO C.

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

O estudo foi concluído dentro dos períodos de tempo definidos para a estabilidade das amostras contendo metronidazol e nas condições determinadas durante a validação do método.

Os sinais foram integrados automaticamente pelo programa do sistema – Micromass Lynx V 4.0 Quantify. Para a integração, foi utilizado o valor de 10000 para ruído (*noise*).

Tabela 14 Concentrações plasmáticas médias do metronidazol após a administração oral dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) aos 22 voluntários sadios

Tempo (h)	Concentração plasmática (µg/mL)					
	Produto referência (Flagyl [®])			Produto teste (FUNED Metronidazol)		
	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
0,00	NQ	—	—	NQ	—	—
0,33	1,49	2,34	157,49	2,46	2,42	98,04
0,67	4,28	3,16	73,85	4,96	1,87	37,77
1,00	4,62	2,18	47,14	5,57	1,41	25,31
1,33	4,94	1,99	40,39	5,41	1,32	24,43
1,67	4,98	1,96	39,34	5,66	1,45	25,64
2,00	4,99	1,93	38,58	5,54	1,36	24,57
2,50	4,97	1,76	35,38	5,28	1,30	24,66
3,00	4,88	1,59	32,59	5,02	1,19	23,66
4,00	4,87	1,15	23,67	4,80	1,12	23,25
6,00	3,86	1,00	25,92	3,78	0,84	22,21
8,00	3,22	0,84	25,99	3,14	0,70	22,20
12,00	2,33	0,61	26,21	2,21	0,57	25,62
24,00	0,91	0,31	34,04	0,90	0,32	35,44
36,00	0,31	0,16	51,50	0,30	0,17	55,81
48,00	0,15	0,07	45,27	0,15	0,08	51,82

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

As curvas médias de decaimento plasmático, referente aos produtos teste e referência estão representadas na Figura 5. As curvas individuais estão apresentadas no ANEXO C.

Figura 5 Curvas médias de decaimento plasmático após a administração oral dos produtos Teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e Referência (Flagyl[®], lote 702824) aos 22 voluntários sadios

As barras verticais representam o erro padrão da média.

As Tabelas 15 e 16 apresentam as médias dos parâmetros farmacocinéticos referentes à fase de absorção ($C_{\max}$, $t_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$) obtidos após a administração oral dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824), respectivamente, aos 22 voluntários sadios. Os valores individuais estão no ANEXO C.

Tabela 15 Parâmetros farmacocinéticos referentes à absorção do metronidazol após a administração oral do produto teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) aos 22 voluntários sadios

Voluntário	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (h)	ASC_(0-t) (µg×h/mL)	ASC_(0-∞) (µg×h/mL)
1	6,13	0,33	45,94	47,45
2	4,51	1,67	60,07	61,31
3	4,73	1,67	70,98	75,10
4	3,55	4,00	61,26	64,29
6	6,22	0,67	72,16	75,42
7	7,96	0,67	62,36	64,02
8	7,52	0,67	74,07	75,58
9	5,80	1,00	58,66	59,71
10	7,87	0,33	55,73	57,54
11	5,26	2,00	64,90	66,32
12	7,15	0,33	76,08	77,78
13	7,08	1,00	78,96	79,60
14	7,61	1,33	89,59	90,86
15	7,65	1,67	121,50	126,74
16	7,83	1,67	62,14	62,60
17	7,76	1,67	83,47	84,26
18	7,81	1,00	93,47	95,33
19	5,57	1,00	60,58	61,57
20	7,47	0,67	94,00	95,96
22	7,44	1,67	88,63	89,27
23	6,82	1,67	67,32	68,65
24	6,75	1,00	73,41	74,39
Média	6,66	1,26	73,42	75,17
DP	1,27	0,80	16,78	17,28
CV(%)	19,05	63,85	22,85	22,99

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

Tabela 16 Parâmetros farmacocinéticos referentes à absorção do metronidazol após a administração oral do produto referência (Flagyl®, lote 702824) aos 22 voluntários sadios

Voluntário	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (h)	ASC_(0-t) (µgxh/mL)	ASC_(0-∞) (µgxh/mL)
1	5,19	0,67	42,10	42,65
2	4,38	4,00	59,19	60,57
3	7,49	0,67	69,46	72,48
4	3,46	4,00	59,31	62,31
6	6,56	0,67	67,92	70,02
7	4,81	2,50	65,65	67,21
8	7,64	0,67	73,85	74,82
9	5,49	0,67	63,21	64,33
10	9,84	0,33	58,30	60,26
11	7,31	0,67	67,97	69,19
12	7,04	1,00	80,04	84,31
13	8,42	0,67	70,93	72,09
14	5,25	6,00	86,12	88,34
15	7,87	2,50	106,36	108,89
16	7,76	2,00	66,78	67,63
17	7,67	1,67	84,90	85,60
18	7,35	2,50	93,00	94,89
19	6,08	4,00	63,75	64,75
20	7,37	1,33	104,62	107,05
22	6,28	4,00	99,97	101,44
23	7,15	0,67	68,78	69,24
24	8,44	0,67	66,17	66,93
Média	6,77	1,90	73,56	75,23
DP	1,51	1,59	16,26	16,60
CV(%)	22,37	83,44	22,11	22,06

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

As Tabelas 17 e 18 apresentam as médias dos parâmetros farmacocinéticos referentes à fase de eliminação (Cl , V_d , K_{el} , $t_{(1/2)el}$) obtidos após a administração oral dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824), respectivamente, aos 22 voluntários sadios. Os valores individuais estão no ANEXO C.

Tabela 17 Parâmetros farmacocinéticos referentes à eliminação do metronidazol após a administração oral do produto teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) aos 22 voluntários sadios

Voluntário	Cl (L/h)	Vd (L/Kg)	K _{el}	t _{(1/2)el} (h)
1	5,27	0,68	0,10	7,20
2	4,08	0,81	0,08	8,26
3	3,33	0,80	0,06	11,42
4	3,89	0,67	0,07	10,42
6	3,31	0,72	0,06	10,86
7	3,91	0,67	0,08	9,02
8	3,31	0,64	0,08	8,43
9	4,19	0,60	0,09	8,11
10	4,34	0,74	0,09	7,39
11	3,77	0,62	0,08	8,39
12	3,21	0,64	0,08	9,17
13	3,14	0,53	0,10	7,04
14	2,75	0,46	0,09	7,34
15	1,97	0,53	0,07	10,13
16	3,99	0,57	0,14	5,07
17	2,97	0,55	0,10	7,13
18	2,62	0,49	0,09	8,11
19	4,06	0,54	0,11	6,04
20	2,61	0,44	0,08	8,24
22	2,80	0,41	0,11	6,14
23	3,63	0,55	0,11	6,35
24	3,36	0,49	0,12	5,72
Média	3,48	0,60	0,09	8,00
DP	0,73	0,11	0,02	1,69
CV (%)	20,98	18,75	21,60	21,15

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

Tabela 18 Parâmetros farmacocinéticos referentes à eliminação do metronidazol após a administração oral do produto referência (Flagyl®, lote 702824) aos 22 voluntários sadios

Voluntário	Cl (L/h)	Vd (L/Kg)	K _{el}	t _{(1/2)el} (h)
1	5,86	0,78	0,09	7,48
2	4,13	0,82	0,08	8,23
3	3,45	0,73	0,07	10,04
4	4,01	0,68	0,07	10,30
6	3,57	0,65	0,08	9,19
7	3,72	0,60	0,08	8,43
8	3,34	0,57	0,09	7,36
9	3,89	0,56	0,08	8,17
10	4,15	0,71	0,09	7,47
11	3,61	0,55	0,09	7,79
12	2,97	0,64	0,07	9,90
13	3,47	0,49	0,12	5,99
14	2,83	0,53	0,08	8,32
15	2,30	0,53	0,08	8,68
16	3,70	0,59	0,12	5,71
17	2,92	0,50	0,11	6,51
18	2,63	0,50	0,08	8,18
19	3,86	0,48	0,12	5,65
20	2,34	0,41	0,08	8,42
22	2,46	0,42	0,10	7,21
23	3,61	0,55	0,11	6,39
24	3,74	0,51	0,13	5,37
Média	3,48	0,58	0,09	7,76
DP	0,78	0,11	0,02	1,42
CV (%)	22,45	18,96	19,38	18,31

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

As curvas de decaimento plasmático dos produtos Referência (Flagyl®) e Teste (FUNED Metronidazol) e as médias dos parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção e utilizados na determinação da bioequivalência: $C_{\max}$ (Referência: 6,77 µg/mL; Teste: 6,66 µg/mL); $t_{\max}$ (Referência: 1,90 h; Teste: 1,26 h); ASC_{0-t} (Referência: 73,56 µgxh/mL; Teste: 73,42 µgxh/mL) e $ASC_{0-\infty}$ (Referência: 75,23 µgxh/mL; Teste: 75,17 µgxh/mL) apresentaram-se semelhantes.

Os resultados obtidos neste trabalho foram similares com os previamente reportados por Hoffmann e colaboradores (1995) que obteve valores médios de $C_{\max}$ entre 12,42 e 13,68 µg/mL; $t_{\max}$ entre 1,37 e 2,04 h e $ASC_{0-\infty}$ entre 128,8 e 129,5 µgxh/L após a administração de 500 mg de metronidazol referência e teste respectivamente.

Os resultados referentes à meia-vida de eliminação neste estudo (Referência: 7,76 h; Teste: 8,00 h) são semelhantes aos relatados por outros autores, Referência: 6,93 h e Teste: 6,60 h após a administração de 500 mg de metronidazol (Hoffmann *et al.*, 1995).

5.4. ETAPA ESTATÍSTICA DE BIOEQUIVALÊNCIA

Na Tabela 19, são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação de efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ obtidos após a administração dos produtos teste e referência aos 22 voluntários sadios.

Tabela 19 Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação de efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos após a administração oral do produto teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) aos 22 voluntários sadios

Fonte de variação	Nível Descritivo (p)		
	$\ln C_{\max}$	$\ln ASC_{0-t}$	$\ln ASC_{0-\infty}$
Produto	0,8170	0,8885	0,9507
Grupo	0,7248	0,8890	0,8015
Período	0,0491	0,8675	0,8384

$p > 0,05$: não há efeito.

As Tabelas 20, 21 e 21 apresentam, respectivamente, os resultados de análise de variância (ANOVA) em relação aos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, incluindo fonte de variação, grau de liberdade, soma dos quadrados, quadrado médio, valor de F e resíduo, obtidos após a administração dos produtos teste e referência aos 22 voluntários sadios.

Tabela 20 Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro $C_{\max}$, transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) aos 22 voluntários sadios

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Produto	1	0,0010	0,0010	0,0550	0,8170
Grupo	1	0,0115	0,0115	0,1275	0,7248
Período	1	0,0826	0,0826	4,3899	0,0491
Voluntário (Grupo)	20	1,8039	0,0902		
Resíduo	20	0,3763	0,0188		

Tabela 21 Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro ASC_{0-t} , transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) aos 22 voluntários sadios

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Produto	1	0,0001	0,0001	0,0202	0,8885
Grupo	1	0,0019	0,0019	0,0200	0,8890
Período	1	0,0001	0,0001	0,0286	0,8675
Voluntário (Grupo)	20	1,9485	0,0974		
Resíduo	20	0,0519	0,0026		

Tabela 22 Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro $ASC_{0-\infty}$, transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) aos 22 voluntários sadios

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Produto	1	0,0000	0,0000	0,0039	0,9507
Grupo	1	0,0063	0,0063	0,0649	0,8015
Período	1	0,0001	0,0001	0,0427	0,8384
Voluntário (Grupo)	20	1,9283	0,0964		
Resíduo	20	0,0597	0,0030		

Quando dois ou mais conjuntos de resultados são comparados, a análise de variância (ANOVA) é utilizada para determinar a probabilidade dos conjuntos de resultados serem idênticos ou diferentes entre os grupos. Nos ensaios de bioequivalência, a ANOVA pode avaliar a variabilidade entre os indivíduos, grupos, períodos e formulações (Shargel & Yu, 1999).

É avaliado também o efeito residual entre as formulações e a inexistência deste efeito não implica, necessariamente, que eles não existam, mas que se existiram, tem a mesma intensidade em ambas as seqüências de tratamento (ANVISA, 2003).

A observação de efeito de período ou fase não necessariamente invalida o estudo de bioequivalência, uma vez que a ANOVA verifica a igualdade dos produtos (tratamentos), independentemente da ocorrência dos mesmos. Embora a presença

de diferenças significativas entre as fases não seja desejável, ela pode ocorrer de forma aleatória e o ensaio não é descartado por isso, desde que as causas sejam devidamente investigadas e justificadas (Souza, 2005, ANVISA, 2003).

Neste caso, em relação ao parâmetro C_{max} , verificou-se a existência de efeito de período. Segundo a RDC 898/2003, 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 (Brasil, 2003b; Jackson, 1999).

O efeito de grupo ou seqüência relaciona-se com a ordem em que os produtos são administrados aos voluntários. A observação deste efeito tem pouca influência na análise dos dados e ocorre em cerca de 10% dos estudos de bioequivalência (Souza, 2005).

O último efeito avaliado é o efeito produto que consiste em indicar se existe ou não igualdade entre os produtos avaliados. A constatação deste indica que os produtos não são iguais, mas não implica que eles sejam clinicamente inequivalentes. Os produtos clinicamente equivalentes devem apresentar resultados dentro do intervalo de confiança de 90% e, assim, estar de acordo com os critérios de bioequivalência (Souza, 2005; Jackson, 1999).

No presente estudo, para os parâmetros farmacocinéticos utilizados na avaliação de bioequivalência, ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$, a ANOVA revelou valores de nível descritivo (p) acima de 0,05, indicando a ausência dos efeitos período, grupo, produto e voluntário, portanto diferença significativa entre os dois períodos do ensaio, entre os dois grupos de indivíduos, entre os produtos avaliados e entre os voluntários. Apenas para o parâmetro de C_{max} , foi detectada a presença de efeito de período na análise ANOVA, o que não invalida o estudo, uma vez que foram obtidos

valores de intervalos de confiança 90% (IC 90%), dentro dos parâmetros especificados para este tipo de teste.

Os intervalos de confiança (IC 90%) para as relações entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, na escala logarítmica, obtidos após a administração do produto teste e referência a 22 voluntários sadios são apresentados na Tabela 23.

As razões entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ transformados logaritmicamente, obtidos após a administração dos produtos teste e referência aos 22 voluntários sadios, são apresentados na Tabela 23.

Os valores do poder estatístico para os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ transformado logaritmicamente, utilizado para determinação do Intervalo de Confiança 90%, obtidos após a administração dos produtos teste e referência aos 22 voluntários sadios são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 Intervalos de confiança 90% (IC 90%), razões entre as médias e valores do poder estatístico para as relações entre os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) aos 22 voluntários sadios

	ln $C_{\max}$	ln ASC_{0-t}	ln $ASC_{0-\infty}$
IC 90%	92,2% - 106,4%	97,2% - 102,5%	97,1% - 102,8%
Razão entre as médias	0,9903	0,9978	0,9990
Poder estatístico	99,83%	100,00%	100,00%

Os intervalos de confiança 90% para os parâmetros farmacocinéticos avaliados $C_{\max}$ (92,2 – 106,4 %), ASC_{0-t} (97,2 – 102,5 %) e $ASC_{0-\infty}$ (97,1 – 102,8 %) encontraram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente, que é de 80 a 125 %, demonstrando que os produtos avaliados são bioequivalentes (Brasil, 2003b).

A avaliação da bioequivalência de diferentes produtos farmacêuticos é baseada na hipótese de que quando dois produtos farmacêuticos são equivalentes em relação à velocidade e extensão pelas quais o fármaco ou a substância ativa é absorvida e torna-se disponível no sítio de ação, pode-se considerá-los equivalentes terapêuticos (Chow & Liu, 2000).

Os estudos de bioequivalência são os substitutos para os ensaios clínicos de avaliação da equivalência terapêutica em termos de eficácia e segurança entre produtos farmacêuticos. O objetivo de um estudo de bioequivalência, então, é identificar equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas que serão utilizados de forma intercambiável, para o mesmo efeito terapêutico. Portanto, produtos farmacêuticos bioequivalentes são equivalentes terapêuticos, e podem ser utilizados intercambiavelmente (Chow & Liu, 2000).

Neste estudo, todos os parâmetros avaliados estão dentro dos limites estabelecidos pela agência regulatória brasileira (Brasil, 2003b), demonstrando que os produtos avaliados são bioequivalentes, ou seja, equivalentes terapêuticos, portanto podendo ser intercambiáveis sem prejuízo do efeito terapêutico.

6.CONCLUSÕES

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

- ✓ O método analítico desenvolvido e validado para quantificação de metronidazol em plasma humano demonstrou adequada sensibilidade, reprodutibilidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade, utilizando extração líquido - líquido simples e tempo de corrida curto, justificando a sua utilização em ensaios de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa.
- ✓ O produto teste FUNED Metronidazol, lote 07100833 produzido pela FUNED pode ser considerado bioequivalente ao produto referência Flagyl[®], lote 702824 produzido pela Aventis Pharma, portanto podem ser administrados a pacientes de forma intercambiável, sem prejuízo da eficácia terapêutica;

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOOFAZELI, R.; SHAFATI, A. Comparative bioavailability of metronidazole tablets in healthy volunteers. *Indian Drugs*. v.40, n.3, p.172-178, 2003.
2. AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, S.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* v.12, n.3, p.413-420, 1995.
3. ANDREY, R.E. Liquid Chromatography - mass Spectrometry: An introduction. England: John Wiley & Sons, LTD. 2003.
4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade e Bioequivalência, 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 10/11/2007.
5. AHFS Drug Information. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 2005.
6. ARMANDO, Y.P.; SCHRAMM, S.G.; SILVA, M.F.; KANO, E.K.; KOONO, E.E.M.; PORTA, V.; SERRA, C.H.R. Bioequivalence assay between orally disintegrating and conventional tablet formulations in healthy volunteers. *International Journal of Pharmaceutics*. v.366, p.149-153, 2009.
7. BENET, L.Z. Understanding bioequivalence testing. *Transplanting proc.*, New York, v.1, suppl. 3A, p.7S-9S, 1999.
8. BORGES, R.M.H. Introdução à validação de métodos. *Coordenação Geral de Credenciamento – CGCRE / Inmetro - Divisão de Credenciamento de Laboratórios – Dicla*. 50p., 2006. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/palestras/Renata%20Borges.pdf>. Acesso em: 07/05/2009.
9. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RDC nº 16, de 02 de março de 2007. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 de março de 2006. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária Aprova o regulamento para medicamento genérico, anexo I. Acompanha esse Regulamento o Anexo II, intitulado "Folha de rosto do processo de registro e pós-registro de medicamentos genéricos"]. 2007a.

Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25960&word=16>. Acesso em 13/01/2009.

10. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RDC nº 17, de 02 de março de 2007 *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 de março de 2007. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária Dispõe sobre o registro de medicamentos similares e dá outras providências]. 2007b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 03/02/2009.
11. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RE nº 686, de 06 de março de 2006. *Diário Oficial da União*, Brasília, 13 de março de 2006. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária Concede ao Centro, na forma do ANEXO, a Certificação em Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência de Medicamentos]. 2006a. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21143&word=biocinese>. Acesso em: 30/01/2009.
12. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RE nº 1.170 de 19 de abril de 2006 *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 de abril de 2006. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos]. 2006b. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>. Acesso em: 14/01/2009.
13. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos]. 2003a. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132>. Acesso em: 19/06/2008.
14. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 898, de 29 de maio de 2003 *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de

medicamentos]. 2003b. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=2489&word=>. Acesso em: 15/01/2009.

15. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 135, de 29 de maio de 2003 *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. 2003c. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>. Acesso em: 03/02/2009.
16. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RE nº 897, de 29 de maio de 2003 *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova publicação do "Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência", em anexo]. 2003d. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1775&word=>. Acesso em: 15/05/2009.
17. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RE nº 893, de 29 de maio de 2003 *Diário Oficial da União*, Brasília, 07 de novembro de 2003. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova a publicação do "Guia para Realização de Alterações, Inclusões, Notificações e Cancelamento Pós-Registro de Medicamentos"]. 2003e. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 15/05/2009.
18. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RDC nº 10, de 02 de janeiro de 2001 *Diário Oficial da União*, Brasília, 15 de janeiro de 2001. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos]. 2001. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>. Acesso em: 12/05/2009.
19. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RDC nº 41, de 28 de abril de 2000 *Diário Oficial da União*, Brasília, 03 de maio de 2000. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para Determinar que as entidades ou empresas que porventura pretendam cadastrar-se junto à ANVS/MS para se habilitarem à realização dos ensaios de equivalência farmacêutica, biodisponibilidade e/ou bioequivalência deverão proceder ao

- preenchimento de formulário específico disponível, via Internet, no endereço eletrônico <http://anvs.saude.gov.br>, seção da Rede Brasileira de Laboratórios, item cadastramento]. 2000. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1237&word=>. Acesso em: 30/06/2008.
20. BRASIL. Leis, decretos, etc. Lei nº9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de fevereiro de 1999. Seção 1, página 1-2, [Altera a lei nº6360 de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a sua utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências]. 1999a. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=245>. Acesso em: 12/01/2009.
21. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº391, de 09 de agosto de 1999. Diário Oficial da União, Brasília, 10 de agosto de 1999. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento Técnico para medicamentos genéricos]. 1999b. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=251&word=>. Acesso em: 12/05/2009.
22. BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº196, de 10 de outubro de 1996. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de outubro de 1996. Seção 1 [Estabelece os requisitos para realização de pesquisa clínica de produtos para saúde utilizando seres humanos]. 1996. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=663&word>. Acesso em: 06/03/2009.
23. BRISCOE, C.J.; STILES, M.R.; HAGE, D.S. System suitability in bioanalytical LC/MS/MS. *J. Pharm. Biom. Anal.* v.44, p.484-491, 2007.
24. BRIOSCHI, T.M.L.S. Avaliação de bioequivalência de comprimidos contendo 10 mg de cloridrato de ciclobenzaprina. São Paulo, 2006, 194p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
25. 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, 220p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
26. CAUSON, R. Validation of Chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *Journal Chromatography B: Biom. Appl.*, v.689, n.1, p.175-180, 1997.
 27. CHEN, M.L.; SHAH, V.; PATNAIK, R.; ADAMS, W.; HUSSAIN, A.; CORNNER, D.; MEHTA, M.; MALINOWSKI, H.; LAZOR, J.; HUANG, S.M.; HARE, D.; LESKO, L.; SPORN, D.; WILLIAMS, R. Bioavailability and bioequivalence: an FDA regulatory overview. *Pharmaceutical Research*, v.18, n.12, p.1645-1650, 2001.
 28. CHOW, S.C.; LIU, J.P. Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies, 2.ed. New York: Marcel Dekker, p.1-30, 2000.
 29. CONSIGLIERI, V.O. Avaliação da qualidade biofarmacêutica da ampicilina sob as formas de suspensões e cápsulas: ensaios *in vitro* e *in vivo* (bioequivalência). São Paulo, 1996, 137p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
 30. CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, decaimentos experimental e critérios de avaliação. *Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.36, n.1, p.13-21, 2000.
 31. DE HOFFMAN, E. Tandem mass spectrometry: a primer. *Journal Mass Spectrometry*. v.31, p.129-137, 1995.
 32. DIAS, C.R.C. Medicamentos genéricos no Brasil de 1999 a 2002: Análise da legislação, aspectos conjunturais e políticos. São Paulo, 2003, 109p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública - USP).
 33. DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicine in the terrestrial environment. *Trends Analytical Chemistry*. v.26, n.6, p.637-646, 2007.
 34. DICIONÁRIO Terapêutico Guanabara. Ed 2008/2009. Rio de Janeiro, 2008.

35. DIPIRO, J.T.; TALBERT, R.L.; YEE, G.C.; MATZKE, G.R.; WELLS, B.G.; POSEY, L.M. Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach, 6.ed. The MacGrall Hill Companies, 2005.
36. DRUG Information Handbook International. Lexi-Comp Inc., 2005.
37. EUROPEAN MEDICINE AGENCY. Pre-authorization. Evaluation of medicines for human use. Committee for proprietary medical products. Draft for Guideline on the investigation of bioequivalence. London: 2008. 29p. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enrev1.pdf>. Acesso em: 02/02/2009.
38. EUROPEAN MEDICINE AGENCY. European Agency for the Evaluation of Medical Products. Evaluation of medicines for human use. Committee for proprietary medical products. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. London: 2002. 18p. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198en.pdf>. Acesso em: 03/02/2009.
39. FISCHBACH, L.A.; BRAVO, L.E.; ZARAM, G.R.; BRAVO, J.C.; OJHA, P.R.; PRIEST, E.L.; COLLAZOS, T.; CASABON, L.A.; GUERRERO, L.Z.; SINGH, P.K.; CORREA, P. A randomized clinical trial to determine efficacy of regimens containing clarithromycin, metronidazole and amoxicillin among histologic subgroups for *Helicobacter pylori* eradication in a developing country. *Helicobacter*, v.14, p.100-108, 2009.
40. FRASELLE, S.; DEROP, V.; DEGROODT, J-M.; LOCO, J.V. Validation of a method for detection and confirmation of nitroimidazoles and the corresponding hydroxyl metabolites in pig plasma by high performance liquid-chromatography – tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry Acta*, v.586, p.383-393, 2007.
41. FREDRICKS, D.N.; FIEDLER, T.L.; THOMAS, K.K.; MITCHELL, C.M.; MARAZZO, J.M. Changes in vaginal bacterial concentrations with metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assed by quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. v.47, n.3, p.721-726, 2009.

42. GALMIER, M.J.; FRASEY, A.M.; BASTIDE, M.; BEYSSAC, E.; PETIT, J.; AIACHE, J.M.; LARTIGUE-MATTEI C. Simple and sensitive method for determination of metronidazole in human serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. v.720, p.239-243, 1998.
43. GATCHEV, E.; BRATER, M.; DE MEY, C. Bioequivalence of a novel oral metronidazole formulation. *Arzneimittelforschung*, v. 56, n.8, p.612-616, 2006.
44. GOODMAN & GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro, RJ, pp. 1506, 2001.
45. HAN, J.; ZENG, H.J.; TANG, H.F. Determination of metronidazole, chlorhexidine acetate and miconazole nitrate in Kangtaizuo washing solution by HPLC. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*. v.17, p.9-11, 1997.
46. HARRIS, D.C. (1998). Quantitative Chemical Analysis. New York: W. H. Freeman and Company.
47. HOFFMANN, C.; FOCKE, N.; FRANKE, G.; ZSCHIESCHE, M.; SIEGMUND, W. Comparative bioavailability of metronidazole formulation (Vagimid) after oral and vaginal administration. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 33, n.4, p.232-239, 1995.
48. IDKAIDEK, N.M.; NAJIB, N.M. Enhancement of oral absorption of metronidazole suspensions in humans. *European Journal Pharmaceutical Therapy*, v.50, p.213-216, 2000.
49. INFARMED. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. Medicamentos uso humano. Avaliação técnico científica. Avaliação de Biodisponibilidade/Bioequivalência (BD/BE). 2009. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AVALIACAO_TECNICO_CIENTIFICA/AVALIACAO_DISPONIBILIDADE_EQUIVALENCIA. Acesso em: 17/05/2009.
50. JACKSON, A.J. ed. Generics and bioequivalence. Boca Raton: CRC Press, 1999, p. 49-100.
51. JACKSON, A.J.; ROBBIE, G.; MARROUM, P. Metabolites and bioequivalence. *Clinical Pharmacokinetics*. v. 43, n.10, p.655-672, 2004.

52. JAIN, P.; JAIN, S.; PRASAD, K.N.; JAIN, S.K.; VYAS, S.P. Polyelectrolyte coated multilayered liposomes (nanocapsules) for the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Molecular Pharmaceuticals*. v.6, n.2, p.593-603, 2009.
53. JESSA, M.J.; BARRETT, D.A.; SHAW, P.N.; SPILLER, R.C. Rapid and selective high-performance liquid chromatographic method for the determination of metronidazole and its active metabolite in human plasma, saliva and gastric juice. *Journal of Chromatography B*, v.677, p.374-379, 1996.
54. KANO, E.K. Avaliação de diferentes cronogramas de coletas de amostras biológicas em estudos de bioequivalência e análise da influência do teor de fármaco sobre resultados destes estudos. São Paulo, 2008, 278p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
55. KANO, E.K. Avaliação biofarmacêutica de formulações contendo cefadroxil: estudos *in vitro* e *in vivo* (bioequivalência). São Paulo, 2002, 233p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
56. KENAWY, E.-R.; AL-DEYAB, S.S.; SHAKER, N.O.; EL-SADEK, B.M.; KHATTAB, A.H.B. Synthesis and Antimicrobial Activity of Metronidazole Containing Polymer and Copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*, v.113, p.818–826, 2009.
57. KIM, S.Y.; JOO, S.Y.; LEE, H.S.; CHUNG, I.-S.; YOO, Y.-J.; MERRELL, D.S.; CHA, J.-H. Genetic analysis *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss of functional rdXA. *The J. Antiob.* v.62, p.43-50, 2009.
58. KOONO, E.E.M. Avaliação de bioequivalência de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol. São Paulo, 2005, 178p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
59. LACHMAN, L; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. The theory and practice of industrial pharmacy. 3ed. Philadelphia: 1986, p.171-192.
60. LAMP, K.C.; FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; LACY, M.K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clinical Pharmacokinetics*. v.36, n.5, p.353-373, 1999.

61. LATHA, S.; SELVAMANI, P.; KUMAR, C.S.; SHARAVANAN, P.; SUGANYA, P.; BENIWAL, V.S.; RAO, P.R. Formulation development and evaluation of metronidazole magnetic nanosuspension as a magnetic – targeted and polymeric – controlled drug delivered system. *Journal Magnetism Magnetic Mat.* v.321, p.1580-1585, 2009.
62. LEITSCH, D.; KOLARICH, D.; BINDER, M.; STADLMANN, J.; ALTMANN, F.; DUCHÊNE, M. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Molecular Microbiology.* v.72, n.2, p.518-536, 2009.
63. MARZO, A.; MONTI, N.C. Acceptable and unacceptable procedures in bioavailability and bioequivalence trials. *Pharmaceutical Research.* v.38, n.5, p.401-404, 1998.
64. MATTILA, J.; MANNISTO, P.T.; MANTYLA, R.; NYKANEN, S.; LAMMINSIVU, U. Comparative pharmacokinetics of metronidazole and tinidazole as influenced by administration route. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* v.23, n.5), p.721-725, 1983.
65. MENELAOU, A.; SOMOGYI, A.A.; BARCLAY, M.L.; BOCHNER, F. Simultaneous quantification of amoxicillin and metronidazole in plasma using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Chromatography B,* v. 731, p.261-266, 1999.
66. MIDHA, K.K.; MCGILVERAY, I.J.; COOPER, J.K. Determination of therapeutic levels of metronidazole in plasma by gas-liquid Chromatography. *Journal of Chromatography,* v.87, p.491-497, 1973.
67. MODA, T. L.; TORRES, L. G.; CARRARA, A. E.; ANDRICOPULO, A. D. Bioinformatics. 2008, 24, 2270. Disponível em: <http://miro.ifsc.usp.br/pkdb/resume.php?mid=NzYx>. Acesso em: 01/12/2008.
68. MOTOLA, D.; PONTI, F.D. Generic versus brand-name medicinal products: are they really interchangeable? *Digestive and Liver Disease.* v.38, p.560-562, 2006.
69. MUSTOFA, S.S.; SANTOSO, B. Pharmacokinetics of metronidazole in saliva. *International Journal of Clinical Pharmacology.* v.29, n.12, p. 474-478, 1991.

70. NASCIMENTO, T.G.; OLIVEIRA, E.J.; MACEDO, R.O. Simultaneous determination of ranitine and metronidazole in human plasma using high performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.37, p. 777-783, 2005.
71. PAL, D.; BARNEJEE, S.; CUI, J.; SCHWARTZ, A.; GHOSH, S.K.; SAMUELSON, J. Giardia, entamoeba e trichomonas enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. v.53, n.2, p.458-464, 2009.
72. PEARCE, G.A.; MCLACHLAN, A.G.; RAMZAM, I. Bioequivalence: how, why and what does it really mean? *Journal of Pharmacy Practice and Research*, v.34, n.3, p.195-200, 2004.
73. PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. LC-MS identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. *Trends Analytical Chemistry*. v.26, n.6, p.486-493, 2007.
74. PÓL, j.; HYÖTYLÄINEN, T. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. v.391, p.21-31, 2008.
75. POLLAK, P.T. A liquid chromatography assay for the study of serum and gastric juice metronidazole concentration in the treatment of *Helicobacter pylori*. *Therapeutic Drug Monitoring*. v.18, n.6, p.678-687, 1996.
76. PORTA, V.; SCHRAMM, S.G.; KANO, E.K.; ARMANDO, Y.P.; FUKUDA, K.; SERRA, C.H.R. HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.46, p.143-147, 2008.
77. PORTA, V. Avaliação de bioequivalência de formulações do mercado nacional contendo fluconazol. São Paulo, 1999, 200p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
78. PRÓ-GENÉRICOS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS. História dos medicamentos genéricos no Brasil. São Paulo: pró-genérico. Disponível em: <http://www.progenericos.org.br/>. Acesso em: 13/01/2009.

79. QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIN, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, São Paulo, v.24, n.1, p.68-76, 2001.
80. RHODES, C.T. Some observations on current and possible future developments in bioequivalence testing. *Drug Development and Industrial Pharm.* v.25, n.4, p. 559-562, 1999.
81. RITSCHER, W.A. Handbook of basic pharmacokinetics. 4.ed. Hamilton: Drug Intelligence, 1992.
82. ROLIM, C.M.B. Bioequivalência de comprimidos de nimesulida do mercado nacional. São Paulo, 2001, 143p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
83. ROMEU, G.A. Avaliação de bioequivalência de formulações do mercado nacional contendo doxiciclina. São Paulo, 2002, 165p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
84. ROSANDIC, M.; PILÁS, V.; BEVANDA, M.; FALISEVAC, V.; KORAC, B. Quantification of *Helicobacter pylori* resistance in functional and organic dyspepsia. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapy*. v.27; p.353-355, 2002.
85. SAGAN, C.; SALVADOR, A.; DUBREUIL, D.; POULET, P.P.; DUFFAUT, D.; BRUMPT, I. Simultaneous Determination of Metronidazole and Spiramycin I in Human Plasma, Saliva and Gingival Crevicular Fluid by LC – MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*., v.38, p. 298-306, 2005.
86. SAINT-MARCOUX, F.; SAUVAGE, F.-L.; MARQUET, P. Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. v.388, p.1327-1349, 2007.
87. SAMPAIO, M.R.M. Avaliação de bioequivalência de formulações contendo lorazepam através de método bioanalítico utilizando a cromatografia líquida acoplada ao sistema de detecção por espectrometria de massa. São Paulo, 2007, 159p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

88. SERRA, C.H.R. Avaliação de biofarmacotécnica de comprimidos contendo cefalexina: cinética de dissolução e bioequivalência. São Paulo, 1998, 205p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
89. SHAH, V.P. The history of bioanalytical method validation and regulation: evolution of guidance document on bioanalytical methods validation. *The AAPS Journal*. v.9, n.1, p. E43-E47, 2007.
90. SHARGEL, L.; YU, A.B.C. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 4.ed. London: Prentice-Hall International, 1999.
91. SPÉNARD, J.; AUMAIS, C.; MASSICOTTE, J.; BRUNET, J-S.; TREMBLAY, C.; GRACE, M.; LEFEBVRE, M. Effects of food and formulation on the relative bioavailability of bismuth biskalcitrate, metronidazole, and tetracycline given for *Helicobacter pylori* eradication. *British Journal of Clinical Pharmacy*. v.60, n.4, p.374-377, 2005.
92. SPRANDEL, K.A.; SCHRIEVER, C.A.; PENDLAND, S.L.; QUINN, J.P.; GOTFRIED, M.H.; HACKETT, S.; GRAHAN, M.B.; DANZIGER, L.H.; RODVOLD, K.A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous levofloxacin at 750 milligrams and various doses of metronidazole in healthy adult subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.48, n.12, p.4597-4605, 2004.
93. 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, 290p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
94. STORPIRTIS, S.; BAALDUÍNO, J.; BUENO, M.M.; FREITAS, S.T.; GATTO, R.C.; LIMA FILHO, P.; MARCOLONGO, R.; VALENTE, V.R. Aspectos técnicos relativos ao registro de medicamentos genéricos no Brasil. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/profissionais/artigos/registro_med.pdf. Acesso em: 28/01/2008.
95. STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F.S.; VILANOVA, C.M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambiabilidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, 2004. Disponível em:

- http://www.anvisa.gov.br/divulga/artigos/genericos_referencia.pdf. Acesso em: 28/01/2008.
96. STORPIRTIS, S. Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos. São Paulo, 1999, 78p.
 97. UEKI, N; MYAKE, K.; KUSUNOKI, M.; SHINDO, T.; KAWAGOE, T.; FUTAGAMI, S.; TSUKUI, T.; INAGAKI, H.; SAKAMOTO, C. Impact of quadruple regimen of claritromycin added to metronidazole – containing triple therapy against *Helicobacter pylori* infection following clarithromycin containing triple therapy failure. *Helicobacter*. v.14, p.91-99, 2009.
 98. UNITED STATES. National archives and records service. Office of federal register. Code of Federal regulations Title 21: Food and drug Administration. Subchapter D: Drugs for human use. Part 320. Bioavailability and bioequivalence requirements. 2004a. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?CFRPart=320&showFR=1>. Acesso em: 03/02/2009.
 99. UNITED STATES. Food and drug administration. Center for drug evaluation and research. Drug specific information. *Flagyl labeling*. 2004b. 7p. Disponível em: http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/12623slr059_flagyl_lbl.pdf. Acesso em: 03/02/2009.
 100. UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>. Acesso em: 17/05/2009.
 101. WELLING, P.G.; TSE, F.L.S.; DIGHE, S.V. Pharmaceutical bioequivalence. 1ed. New York, v.48, 1991.
 102. WIBAWA, J.I.D.; SHAW, P.N.; BARETT, D.A. Quantification of metronidazole in small-volume biological samples using narrow-bore high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.761, p. 213-219, 2001.
 103. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparation. 40 Report. Geneva: WHO, 478p,2006.

104. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparation. 34 Report. Geneva: WHO, 194p,1996.
105. XING, J.; XIE, C.; LOU, H. Recent applications of liquid chromatography – mass spectrometry in natural products bioanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical. Analysis*. v.44, p.368-378, 2007.
106. XU, R.N.; FAN, L.; RIESER, M.J.; EL-SHOUBARGY, T.A. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalyses by LC-MS/MS. *of Pharmaceutical and Biomedical. Analysis*. v.44, p.342-355, 2007.
107. YEUNG, P.K.F.; LITTLE, R.; JIANG, Y.; BUCKLEY, S.J.; POLLAK, P.T.; KAPOOR, H.; VELDHUYSEN VAN ZANTEN, S.J.O. A simple high performance liquid chromatography assay for simultaneous determination of omeprazole and metronidazole in human plasma and gastric fluid. *of Pharmaceutical and Biomedical. Analysis*. v.17, p.1393-1398, 1998.

8. ANEXOS

ANEXO A

APROVAÇÃO DOS COMITÊS DE ÉTICA DA UEM E FCF/USP

Universidade Estadual de Maringá

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Registrado na CONEP em 10/02/1996

CAAE N° 0002/2008

PARECER N° 002/2008

Pesquisador(a) Responsável: Josélia Larger Manfio

Interessada: Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos Ltda.

Título do projeto: Avaliação de biodisponibilidade relativa de comprimidos revestidos contendo 250 mg de Metronidazol produzidas por Fundação Ezequiel Dias – FUNED (Metronidazol – FUNED) e comprimidos revestidos contendo 250 mg de Metronidazol produzidos por Sanofi Aventis (Flagyl®) – etapa clínica.

Considerações:

O presente trabalho trata-se de um projeto de pesquisa a ser desenvolvido no município de Toledo-PR, pelo Centro de Estudos Biofarmacêuticos Ltda. Biocinese. O objetivo do trabalho é *avaliar comparativamente a biodisponibilidade de dois produtos contendo Metronidazol 250 mg a fim de determinar se são bioequivalentes*. Os produtos a serem submetidos ao estudo serão o Flagyl® 250 mg comprimido revestido produzido por Sanofi Aventis (formulação referência) e o Metronidazol FUNED 250 mg comprimido revestido produzido por Fundação Ezequiel Dias – FUNED (formulação teste). Um dos benefícios esperados é o desenvolvimento de medicamentos genéricos no Brasil, os quais são geralmente até 40% mais baratos que os medicamentos de referência.

Para o desenvolvimento do projeto deverão participar 24 indivíduos voluntários maiores de 18 anos, sendo 12 homens e 12 mulheres, os quais serão recrutados através de anúncio em forma de panfletos explicativos e cartazes a serem distribuídos no município. Os panfletos e cartazes foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Trata-se de um estudo aberto, aleatorizado, cruzado, com 2 tratamentos e 2 períodos. As formulações serão administradas em dose única por via oral seguidas de coletas de sangue. Os voluntários serão atendidos no Hospital HCO (Centro Hospitalar do Oeste) ou na HOESP (Associação Beneficente de Saúde do Oeste do Paraná). A condução da etapa analítica será realizada no Laboratório Analítico do laboratório de Biofarmacotécnica – BIOFAR da Universidade de São Paulo.

Os voluntários receberão um ressarcimento relativo às despesas e tempo despendidos referente à internação, coleta externa, exames pós-estudo e alta do estudo. Além disso, durante um período de 6 meses, estarão sob cobertura de um seguro de vida.

A documentação apresentada ainda inclui: folha de rosto preenchida; termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE); quadro orçamentário com gastos previstos de R\$88.144,88; cronograma de execução com início previsto para março/2008 e término em maio/2008 e as seguintes declarações e contrato:

1. Declaração da pesquisadora de que o Biocinese realiza estudos de bioequivalência e biodisponibilidade relativa de medicamentos;
2. Declaração de que a pesquisadora principal recebe salário mensal sobre as atividades desempenhadas no Biocinese, independente da pesquisa;
3. Declaração do responsável pela Garantia da Qualidade do Biocinese;
4. Declaração de que a pesquisadora principal é funcionária do Biocinese e exerce o cargo de diretora;
5. Declaração da Associação Beneficente de Saúde do Oeste do Paraná, disponibilizando uma área para internação dos sujeitos da pesquisa;
6. Declaração do Centro Hospitalar do Oeste, disponibilizando uma área para internação dos sujeitos da pesquisa;
7. Declaração do Laboratório de Análises Clínicas Labclínic, informando a infra-estrutura do laboratório;
8. Contrato de prestação de serviço de seguro, sendo a contratada a pessoa jurídica de direito privado, O.J. Corretora de Seguros S/C Ltda.

Considerando as adequações do projeto à Res. 196/96, somos de parecer favorável à aprovação do trabalho, recomendando que sejam observados os prazos mínimos para a realização de novas pesquisas com os sujeitos recrutados, no sentido de evitar conflito de interesses.

Situação: APROVADO

Universidade Estadual de Maringá

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Registrado na CONEP em 10/02/1998

CONEP: () para registro () para análise e parecer Data: 15/02/2008

O pesquisador deverá apresentar Relatório Final para este Comitê em: 30/06/2008

O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução nº 196/96 e complementares do CNS/MS, na 146ª reunião do COPEP em 15/02/2008.

Prof. Dra. Ieda Harumi Higarashi
Presidente do COPEP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº70 /2008

São Paulo, 05 de agosto de 2008.

Ilmo(a). Sr(a).

Marina de Freitas Silva

Orientador Prof. Cristina Helena dos Reis Serra

FBF

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 04 de agosto de 2008, **tomou ciência** do projeto "Determinação dos parâmetros farmacocinéticos e da biodisponibilidade relativa do metronidazol a partir de comprimidos revestidos" (Protocolo CEP nº 479).

A pesquisadora deverá utilizar o parecer de aprovação do CEP da Universidade de Maringá para fins de pós-graduação e publicação da sua dissertação, desde que seus nomes estejam incluídos como colaboradores do projeto original.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Avaliação de Biodisponibilidade Relativa de comprimidos revestidos contendo 250 mg de Metronidazol produzidas por Fundação Ezequiel Dias – Funed (Metronidazol Funed) e comprimidos revestidos contendo 250 mg de metronidazol produzidos por Sanofi Aventis (Flagyl®).**

Você está sendo convidado a participar de um Estudo de Biodisponibilidade Comparativa entre uma Formulação de Metronidazol 250 mg comprimido revestido produzida pela Fundação Ezequiel Dias - FUNED e o Medicamento Referência Flagyl® 250 mg comprimido revestido produzido por Sanofi Aventis. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Metronidazol é indicado no tratamento de infecções por amebas, giárdias e tricomonas.

Medicamento referência define um produto inovador, ou seja, pioneiro no tratamento de determinada doença, desenvolvido e testado por determinado laboratório.

Medicamentos genéricos são produzidos com a mesma composição do medicamento referência, não possui marca comercial e são vendidos através do nome químico da substância ativa (é a substância que efetivamente cura).

Para poder ser comercializado, o medicamento genérico passa por um teste em que se comprova que no sangue esse remédio tem o mesmo comportamento do medicamento referência.

Este é o tipo de teste que você está sendo convidado a participar, ou seja, teste de **BIOEQUIVALÊNCIA**.

1. OBJETIVOS DO ESTUDO

O objetivo desta pesquisa é verificar se o medicamento Metronidazol 250 mg comprimido revestido produzido pela Fundação Ezequiel Dias - FUNED é bioequivalente ao medicamento Referência Flagyl® 250 mg comprimido revestido produzido por Sanofi Aventis.

2. PROCEDIMENTOS COM OS VOLUNTÁRIOS

Você deverá comparecer ao Hospital HCO (Centro Hospitalar do Oeste) ou HOESP (Associação Beneficente de Saúde do Oeste do Paraná) às 19:00 horas do dia marcado. Antes da internação, será realizada uma consulta médica e as mulheres também farão exame para gravidez (urina ou sangue). Após todos os seus pertences serão guardados e você receberá o pijama da BIOCINESE.

O jantar será servido 10:00 horas antes da administração da medicação e será iniciado o período de jejum.

A partir das 06:00 da manhã será colocada uma agulha na sua veia a fim de introduzir um pequeno cateter (tubo) de silicone e realiza-se a primeira coleta de sangue, cerca de 8 mL (aproximadamente ½ colher de sopa) e verificaremos sua pressão, pulso e temperatura.

Às 07:00 da manhã será administrada 1 (um) comprimido de Metronidazol 250 mg juntamente com 200 mL de água e após serão iniciadas as coletas de aproximadamente 8 mL de sangue (aproximadamente ½ colher de sopa) nos seguintes horários: 0:20; 0:40; 1:00; 1:20; 1:40; 2:00; 2:30; 3:00; 4:00; 6:00; 8:00 e 12:00 horas, após a administração do medicamento. Sua pressão, pulso e da temperatura, serão verificados nos seguintes horários: entre 30 e 60 minutos antes da administração e a partir de 0:30; 4:30 e 12:00 horas após a administração.

Você receberá as seguintes refeições: almoço 4:00 horas após a administração e lanche 9:00 horas após a administração.

Após a última coleta de sangue e verificação da sua pressão, pulso e temperatura o médico irá lhe examinar e você receberá alta.

Você ainda deverá comparecer ao hospital HCO ou HOESP para realizar outras 3 (três) coletas de sangue e verificação de pressão, pulso e temperatura nos seguintes tempos 24:00; 36:00 e 48:00 após a administração do medicamento.

A próxima internação ocorrerá no dia marcado às 19:00 horas, com os mesmos procedimentos citados acima.

Após sua alta do segundo período do estudo você deverá retornar ao Laboratório LabClinic para repetição dos exames laboratoriais e também retornará à BIOCINESE para realização do eletrocardiograma, avaliação médica e alta do estudo.

3. POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

Após a tomada de uma única dose de Metronidazol há uma pequena probabilidade de haver efeitos colaterais, ou indesejados, entretanto, você deve saber quais são eles.

Mais comumente pode-se sentir: alterações nos batimentos do coração, confusão mental, falta de coordenação nos movimentos, tonturas, fraqueza, febre, dor de cabeça, insônia, irritação e ansiedade. Na pele podem aparecer vermelhões e coceiras. Sintomas de enjôo, falta de apetite, dor de barriga, diarreia, intestino preso, alterações no paladar, escurecimento da urina, incontinência urinária, vaginite, cistite e alterações nas células do sangue também podem ocorrer.

Durante o estudo você ficará algumas horas em jejum o que pode causar sintomas parecidos com os efeitos indesejados causados pelo medicamento.

No local da coleta de sangue, pode aparecer uma mancha roxa após a retirada da agulha, mas em geral o próprio organismo elimina esta mancha. Você será avaliado por médicos antes, durante e após o estudo.

4. BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES

A sua participação neste estudo não tem objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico, entretanto você será beneficiado com o desenvolvimento de medicamentos genéricos no Brasil. Os medicamentos genéricos são geralmente até 40% mais baratos que os medicamentos referência (de marca).

5. FORMA DE ASSISTÊNCIA

Você estará sob supervisão de uma equipe incluindo, médicos, enfermeiras, farmacêuticos e técnicos de enfermagem durante todo o período de internação. Após a alta, serão realizados novamente exames

clínicos, laboratoriais e eletrocardiograma para garantir que o estudo não causou nenhuma mudança na sua saúde.

6. RESSARCIMENTO

De acordo com valores previamente estabelecidos você receberá um ressarcimento relativo às despesas e tempo despendido referente à internação, coleta externa, exames pós-estudo e alta do estudo. Caso desista, ou seja, dispensado antes do estudo ser finalizado você receberá, proporcionalmente ao tempo despendido, no final do estudo. Entende-se também que o não comparecimento para a primeira internação não dá direito ao ressarcimento.

Ainda devem ser previstas eventuais visitas posteriores para acompanhamento dos eventos adversos. O ressarcimento destas despesas já está incluído no valor previamente estabelecido.

7. FORMAS DE INDENIZAÇÃO

Durante o período de internação e após por um período de 6 meses você terá um seguro de vida pela empresa **VIP SEGUROS**. Caso sofra algum prejuízo à sua saúde em decorrência direta dos procedimentos realizados no internamento, você receberá tratamento, sem qualquer custo, proporcionado pela **BIOCINESE**.

No caso de algum efeito colateral ou adverso com relação ao medicamento, o laboratório patrocinador (**Fundação Ezequiel Dias – Funed**) é responsável pelo ocorrido. Não haverá, no entanto, qualquer compensação de ordem financeira, a não ser das condições previstas no seu seguro.

8. PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

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

É importante que você obtenha todas as informações e esclarecimentos necessários para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido estudo.

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

Você será informado sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo, e será prestado qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação. A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da **BIOCINESE**.

Após o estudo, você não poderá doar sangue e participar de novos estudos que envolvam a coleta de sangue por pelo menos 3 (três) meses (90 dias).

9. GARANTIA DE SIGILO E PRIVACIDADE

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

Contudo, o monitor do estudo, membros do Comitê de Ética e Pesquisa Clínica ou autoridades dos órgãos governamentais envolvidos na fiscalização e acompanhamento do estudo (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) terão direito de acessar os registros originais de dados clínicos, coletadas durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela lei e regulamentações aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto violar a condição de que tais informações são confidenciais. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você estará também, autorizando tal acesso, mesmo se você se retirar do Estudo.

10. MANIPULAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após as coletas, o sangue será dividido em duas partes, uma parte para análises e outra parte para retenção (reserva) na unidade analítica do BIOFAR. As amostras da reserva serão utilizadas somente nos casos de necessidade de novas análises por pedido do patrocinador desta pesquisa ou da ANVISA. O descarte da parte do sangue reserva, será realizada após o registro do medicamento na ANVISA ou quando autorizado pelo Patrocinador.

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

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

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

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

Ao Assinar este Termo de Consentimento eu não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter participando deste Estudo.

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG nº _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário nesta pesquisa, de responsabilidade da PESQUISADORA PRINCIPAL MSA. JOSÉLIA LARGER MANFIO.

CONTROLE INTERNO BIOCINESE		Nº do Estudo ____ / ____ Nº do Voluntário _____			
NOME DO VOLUNTÁRIO		DATA		Assinatura	
TESTEMUNHA		DATA		Assinatura	
MÉDICO		DATA		Assinatura	

Obs. Favor rubricar todas as páginas do TCLE.

TELEFONES PARA CONTATO

Centro de Estudos Biofarmacêuticos (BIOCINESE): (45) 3252-0096; (45) 2103-1900 e (45) 9927-7422

Pesquisador Principal: Msa. Josélia Larger Manfio

Endereço: Av. Cirne Lima, 1541, Vila Becker, CEP 85902-400, Toledo PR.

Enfermeira: Adriane Gomes

Farmacêutica: Dalane Loss Vieira

Responsável Etapa Clínica: Dr. Eduardo Gomes: (45) 9927-7422

Investigadora Responsável: Drª. Naura Tonin Angonese: (45) 9927-7422

Hospital HCO: (45) 3379-7700

Hospital HOESP: (45) 2103-2000

CEP/FAG: (45) 3321-3871

ANEXO C

CURVAS DE DECAIMENTO PLASMÁTICOS E PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS INDIVIDUAIS

Voluntário 1

Tabela AC 1 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 1.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED	NQ	6,13	4,18	3,96	3,74	3,59	3,62	3,25	3,33	3,05	2,42	1,81	1,46	0,48	0,14	NQ
Metronidazol																
Flagyl®	NQ	0,36	5,19	4,70	4,46	3,94	3,40	3,11	3,15	2,76	2,15	1,74	1,14	0,48	0,14	0,05

NQ = não-quantificável

Figura AC 1 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 1.

Tabela AC 2 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 1.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg×h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg×h/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	0,33	6,13	45,94	47,45	7,20	5,27	4,57
Flagyl®	0,67	5,19	42,10	42,65	7,48	5,86	3,95

Voluntário 2

Tabela AC 3 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 2.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	1,05	3,47	3,57	3,63	4,51	4,07	4,05	3,98	3,93	3,03	2,61	1,88	0,78	0,26	0,10
Flagyl [®]	NQ	0,06	0,23	0,76	1,11	1,46	2,17	2,42	2,56	4,38	3,40	2,87	2,14	0,88	0,29	0,12

NQ = não-quantificável

Figura AC 2 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 2.

Tabela AC 4 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 2.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,67	4,51	60,07	61,31	8,26	4,08	5,14
Flagyl [®]	4,00	4,38	59,19	60,57	8,23	4,13	5,10

Voluntário 3

Tabela AC 5 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 3.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED	NQ	1,18	2,88	3,00	4,06	4,73	4,67	4,42	4,22	3,94	3,23	2,80	2,14	1,07	0,51	0,25
Metronidazol																
Flagyl®	NQ	0,34	7,49	4,98	4,83	4,66	4,37	4,24	4,04	3,83	3,07	2,62	1,96	1,09	0,44	0,21

NQ = não-quantificável

Figura AC 3 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 3.

Tabela AC 6 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 3.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µgxh/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,67	4,73	70,98	75,10	11,42	3,33	4,56
Flagyl®	0,67	7,49	69,46	72,48	10,04	3,45	5,00

Voluntário 4

Tabela AC 7 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 4.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED	NQ	0,19	2,34	3,45	2,80	2,90	2,69	3,07	3,02	3,55	2,80	2,48	1,90	0,99	0,48	0,20
Metronidazol																
Flagyl®	NQ	0,05	0,35	1,34	1,08	1,14	1,12	1,57	1,92	3,46	3,36	2,74	2,06	1,02	0,44	0,20

NQ = não-quantificável

Figura AC 4 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 4.

Tabela AC 8 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 4.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µgxh/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	4,00	3,55	61,26	64,29	10,42	3,89	4,28
Flagyl®	4,00	3,46	59,31	62,31	10,30	4,01	4,19

Voluntário 6

Tabela AC 9 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 6.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	3,05	6,22	5,47	5,09	4,66	4,68	4,54	4,61	4,11	3,22	2,95	2,14	0,96	0,41	0,21
Flagyl®	NQ	2,45	6,56	4,94	4,72	4,72	4,74	4,43	4,18	3,81	2,99	2,73	2,02	0,97	0,35	0,16

NQ = não-quantificável

Figura AC 5 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 6.

Tabela AC 10 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 6.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	0,67	6,22	72,16	75,42	10,86	3,31	4,81
Flagyl®	0,67	6,56	67,92	70,02	9,19	3,57	5,28

Voluntário 7

Tabela AC 11 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 7.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	0,37	7,96	7,16	4,94	4,44	4,24	3,99	3,87	3,57	3,05	2,55	1,80	0,81	0,29	0,13
Flagyl®	NQ	0,07	0,29	3,77	4,34	3,00	3,11	4,81	4,66	4,05	3,40	2,87	2,13	0,92	0,35	0,13

NQ = não-quantificável

Figura AC 6 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 7.

Tabela AC 12 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 7.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg×h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg×h/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	0,67	7,96	62,36	64,02	9,02	3,91	4,92
Flagyl®	2,50	4,81	65,65	67,21	8,43	3,72	5,53

Voluntário 8

Tabela AC 13 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 8.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	6,89	7,52	6,12	5,67	5,52	5,26	5,14	4,91	4,36	3,65	2,94	2,16	0,89	0,31	0,12
Flagyl [®]	NQ	1,27	7,64	5,79	5,78	5,90	5,68	5,36	5,10	4,71	3,74	3,16	2,21	0,88	0,28	0,09

NQ = não-quantificável

Figura AC 7 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 8.

Tabela AC 14 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 8.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-1} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	0,67	7,52	74,07	75,58	8,43	3,31	6,21
Flagyl [®]	0,67	7,64	73,85	74,82	7,36	3,34	7,04

Voluntário 9

Tabela AC 15 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 9.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	3,15	4,10	5,80	4,77	4,42	4,34	4,33	4,03	3,59	3,09	2,55	1,68	0,70	0,22	0,09
Flagyl®	NQ	4,37	5,49	5,36	5,10	4,88	4,86	4,61	4,27	4,15	3,26	2,70	1,77	0,73	0,25	0,10

NQ = não-quantificável

Figura AC 8 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 9.

Tabela AC 16 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 9.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,00	5,80	58,66	59,71	8,11	4,19	5,10
Flagyl®	0,67	5,49	63,21	64,33	8,17	3,89	5,46

Voluntário 10

Tabela AC 17 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 10.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	7,87	5,84	5,24	4,87	4,62	4,48	4,23	3,79	3,65	2,74	2,40	1,61	0,62	0,17	NQ
Flagyl®	NQ	9,84	6,30	5,36	5,25	4,81	4,60	4,34	4,20	3,77	2,86	2,40	1,69	0,62	0,18	NQ

NQ = não-quantificável

Figura AC 9 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 10.

Tabela AC 18 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 10.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	0,33	7,87	55,73	57,54	7,39	4,34	5,40
Flagyl®	0,33	9,84	58,30	60,26	7,47	4,15	5,59

Voluntário 11

Tabela AC 19 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 11.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	0,71	3,33	3,79	4,19	4,37	5,26	4,47	4,25	3,96	3,36	2,76	2,04	0,85	0,31	0,12
Flagyl®	Nq	1,22	7,31	5,54	5,21	4,83	4,64	4,39	4,07	3,96	3,31	2,74	2,05	0,93	0,32	0,11

NQ = não-quantificável

Figura AC 10 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 11.

Tabela AC 20 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 11.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	2,00	5,26	64,90	66,32	8,39	3,77	5,48
Flagyl®	0,67	7,31	67,97	69,19	7,79	3,61	6,16

Voluntário 12

Tabela AC 21 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 12.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	7,15	6,68	5,70	5,02	5,02	5,13	4,90	4,64	4,38	3,50	2,93	2,25	1,05	0,37	0,13
Flagyl®	NQ	5,26	6,83	7,04	6,00	5,67	5,41	5,21	5,08	4,64	3,65	3,07	2,26	1,06	0,42	0,30

NQ = não-quantificável

Figura AC 11 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 12.

Tabela AC 22 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 12.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg×h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg×h/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	0,33	7,15	76,08	77,78	9,17	3,21	5,88
Flagyl®	1,00	7,04	80,04	84,31	9,90	2,97	5,90

Voluntário 13

Tabela AC 23 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 13.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	2,18	6,86	7,08	6,72	6,49	6,40	4,60	6,09	5,59	4,32	3,42	2,37	0,87	0,22	0,06
Flagyl®	NQ	2,06	8,42	7,66	7,29	6,44	6,52	6,03	5,75	4,98	3,99	3,19	2,15	0,60	0,13	NQ

NQ = não-quantificável

Figura AC 12 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 13.

Tabela AC 24 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 13.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µgxh/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,00	7,08	78,96	79,60	7,04	3,14	7,84
Flagyl®	0,67	8,42	70,93	72,09	5,99	3,47	8,34

Voluntário 14

Tabela AC 25 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 14.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	3,54	4,63	6,20	7,61	6,87	6,40	6,25	5,89	5,57	4,56	3,78	2,75	1,15	0,37	0,12
Flagyl®	NQ	0,09	0,40	1,20	1,58	2,38	2,16	2,71	2,73	4,50	5,25	4,38	3,26	1,37	0,50	0,19

NQ = não-quantificável

Figura AC 13 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 14.

Tabela AC 26 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 14.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,33	7,61	89,59	90,86	7,34	2,75	8,58
Flagyl®	6,00	5,25	86,12	88,34	8,32	2,83	7,36

Voluntário 15

Tabela AC 27 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 15.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED	NQ	0,15	1,72	5,49	7,19	7,65	7,48	7,57	7,02	6,96	5,58	4,79	3,99	1,85	0,81	0,36
Metronidazol																
Flagyl®	NQ	0,26	0,50	2,92	6,60	7,86	6,91	7,87	7,62	6,83	5,62	4,59	3,61	1,37	0,50	0,20

NQ = não-quantificável

Figura AC 14 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 15.

Tabela AC 28 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 15.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µgxh/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,67	7,65	121,50	126,74	10,13	1,97	8,67
Flagyl®	2,50	7,87	106,36	108,89	8,68	2,30	8,69

Voluntário 16

Tabela AC 29 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 16.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED	NQ	0,76	4,32	6,64	6,22	7,83	7,02	6,33	6,16	5,68	3,63	2,86	1,66	0,40	0,06	NQ
Metronidazol																
Flagyl®	NQ	0,20	1,26	7,48	7,41	6,72	7,76	6,88	6,76	5,58	4,00	3,03	1,89	0,51	0,10	NQ

NQ = não-quantificável

Figura AC 15 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 16.

Tabela AC 30 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 16.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,67	7,83	62,14	62,60	5,07	3,99	8,56
Flagyl [®]	2,00	7,76	66,78	67,63	5,71	3,70	8,21

Voluntário 17

Tabela AC 31 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 17.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	0,75	5,95	7,38	6,09	7,76	7,32	7,05	6,92	6,30	4,65	3,81	2,46	0,77	0,24	0,08
Flagyl [®]	NQ	0,63	4,14	5,29	6,04	7,67	7,57	7,56	7,34	6,48	4,91	3,85	2,64	0,79	0,20	0,07

NQ = não-quantificável

Figura AC 16 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 17.

Tabela AC 32 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl[®], lote 702824) ao voluntário 17.

Produto	t _{max} (h)	C _{max} (µg/mL)	ASC _{0-t} (µg×h/mL)	ASC _{0-∞} (µg×h/mL)	t _{(1/2)el} (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,67	7,76	83,47	84,26	7,13	2,97	8,19
Flagyl [®]	1,67	7,76	84,90	85,60	6,51	2,92	9,11

Voluntário 18

Tabela AC 33 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 18.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	0,33	3,43	7,81	7,71	7,23	7,22	6,72	6,44	5,84	4,75	3,93	2,83	1,24	0,41	0,16
Flagyl®	NQ	0,20	1,71	3,11	4,83	6,51	7,21	7,35	6,84	6,13	5,12	4,13	2,99	1,22	0,37	0,16

NQ = não-quantificável

Figura AC 17 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 18.

Tabela AC 34 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 18.

Produto	$t_{\max}$ (h)	$C_{\max}$ (µg/mL)	ASC_{0-t} (µgxh/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,00	7,81	93,47	95,33	8,11	2,62	8,15
Flagyl®	2,50	7,35	93,00	94,89	8,18	2,63	8,04

Voluntário 19

Tabela AC 35 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 19.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	1,61	4,67	5,57	5,32	5,27	5,21	5,48	5,17	4,81	3,66	2,87	1,80	0,51	0,11	NQ
Flagyl®	NQ	0,11	1,14	1,71	1,95	2,16	2,42	2,83	3,59	6,08	4,78	3,77	2,34	0,57	0,12	NQ

NQ = não-quantificável

Figura AC 18 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 19.

Tabela AC 36 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 19.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µgxh/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,00	5,57	60,58	61,57	6,04	4,06	7,06
Flagyl®	4,00	6,08	63,75	64,75	5,65	3,86	7,94

Voluntário 20

Tabela AC 37 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 20.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	2,08	7,47	6,51	6,90	6,35	6,18	6,17	6,19	5,52	4,71	3,75	2,96	1,23	0,46	0,16
Flagyl®	NQ	0,47	6,48	6,62	7,37	6,86	7,00	6,93	6,60	5,84	4,81	4,45	3,18	1,44	0,69	0,20

NQ = não-quantificável

Figura AC 19 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 20.

Tabela AC 38 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 20.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	0,67	7,47	94,00	95,96	8,24	2,61	8,07
Flagyl®	1,33	7,37	104,62	107,05	8,42	2,34	8,81

Voluntário 21

Tabela AC 39 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 21.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	0,93	2,84	4,96	5,49	5,30	6,13	5,98	6,11	5,45	4,67	3,27	1,86	0,60	0,13	NQ
Flagyl®	NQ	4,72	7,22	6,00	6,19	7,06	6,38	5,77	5,50	5,76	4,48	3,75	2,65	0,87	0,26	0,09

NQ = não-quantificável

Figura AC 20 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 21.

Tabela AC 40 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 21.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µgxh/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	2,00	6,13	66,88	68,00	6,17	3,68	0,54
Flagyl®	0,67	7,22	84,25	85,15	7,24	2,94	0,51

Voluntário 22

Tabela AC 41 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 22.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	0,99	6,34	6,15	6,03	7,44	7,37	7,19	5,99	6,37	4,92	4,16	2,50	1,08	0,27	0,07
Flagyl®	NQ	0,21	0,94	2,30	3,83	4,80	5,86	4,61	6,07	6,28	5,34	4,89	3,43	1,42	0,54	0,14

NQ = não-quantificável

Figura AC 21 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 22.

Tabela AC 42 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 22.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µgxh/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,67	7,44	88,63	89,27	6,14	2,80	10,08
Flagyl®	4,00	6,28	99,97	101,44	7,21	2,46	9,75

Voluntário 23

Tabela AC 43 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 23.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED Metronidazol	NQ	1,35	2,50	3,78	4,69	6,82	6,26	6,41	4,22	4,96	3,83	3,45	1,99	0,81	0,15	NQ
Flagyl®	NQ	1,01	7,15	6,29	6,44	6,28	5,99	5,96	5,12	4,46	3,65	2,73	2,18	0,68	0,19	0,05

NQ = não-quantificável

Figura AC 22 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 23.

Tabela AC 44 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 23.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,67	6,82	67,32	68,85	6,35	3,63	7,51
Flagyl®	0,67	7,15	68,78	69,24	6,39	3,61	7,51

Voluntário 24

Tabela AC 45 Concentrações plasmáticas de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 24.

Produto	Concentração plasmática (µg/mL)															
	0h	0,33h	0,67h	1h	1,33h	1,67h	2h	2,5h	3h	4h	6h	8h	12h	24h	36h	48h
FUNED	NQ	2,75	6,74	6,75	5,76	6,05	6,59	6,09	5,77	5,89	4,40	3,56	2,18	0,63	0,12	NQ
Metronidazol																
Flagyl®	NQ	2,18	8,44	7,54	7,41	6,98	6,30	6,12	5,72	6,44	2,26	2,24	2,18	0,53	0,10	NQ

NQ = não-quantificável

Figura AC 23 Curva de decaimento plasmático após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 24.

Tabela AC 46 Parâmetros farmacocinéticos de metronidazol após a administração dos produtos teste (FUNED Metronidazol, lote 07100833) e referência (Flagyl®, lote 702824) ao voluntário 24.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (µg·h/mL)	$ASC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	$t_{1/2el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
FUNED Metronidazol	1,00	6,75	73,41	74,39	5,72	3,36	9,01
Flagyl®	0,67	8,44	66,17	66,93	5,37	3,74	8,64

ANEXO D

LAUDO DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública

Certificado de Equivalência Farmacêutica

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
CEDAFAR - CENTRO DE ESTUDOS E DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO
FARMACÊUTICO

Avenida Presidente Antônio Carlos, 6.627 - Campus UFMG - Sala 4029 B2 - Pampulha.
CEP 31270-901 - Belo Horizonte / MG.
Telefone: +55 31 3409-6975 Fax: +55 31 3409-6976 e-mail: cedafar@farmacia.ufmg.br

Número	Nome do Estudo	Período do Estudo
015-2008	ESTUDO DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA DO MEDICAMENTO FUNED METRONIDAZOL (METRONIDAZOL) 250 mg comprimido	30/01/08 a 08/02/08

1.0 - Dados Cadastrais da Empresa Solicitante

Nome / Razão Social	Sigla (se houver)
FUNED - Fundação Ezequiel Dias	FUNED
Endereço	
Rua Conde Pereira Carneiro, 80 - Gameleira - Belo Horizonte / MG.	

2.0 - Dados do Medicamento Analisado

Dados das Amostras	Medicamento Teste	Medicamento Referência
Nome Genérico (DCB ou DCI)	Metronidazol	Metronidazol
Nome Fantasia	FUNED METRONIDAZOL	FLAGYL®
Fabricante	FUNED - Fundação Ezequiel Dias	Aventis Pharma S.A. de C.V. *
Endereço do Fabricante	Rua Conde Pereira Carneiro, 80 - Belo Horizonte - MG	Acueducto Del Alto Lerma, nº. 2, Zona Industrial Gcayoacac - Edo de México
Forma Farmacêutica	Comprimido	Comprimido
Apresentação (dosagem)	250 mg	250 mg
Número da Nota Fiscal	Inexistente, não destinado à comercialização	NF 001556
Número do Lote	07100833	702824
Data de Fabricação	10/2007	02/2007
Prazo de Validade	10/2009	01/2010

Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública

3.0 – Resultados dos Medicamentos Analisados

Ensaio	Medicamento Teste		Medicamento de Referência		Referências
	Resultado	Especificação	Resultado	Especificação	
Forma	De acordo	Comprimido	De acordo	Comprimido	F. Bras. IV
Cor	Branca	NA.	Branca	NA.	.
Peso médio	379,30 mg	NA.	511,78 mg	NA.	F. Bras. IV
Dureza	80,50 N	Mínimo 45 N	83,31 N	Mínimo 45 N	F. Bras. IV
Desintegração	1 minuto e 3 segundos	Até 30 minutos em água	2 minutos e 21 segundos	Até 30 minutos em água	F. Bras. IV
Friabilidade	0,90%	Máximo 1,5%	0,02%	Máximo 1,5%	F. Bras. IV
Dissolução	95,13% em 60 minutos; 92,68% a 97,67%	Mínimo em 85% em 60 minutos	96,76% em 60 minutos; 89,52% a 100,77%	Mínimo em 85% em 60 minutos	F. Bras. IV
Uniformidade de conteúdo	94,86% a 104,45%; DPR=2,51%	85% a 115%; DPR ≤ 6,0%	91,56% a 109,29%; DPR=4,66%	85% a 115%; DPR ≤ 6,0%	F. Bras. IV
Determinação peso formas farmacêuticas	-2,26% a +4,37%	± 5,0%	-3,15% a +4,78%	± 5,0%	F. Bras. IV
Limite de 2-metil-5-nitro-imidazol	Passa o teste	Não mais de 2,5 mg/comp.	Passa o teste	Não mais de 2,5 mg/comp.	F. Bras. IV
Identificação por ponto de fusão	Positivo	Metronidazol	Positivo	Metronidazol	F. Bras. IV
Identificação química	Positivo	Metronidazol	Positivo	Metronidazol	F. Bras. IV
Identificação por espectrofotometria no IV	Positivo	Metronidazol	Positivo	Metronidazol	F. Bras. IV
Determinação em meio não aquoso	260,33 mg/comp ou 104,13% VR.	Metronidazol; 250 mg/comp ou 95% a 105% VR.	258,03 mg/comp ou 103,21% VR.	Metronidazol; 250 mg/comp ou 95% a 105% VR.	F. Bras. IV

4.0 – Observação

Análise solicitada pela FUNED – Fundação Ezequiel Dias, para fins de estudo de Equivalência Farmacêutica, segundo monografia da Farmacopéia Brasileira IV edição.

Amostragem do medicamento teste enviada pelo cliente e medicamento referência adquirida pelo CEDAFAR/UFMG.

* Medicamento embalado por: Aventis Pharma Ltda., Rua Conde Domingos Papais, 413 – Suzano – São Paulo, Caixa Postal 20.215, Cep 04035-990.

Legendas: N.A. = Não se Aplica;

VR. = Valor Rotulado.

5.0 – Conclusão

Em vista dos resultados obtidos acima, conclui-se SEREM EQUIVALENTES FARMACÊUTICOS os lotes do medicamento teste e o respectivo medicamento referência, relacionados no Item 2 do presente Certificado de Equivalência Farmacêutica.

6.0 – Assinaturas

	Nome	Assinatura	Data
Analista	Eldeweis das Graças Machado CRF/MG-6872		12/02/2008
	Nilton de Souza Viana Júnior CRF/MG-4743		12/02/2008
Resp. Técnico	Cristina Duarte Vianna Soares CRF/MG-19095		12/02/2008

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pofama@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Development and Validation of a HPLC–MS–MS Method for Quantification of Metronidazole in Human Plasma

Marina Silva, Silvana Schwanen, Eudice Kanno, Eudice Kanno, Valeriana Pereira, and Cristiana Serra
USP, Pharmacy

Abstract

The objective of this study was to describe an analytical validation of a simple, rapid, sensitive, and selective liquid chromatography (LC)– tandem mass spectrometry (MS–MS) method for quantification of metronidazole in human plasma samples from bioequivalence studies. One-point samples were pre-treated by aqueous extraction (4:1) with ethyl acetate. Metronidazole and the internal standard (IS) nitrofurantoin were analyzed by combined reversed-phase LC–MS–MS with positive ion electrospray ionization. Multiple reaction monitoring (MRM) of the transition m/z 238.08 $\rightarrow$ 126.04 for 5. The main chromatography conditions used were a Varian C₁₈ (Microsorb model) (150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size) column, and the mobile phase was composed of acetonitrile and 10 mM ammonium acetate (80:20, v/v) and 0.1% formic acid. Flow rate used was 1.5 mL/min with 15 min. The method was linear over a concentration range of 0.05–5.00 μ g/mL. Acceptable precision and accuracy were obtained for concentration over the standard curve range. The developed method was validated and successfully applied to a pilot bioequivalence study of metronidazole in healthy volunteers.

Introduction

Metronidazole is the active agent of the nitroimidazole antibiotic family (1–2) and is widely used in the therapy of several infectious diseases, such as amoebiasis, trichomoniasis, lamblia, and anaerobic infections (2–3).

The drug is one of the most promising agents in combination antibiotic therapy used in the eradication of helicobacter pylori, a recognized cause of gastritis and duodenal ulcers (2,4,5). It is most frequently used in association with other antibiotics because of the resistance of this organism (6).

After oral administration, metronidazole is well absorbed and serum concentrations reach high levels with tissue concentrations being generally similar to or slightly lower (1). It can be eliminated with $t_{1/2}$ (elimination half-life) between 6–12 h. Bioavailability after oral administration is almost complete (66%) and oral administration also yields sufficient and reproducible high extents of availability (5,7). The drug is intensely metabolized by the hepatic microsomal cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase system to form two biologically active main metabolites (5,8).

*Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: cristiana.serra@usp.br

Extraction and clean-up of drugs from biological fluids are usually the first and most difficult step in bioanalysis due to the need to selectively remove interferent, such as proteins, without significant analyte loss (9).

There are some chromatographic techniques previously published for quantification of metronidazole in human plasma, but they present some disadvantages for its application in bioequivalence studies, such as multi-step procedures for metronidazole extraction from biological samples with extensive chromatographic run times (12) and expensive solid-phase procedures for sample preparation (6) or protein precipitation (2,4). Other methods describe liquid–liquid extraction with large volumes of solvent (1,7,9–11) or double liquid–liquid extraction, both methods which result in a large consumption of solvent (3) and longer time for sample analysis. The risk of presented in this study, however, is a short run time and a simple liquid–liquid extraction procedure, which is an important issue in bioequivalence studies considering the large amount of samples that have to be analyzed in this kind of test (12–13). The method proposed by Wibisono *et al.* uses small volumes of plasma sample and solvent, but it has a non-selective run time (5).

Metronidazole quantification is accomplished mostly by the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection (2–5,14–16) usually at 213–218 nm, mass spectrometry (MS/MS) detection or, less commonly, at 313 nm (2) and at 315 nm (5). Only one published work presents a method using gas–liquid chromatography with mass spectrometry (MS–MS) (7).

In the present study a simple and rapid HPLC method with MS–MS detection with a short run time and an adequate concentration range for quantification of metronidazole in human plasma from bioequivalence studies is described.

Experimental

Materials

Metronidazole and nitrofurantoin (internal standard, IS) reference standards were kindly supplied by FUNDOP (Fundação Research Unit, São Carlos, Brazil). HPLC-grade acetonitrile, ethyl acetate, methanol, analytical-grade formic acid, and ammonium acetate were purchased from Merck (São Paulo, Brazil). Water (182 M Ω) used in the mobile phase was freshly prepared from Milli-Q Academic (Millipore, Bedford, MA). Blank plasma was obtained from healthy volunteers.

Apparatus and chromatographic conditions

Analyses were performed on a Shimadzu Scientific Instruments (Kyoto, Japan) liquid chromatographic system composed of a LC-10ADVP pump assembled with an SIL-10ADVP auto-sampler, fitted with a 50- μ L loop, and a SCL-10ADVP controller unit. The analytical column was a Varian C₁₈ Microsorb (150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size) protected with a Phenomenex AO-4087 C₁₈ guard cartridge (5 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size) (Torrance, CA). The HPLC system was coupled with an ESI interface with a Micromass Quattro triple quadrupole mass spectrometer (Milford, MA) equipped with an electrospray ion source.

The isocratic HPLC mobile phase was composed by acetonitrile and 10 mM ammonium acetate (80:20, v/v) and 0.1% formic acid; it was prepared daily, filtered through a 0.22- μ m filter, and degassed ultrasonically for 20 min before use. Flow rate was 1.0 mL/min, and a splitter was used. The column was maintained at room temperature (22°C). The injection volume was 50 μ L and the total run time was 5.0 min.

The mass spectrometer was operated in the positive ion detection mode. Tuning parameters were optimized for both analytes by infusing solutions containing 1 μ g/mL of metronidazole and the IS at a flow rate of 20 μ L/min via an external syringe pump directly connected to the mass spectrometer. The source temperature was set at 100°C, and desolvation temperature was 300°C. Optimal cone voltage values were 25 V for metronidazole and 30 V for IS, while capillary voltage was set at 3.0 kV. The multiplier was set at 650 V, and argon was used as the collision gas. Quantification was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of the transitions m/z 171.09 $\rightarrow$ 127.07 for metronidazole and m/z 268.08 $\rightarrow$ 125.06 for IS with a dwell time of 0.5 s per transition. Collision energies of 15 eV and 20 eV were used for metronidazole and the IS, respectively. Data were acquired using Masslynx 4.0 software.

Standard solution preparation

A metronidazole stock solution with final concentration of 5000 μ g/mL was prepared by dissolving 500 mg of reference standard in 100 mL of methanol. A metronidazole intermediate solution of 500 μ g/mL in methanol was prepared by dilution of the metronidazole stock solution. A zidovudine stock solution (100 μ g/mL) was prepared by dilution of 10 mg of reference standard in water-methanol (90:10, v/v). The metronidazole standard solutions were prepared by dilution of stock solutions with water-methanol (90:10, v/v) to obtain the following concentrations: 0.5, 1.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, and 80.0 μ g/mL. Stock intermediate and standard solutions of both compounds were stored at -20°C and 4°C, respectively. All stock and standard solutions were stable for 6 and 2 months, respectively.

Calibration standard and quality control samples preparation

Preparation of calibration standard plasma samples (0.05, 0.15, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, and 8.0 μ g/mL) was accomplished daily by adding known amounts (25 μ L) of metronidazole standard solutions and 50 μ L of IS stock solution (100 μ g/mL) in 8-mL glass tubes and adding 250 μ L of drug-free plasma. Quality control plasma samples (0.15, 3.0, and 7.0 μ g/mL) were prepared in 25-mL volumetric flasks by spiking drug-free plasma with

known amounts (175–375 μ L) of metronidazole solutions (10 and 500 μ g/mL), aliquoted, and stored at -20°C.

Metronidazole extraction procedure

All frozen human plasma samples were thawed at ambient temperature. Fifty microliters of IS solution (100 μ g/mL) in water-methanol (90:10, v/v), and 250 μ L of plasma were added in glass 8-mL tubes and vortexed for 30 s. After this procedure, ethyl acetate (3.0 mL) was added to all tubes, and extraction was performed by vortex mixing for 60 s, followed by centrifugation for 10 min at 3500 rpm. Aqueous layers were frozen, and the upper organic phases were transferred to 8-mL conical glass tubes and evaporated to dryness at 40°C under a nitrogen stream. The extracts were reconstituted with 300 μ L of mobile phase and 50 μ L were injected into the chromatographic system.

Bioanalytical method validation

The specificity of the method was investigated by analyzing six drug-free plasma samples obtained from healthy human volunteers who did not take metronidazole (four normal plasma samples, one hemolyzed plasma sample and one lipemic plasma sample) for interference of endogenous compounds.

The standard curve was obtained through analysis of calibration standard plasma samples and plotting of peak area ratio of metronidazole and zidovudine versus the corresponding metronidazole concentrations (0.05, 0.15, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 μ g/mL). The linearity of the standard curve was evaluated using least-squares linear regression analysis. The lower limit of quantification (LLQ) was the smallest analytical concentration which could be measured with accuracy and precision still better than 20% (0.05 μ g/mL).

The analytical recovery was determined by comparing the response of pre-treated quality control plasma samples with the response of identical standards prepared in the mobile phase, which did not undergo sample pre-treatment.

To evaluate the inter-assay precision and accuracy, quality control plasma samples were analyzed together with one independent calibration standard curve for three days, while intra-assay precision and accuracy were evaluated through analysis of quality control plasma samples in replicate of six on the same day. Inter-assay and intra-assay precision were expressed as relative standard deviation (RSD%). The accuracy was expressed as the percent ratio between the experimental concentration and the nominal concentration for each sample.

Stability of metronidazole in spiked plasma samples was determined in triplicate at concentrations of quality control plasma samples after three freezing and thawing cycles. Stability of spiked, processed plasma samples during storage in the auto sampler for 24 h and 48 h at room temperature was evaluated. Additionally, the stability was evaluated during the period in which the drug was in plasma samples before the samples had been analyzed.

Application

A bioequivalence study was carried out to verify the actual working conditions in volunteer's plasma samples. It also served to evaluate the magnitude of metronidazole concentrations in human plasma after administration of metronidazole single dose of 250 mg.

The study was approved by the ethics committee from College of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo (Brazil). The study was performed according to the rules of Good Clinical Practice. Twenty-two healthy volunteers, 11 females and 11 males, participated in the pilot study. Subjects were selected after clinical screening procedure including a physical examination and laboratory tests. All subjects avoided consumption of drugs for at least one week prior to the study and until after its completion. They also abstained from alcoholic beverages, and xanthine-containing foods and beverages 48 h prior to each dosing until the collection of the last blood sample. The study was an open randomised, two-period crossover trial with a one-week wash-out period. Subjects were admitted in to hospital at 7:00 p.m. the day before the study and fasted 10 h before each drug administration.

Figure 1. Calibration curve for the analytical method for metronidazole quantification in human plasma (line range of 0.25 µg/ml to 8 µg/ml, 246 × 25 mm).

Figure 2. Representative chromatogram of blank plasma (A); Representative chromatogram of the medium quality control (QC) sample (1.00 µg/ml) containing metronidazole and zidovudine (1.33 and 1.77 µg/ml) (B).

A single dose (250 mg metronidazole) consisting of reference or test according to the randomisation plan was given to each subject in a fasting state for each treatment period. Fasting continued for at least 4 h after drug administration. The drug was administered with 200 mL of water. Subjects were provided with standard meals 4 h (lunch), 7 h (snack), and 10 h (dinner) after drug administration for each treatment.

Eight milliliters of heparinized venous blood samples were collected by means of an indwelling venous cannula of the cubital vein on profile days according to the time schedule, which included a sample just prior to dosing and then at 0.25, 0.50, 1.0, 1.33, 1.67, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 36.0, 48.0 h after drug administration. Any deviation from the stated sampling times was recorded. Plasma was immediately separated by centrifugation at 3500 rpm for 15 min, then was transferred to properly labeled tubes and stored at -20°C until the HPLC analysis.

Results and Discussion

Analytical method validation

The HPLC-MS-MS method for metronidazole quantification was linear in the range of 0.05–8 µg/mL, as shown in Figure 1. The method showed specificity because metronidazole and zidovudine were well resolved and no interfering peaks from endogenous compounds or of normal, human, and human plasma were observed as it appears in Figure 2. Retention times were 3.00 min for metronidazole and 3.81 min for zidovudine.

Accuracy was between 97.95%–103.86%, and precision, measured in RSD%, was always lower than 10.66%, depicting the high precision of the method (Table I). The mean recovery was 82.09% for metronidazole and 82.00% for Z (Table II). The processed samples were considered stable at room temperature at least for 48 h as shown in Table III. Metronidazole concentrations were not altered after three freeze-thaw cycles (Table IV) and plasma samples were stable for at least 46 days when stored at -20°C (Table V).

Table I. Precision and Accuracy Intra-assay and Inter-assay of the Method Metronidazole in Human Plasma (n = 6)				
Metronidazole conc. (µg/ml)	Precision (%)		Accuracy (%)	
	Intra-assay	Inter-assay	Intra-assay	Inter-assay
0.25	7.710	10.66	103.87	103.86
1.00	2.75	6.70	103.05	99.94
7.00	1.84	6.04	102.76	98.47

Table II. Recovery of Metronidazole and Zidovudine (IS) After the Extraction Procedure (n = 6)		
Metronidazole conc. (µg/ml)	% Recovery	
	Metronidazole	Z
0.25	81.04	88.91
1.00	74.04	77.73
7.00	83.20	79.76
Mean	82.09	82.00
SD	7.56	6.04
RSD%	9.21	7.37