UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação de bioequivalência de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol

Eunice Emiko Mori Koono

Dissertação para obtenção do grau de

Mestre

Orientadora

Profa Dra Valentina Porta

São Paulo

2005

Eunice Emiko Mori Koono

Avaliação de bioequivalência de comprimidos contendo

500 mg de tinidazol

Comissão julgadora da

Dissertação para obtenção do grau de

Mestre

Profa. Dra. Valentina Porta

Orientador/presidente

Profa. Dra. Maria Teresa Zulini da Costa

1º examinador

Profa. Dra. Eliane Ribeiro

2º examinador

São Paulo, 23 de novembro de 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Eunice Emiko Mori Koono no Programa: Fármaco e Medicamentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 23 dias do mês de novembro de 2005, realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Eunice Emiko Mori Koono, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Fármaco e Medicamentos - Área: Produção e Controle Farmacêuticos, intitulada:

"Avaliação de bioequivalência de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas argüições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Valentina Porta	Presidente	FCF - USP	aprovada
Maria Teresa Zulini da Costa	Titular	HU - USP	aprovada
Eliane Ribeiro	Titular	HU - USP	aprovada

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Elizabete Maria de S Paiva, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 23 dias do mês de novembro de 2005.

Maria Teresa Zulini da Costa

Eliane Ribeiro

Valentina Porta
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 22/11/2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo constante apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Ao Hayton, pelo seu amor, companheirismo e estímulo.

À Bruna e Victor, pela paciência, carinho e por proporcionarem-me tantos momentos de alegria.

À Profa. Dra. Valentina Porta, pela confiança, paciência e inestimável orientação.

À Eunice Kazue, pela amizade e esclarecimentos constantes.

Ao Eder, Eremita, Simone, Tatiana e Valdilene, pelo carinho e auxílio em todas as etapas deste trabalho.

As pós-graduandas Tatiane e Rute, pelo incentivo e amizade.

Aos voluntários que participaram da etapa clínica deste estudo.

A Tpg H. Ching, pelo auxílio na análise estatística dos resultados obtidos.

Aos secretários Bete, Jorge, Marjô e Elaine, pela atenção e cordialidade constante.

Aos funcionários da biblioteca, em especial a Leila e Maria Luiza, pela revisão das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

DEDICO ESTE TRABALHO

AO HAYTON, BRUNA E VICTOR

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo constante apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Ao Hayton, pelo seu amor, companheirismo e estímulo.

A Bruna e Victor, pela paciência, carinho e por proporcionarem-me tantos momentos de alegria.

A Profa. Dra. Valentina Porta, pela confiança, paciência e inestimável orientação.

A Eunice Kazue, pela amizade e esclarecimentos constantes.

Ao Eder, Eremita, Simone, Tatiana e Valdilene, pelo carinho e auxílio em todas as etapas deste trabalho.

As pós-graduandas Tatiane e Rute, pelo incentivo e amizade.

Aos voluntários que participaram da etapa clínica deste estudo.

A Ting H. Ching, pelo auxílio na análise estatística dos resultados obtidos.

Aos secretários Bete, Jorge, Marjô e Elaine, pela atenção e cordialidade constante.

Aos funcionários da biblioteca, em especial a Leila e Maria Luiza, pela revisão das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS a

LISTA DE FIGURAS d

RESUMO e

ABSTRACT h

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 5

2.1 OBJETIVO GERAL 6

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 6

3 REVISÃO DA LITERATURA 7

3.1 TINIDAZOL 8

3.1.1 MECANISMO DE AÇÃO 8

3.1.2 FARMACOCINÉTICA 9

3.1.3 INDICAÇÕES E USOS 11

3.1.4 DOSES E ADMINISTRAÇÃO 12

3.1.5 EFEITOS ADVERSOS 12

3.2 MEDICAMENTOS GENÉRICOS E MEDICAMENTOS SIMILARES 13

3.2.1 HISTÓRICO 13

3.2.2 MEDICAMENTO GENÉRICO 15

3.2.3 MEDICAMENTO SIMILAR 17

3.3 DEFINIÇÕES 17

3.3.1 BIODISPONIBILIDADE 18

3.3.2 BIOEQUIVALÊNCIA 19

3.3.3 BIODISPONIBILIDADE RELATIVA 20

3.3.4 EQUIVALENTES FARMACÊUTICOS 21

3.3.5 EQUIVALENTES TERAPÊUTICOS 21

3.3.6 ALTERNATIVAS FARMACÊUTICAS 22

3.4 FATORES QUE AFETAM A BIODISPONIBILIDADE DE MEDICAMENTOS 23

3.4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO FÁRMACO 24

3.4.2 CARACTERÍSTICAS DA FORMA FARMACÊUTICA 26

3.4.3 FATORES FISIOLÓGICOS RELACIONADOS AO TGI 27

3.5 REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA 29

3.5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO 31

3.5.2 NÚMERO DE VOLUNTÁRIOS 33

3.5.3 SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS 34

3.5.4 ADMINISTRAÇÃO DOS PRODUTOS 35

3.5.5 PERÍODO DE COLETA DAS AMOSTRAS 35

3.5.6 RESULTADOS PARA AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA 36

3.6 SITUAÇÕES ESPECIAIS 37

3.6.1 FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO MODIFICADA 37

3.6.2 DIFERENTES DOSAGENS E FORMULAÇÕES 38

3.6.3 FÁRMACOS DE ALTA VARIABILIDADE 39

3.6.4 METABÓLITOS 40

3.6.5 SUBSTÂNCIAS ENDÓGENAS 41

3.6.6 SUBSTÂNCIAS ESTEREOISÔMERAS 42

3.6.7 FÁRMACOS DE ESTREITA FAIXA TERAPÊUTICA 43

3.7 BIOEQUIVALÊNCIA INDIVIDUAL, MÉDIA E POPULACIONAL 44

3.8 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA 45

3.9 CORRELAÇÃO *IN VITRO IN VIVO* 47

4 MATERIAL E MÉTODOS 49

4.1 MATERIAL 50

4.1.1 AMOSTRAS 50

4.1.2 PADRÃO DE REFERÊNCIA 50

4.1.3 SOLVENTES, REAGENTES E MATERIAIS 51

4.1.4 EQUIPAMENTOS 52

4.2 MÉTODOS 53

4.2.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL EM PLASMA 53

4.2.1.1 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL 53

4.2.1.2 PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLASMA PADRÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO 54

4.2.1.3 PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLASMA PADRÃO DE CONTROLE DE QUALIDADE 55

4.2.1.4 CONDIÇÕES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 56

4.2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL EM PLASMA 57

4.2.2.1 ESPECIFICIDADE 57

4.2.2.2 RECUPERAÇÃO 58

4.2.2.3 LIMITE DE DETECÇÃO 58

4.2.2.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO INFERIOR 59

4.2.2.5 LINEARIDADE 59

4.2.2.6 PRECISÃO 60

4.2.2.7 EXATIDÃO 61

4.2.2.8 ESTABILIDADE 61

4.2.2.8.1 ESTABILIDADE NOS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO 62

4.2.2.8.2 ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO 62

4.2.2.8.3 ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO 63

4.2.2.8.4 ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO 63

4.2.2.8.5 ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO 63

4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL NAS AMOSTRAS DE PLASMA 64

4.2.4 ENSAIO CLÍNICO DE BIOEQUIVALÊNCIA 65

4.2.4.1 CASUÍSTICA 65

4.2.4.2 PROCEDIMENTO DO ENSAIO DE BIOEQUIVALÊNCIA 69

4.2.4.3 LOCAL E FORMA DE INTERNAÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS 71

4.2.4.4 ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS 71

4.2.4.5 PERÍODO DE JEJUM E ALIMENTAÇÃO 71

4.2.4.6 COLETA, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS 72

4.2.5 AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS PRODUTOS 72

4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 74

5 RESULTADOS 76

5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL EM PLASMA 77

5.1.1 ESPECIFICIDADE 77

5.1.2 RECUPERAÇÃO 79

5.1.3 LIMITE DE DETECÇÃO 79

5.1.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO INFERIOR 80

5.1.5 LINEARIDADE 80

5.1.6 PRECISÃO 81

5.1.7 EXATIDÃO 81

5.1.8 ESTABILIDADE 82

5.1.8.1 ESTABILIDADE NOS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO 82

5.1.8.2 ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO 84

5.1.8.3 ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO 85

5.1.8.4 ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO 87

5.1.8.5 ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO 87

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL EM AMOSTRAS DE PLASMA DE VOLUNTÁRIOS 88

5.3 ENSAIO CLÍNICO DE BIOEQUIVALÊNCIA 88

5.4 AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS PRODUTOS 89

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 94

6 DISCUSSÃO 99

7 CONCLUSÕES 110

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 112

ANEXO A 124

ANEXO B 126

ANEXO C 130

ANEXO D 155

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Obtenção de amostras de plasma padrão de tinidazol da curva de calibração. 55

Tabela 4.2 Obtenção de amostras de plasma de controle de qualidade de tinidazol. 56

Tabela 4.3 Características dos voluntários incluídos no ensaio de bioequivalência relativa de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol. 68

Tabela 4.4 Desenho amostral para ensaio de bioequivalência de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol. 70

Tabela 5.1 Recuperação média do procedimento de purificação das amostras de plasma para tinidazol (padrão) e metronidazol (padrão interno). Cada valor representa a média de seis determinações. 79

Tabela 5.2 Parâmetros relativos a reta de calibração do método analítico para quantificação de tinidazol em plasma por CLAE na faixa de concentração de 0,04 a 15,0 µg/mL. 81

Tabela 5.3 Precisão e exatidão intra-ensaio e inter-ensaios referentes a método analítico para quantificação de tinidazol em plasma por cromatografia líqüida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis determinações para precisão e exatidão intra-ensaio e réplicas de 6 amostras por 4 dias para precisão e exatidão inter-ensaios. 82

Tabela 5.4 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações. 83

Tabela 5.5 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a 83

média de três determinações.

Tabela 5.6 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações. 84

Tabela 5.7 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma, analisadas após permanência de 4 horas à temperatura ambiente. Cada resultado representa a média de três determinações. 85

Tabela 5.8 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma analisadas 24 horas após o procedimento de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações. 86

Tabela 5.9 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma analisadas 60 horas após o procedimento de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações. 86

Tabela 5.10 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma de controle qualidade, analisadas logo após o preparo e mantidas à temperatura de -20°C por 35 dias. Cada resultado representa a média de três determinações. 87

Tabela 5.11 Concentrações plasmáticas médias de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios. 90

Tabela 5.12 Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração do produto referência (Pletil®, lote G311) a 24 voluntários sadios. 92

Tabela 5.13 Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração do produto teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios. 93

Tabela 5.14 Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros $C_{max,}$ AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários 94

sadios.

Tabela 5.15 Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro $C_{max,}$ transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios. 95

Tabela 5.16 Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro AUC_{0-t}, transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios. 96

Tabela 5.17 Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro $AUC_{0-\infty}$, transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios. 96

Tabela 5.18 Intervalos de confiança 90% (IC 90 %) para as relações entre os parâmetros $C_{max,}$ AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos teste (Amplium, lote 1732) e referência (Pletil®, lote G311) a 24 voluntários sadios. 97

Tabela 5.19 Razões entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, transformados em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos teste (Amplium®, lote 1732) e referência (Pletil®, lote G311) a 24 voluntários sadios. 98

Tabela 5.20 Poder estatístico dos testes utilizados para determinação do intervalo de confiança 90% (IC 90%) das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ dos produtos teste (Amplium®, lote 1732) e referência (Pletil®, lote G311) transformados logaritmicamente. 98

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Estrutura química do tinidazol. 8

Figura 5.1 Cromatogramas referentes a amostras de: (A) – plasma obtido de voluntário sadio antes da administração oral de 500 mg de tinidazol; (B) – plasma obtido de voluntário sadio 1 hora após administração oral de 500 mg de tinidazol (tempo de retenção = 4,29 minutos), adicionado de padrão interno (tempo de retenção = 2,93 minutos). 78

Figura 5.2 Reta de calibração do método analítico para quantificação de tinidazol em plasma por CLAE na faixa de concentração de 0,04 a 15,0 µg/mL 80

Figura 5.3 Curvas médias "concentração plasmática *versus* tempo" após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios. As barras verticais representam o erro padrão da média. 91

RESUMO

Tinidazol, 1-[2-(ethylsulphonyl)ethyl]-2-methyl-5-nitroimidazole, é um membro da classe dos nitroimidazóis que apresenta atividade amebicida, giardicida, tricomonicida e anaeróbica.

O objetivo deste estudo foi avaliar a bioequivalência de duas marcas comerciais de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol em voluntários sadios.

O ensaio de bioequivalência entre o produto teste (Amplium® - FARMASA) e o produto referência (Pletil® – Pharmacia do Brasil Ltda) foi do tipo randomizado, cruzado e aberto. O medicamento foi administrado em dose única de 500 mg de tinidazol a 24 voluntários sadios. Amostras de sangue foram coletadas até 72 horas após a administração e analisadas através de método de cromatografia líquida de alta eficiência validado com detecção UV.

As curvas médias de decaimento plasmatico obtidas para o produto teste (Amplium® - FARMASA) e para o produto referência (Pletil® – Pharmacia do Brasil Ltda) foram semelhantes, da mesma forma que os parâmetros farmacocinéticos C_{max} (referência: 11,34 µg/mL; teste: 11,11 µg/mL), t_{max} (referência: 1,67 h; teste: 1,71 h), AUC_{0-t} (referência: 201,92 µgxh/mL; teste: 198,15 µgxh/mL), $AUC_{0-\infty}$ (referência: 208,25 µg/mL; teste: 203,80 µgxh/mL) e $t_{(½)el}$ (referência = 14,05 h; teste = 13,91 h).

A análise multivariada realizada através da análise de variância (ANOVA), para avaliação dos efeitos produto, grupo e período, revelou a ausência destes efeitos no estudo, indicando que o delineamento do estudo foi apropriado.

Os valores do intervalo de confiança 90% para a razão de C_{max} (93.9 % – 102.6 %), AUC_{0-t} (94.9 % – 101.1 %) e $AUC_{0-\infty}$ (94.6 % – 100.8 %) encontram-se entre 80 - 125 %, intervalo proposto pelo FDA e ANVISA.

A comparação estatística dos parâmetros AUC_{o-t} , $AUC_{0-\infty}$ e C_{max} indicam claramente não haver diferença significativa entre os dois produtos contendo 500 mg de tinidazol. Baseado nos resultados farmacocinéticos e estatísticos deste, pode-se concluir que os dois produtos são bioequivalentes e podem ser considerados intercambiáveis na terapêutica.

ABSTRACT

Tinidazole, 1-[2-(ethylsulphonyl)ethyl]-2-methyl-5-nitroimidazole, is a member of the 5-nitroimidazole class of antimicrobial agents with amoebicidal, giardicidal, trichomonicidal and anaerobic activity.

The purpose of this study was to evaluate the bioequivalence of two brands of tinidazole 500mg tablets in healthy human volunteers.

The procedure of bioequivalence between the test product (Amplium® - FARMASA) and reference product (Pletil® – Pharmacia do Brasil Ltda) was a randomized, crossover and open study. The medication was administered in a single dose of 500 mg of tinidazole to 24 healthy volunteers. Blood samples were collected until 72 hours after administration and analised using a validated high-performance liquid chromatographic method with UV detection.

The average plasmatic decay curves obtained for the test product (Amplium® - FARMASA) and reference product (Pletil® – Pharmacia do Brasil Ltda) were similar, in the same way as were the pharmacokinetic parameters C_{max} (reference: 11.34 µg/mL; test: 11.11 µg/mL), t_{max} (reference: 1.67 h; test: 1.71 h), AUC_{0-t} (reference: 201.92 µgxh/mL; test: 198.15 µgxh/mL), $AUC_{0-\infty}$ (reference: 208.25 µg/mL; test: 203.80 µgxh/mL) and $t_{(½)el}$ (reference = 14.05 hours, test = 13.91 hours).

The multivariate analysis accomplished through analysis of variance (ANOVA), for assessment of product, group and period effects, revealed the absence of any of these effects in the present study, indicating that the crossover design was properly performed.

The 90% confidence intervals for the ratio of C_{max} (93.9 % – 102.6 %), AUC_{0-t} (94.9 % – 101.1 %) and $AUC_{0-\infty}$ (94.6 % – 100.8 %) values for the test and reference products are within the 80 - 125 % interval proposed by FDA and ANVISA.

Statistical comparison of AUC_{o-t} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} clearly indicated no significant difference between the two brands of tinidazole 500 mg tablets. Based on the pharmacokinetic and statistical results of this study, we can conclude that the two products are bioequivalent, and can be considered interchangeable in medical practice.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os profissionais da área da saúde confrontam-se com uma ampla variedade de produtos farmacêuticos com a mesma indicação terapêutica. Diferentes classes de agentes são disponíveis para o tratamento da mesma patologia, exibindo, em menor ou maior escala, os mesmos benefícios e efeitos adversos (Williams, 1991).

O Brasil apresenta a décima colocação no ranking dos maiores consumidores de medicamentos do mundo, movimentando cerca de 5 bilhões de dólares por ano. Além disso, é o primeiro colocado mundial em número de farmácias, com cerca de 50 mil lojas, que corresponde a 3,34 lojas para cada 10 mil habitantes. Apesar deste mercado farmacêutico tão expressivo, pesquisas indicam que 50% dos pacientes que precisam de um medicamento não podem comprá-lo e abandonam o tratamento (Pró-genéricos, 2004).

Com o objetivo de implementar ações capazes de promover a melhoria das condições da assistência à saúde da população, foi instituída pelo governo federal a Política Nacional de Medicamentos, com propósito de garantir a necessária segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos, a promoção do uso racional e o acesso da população àqueles considerados essenciais (Brasil, 2001).

Como parte das diretrizes da Política Nacional de Medicamentos, a Lei 9787 de 10 de fevereiro de 1999, instituiu o medicamento genérico no País de acordo com as normas internacionais adotadas por países da Comunidade Européia, EUA e Canadá, além da OMS – Organização Mundial da Saúde. Esta lei foi regulamentada pela Resolução 391, de 9 de agosto de 1999, que apresentou todos os critérios sobre produção, ensaios de bioequivalência, ensaios de biodisponibilidade, registro, prescrição e dispensação de medicamentos genéricos (Brasil, 1999).

Entretanto, após a introdução do medicamento genérico e das ações para sua consolidação, surgiram questões relacionadas ao registro de medicamentos similares, pois estes não seguiam as mesmas normas rígidas de qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos genéricos. Assim, em 29 de maio de 2003, foram publicadas as resoluções que estabeleciam novos critérios para registro de medicamentos similares, com base na comprovação da equivalência farmacêutica e da biodisponibilidade relativa e critérios para adequação dos medicamentos similares já registrados (Brasil, 2003a, b; Bueno, 2004).

A eficácia clínica de um medicamento após a sua administração por via oral pode ser afetada por fatores inerentes ao fármaco, fatores relacionados à forma farmacêutica, fatores fisiológicos como a metabolização no trato gastrintestinal, eficiência do transporte através das membranas biológicas, motilidade e tempo de trânsito gastrintestinal, além de fatores externos como a alimentação e a administração concomitante de outros medicamentos (Dressman *et al.*, 1998; Kano, 2002; Manadas *et al.*, 20002). Tais fatores irão exercer influência direta nos parâmetros da biodisponibilidade, ou seja, na extensão da absorção do fármaco contido na forma farmacêutica e na velocidade com que esta absorção ocorre (Porta, 1999).

Para demonstrar a equivalência terapêutica de um produto similar com o produto de referência, submetido a todos os testes de eficácia e segurança, geralmente uma comparação farmacocinética é realizada após a administração dos dois produtos. Este procedimento é adotado em substituição aos ensaios clínicos, que geralmente requerem alto custo e longo período de tempo, além de utilizar elevado número de pacientes. Esta abordagem é baseada no princípio de que perfis similares de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo fornecerão

resultados similares em termos de eficácia e segurança, ou seja, baseado na hipótese de que existe uma relação bem definida entre a concentração do fármaco ou metabólito ativo e o efeito terapêutico (Meredith, 1996; Gleiter *et al.*, 1998).

Para que dois produtos farmacêuticos possam ser considerados equivalentes terapêuticos, devem apresentar biodisponibilidades semelhantes quando administrados ao mesmo indivíduo, nas mesmas condições experimentais e na mesma dose molar (Porta, 1999; Kano, 2002).

No Brasil, existem diversos produtos farmacêuticos contendo tinidazol, comercializados na forma de comprimidos, drágeas e suspensões. Dentre estes, até o momento, nenhum é comercializado como medicamento genérico, portanto, além do medicamento de referência, os outros produtos são similares ou alternativas farmacêuticas (Korolkovas, 2001; Dicionário de especialidades farmacêuticas, 2004; Brasil, 2005).

Existem descritos na literatura vários estudos referentes a biodisponibilidade (Mattila *et al.*, 1983; Vinge *et al.*, 1983) e farmacocinética do tinidazol (Soreide *et al.*, 1984; Solhaug *et al.*, 1984; Bergan *et al.*, 1985; Wood *et al.*, 1986).

Entretanto, com relação aos produtos farmacêuticos contendo tinidazol comercializados no mercado brasileiro, não existem estudos comparativos da biodisponibilidade entre os mesmos.

Em virtude das considerações que ocasionam a indicação de um medicamento similar como um produto intercambiável por profissionais da saúde, estudos que avaliem a bioequivalência dos mesmos, são fundamentais para garantir a segurança e eficácia destes medicamentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

No presente trabalho o objetivo geral foi avaliar a equivalência terapêutica entre comprimidos contendo tinidazol produzidos por dois diferentes fabricantes do mercado nacional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- desenvolver e validar método bioanalítico para quantificação de tinidazol em amostras de plasma humano;

- realizar ensaio de bioequivalência entre os produtos Amplium® 500 mg, produzido por Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A. – FARMASA e Pletil® 500 mg, produzido por Pharmacia Brasil Ltda.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TINIDAZOL

Tinidazol, 1-[2-(ethylsulphonyl)ethyl]-2-methyl-5-nitroimidazole (Fig. 3.1), é um membro da classe dos nitroimidazóis que apresenta atividade amebicida, giardicida, tricomonicida e em infecções sistêmicas causadas por bactérias anaeróbias (Lamp *et al.*, 1999; Korolkovas, 2001).

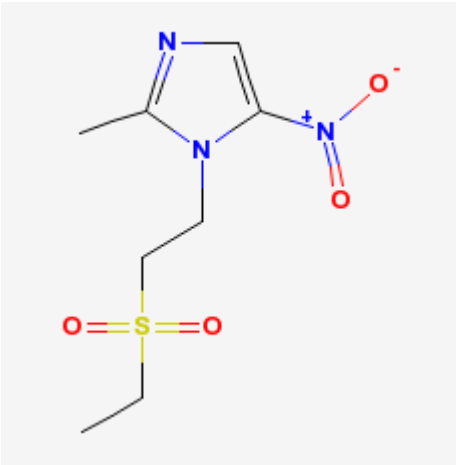


Figura 3.1 Estrutura química do tinidazol

3.1.1 MECANISMO DE AÇÃO

O tinidazol possui baixo peso molecular e atravessa as membranas celulares de microorganismos aeróbios, anaeróbios e protozoários. O acúmulo de tinidazol em um microorganismo suscetível é mediado pela redução da molécula a intermediários reativos, que são responsáveis pela atividade antimicrobiana (Nord; Kager, 1983). O mecanismo de ação está associado com a redução do grupo nitro, que se comporta como aceptor de elétrons para proteínas transportadoras de elétrons. As formas

reduzidas produzem lesões bioquímicas, tais como a perda da estrutura helicoidal do DNA, ruptura do cordão e inibição resultante da síntese de ácido nucléico, que leva à morte da célula do protozoário (Korolkovas, 2001).

3.1.2 FARMACOCINÉTICA

ABSORÇÃO

O tinidazol é rápida e completamente absorvido, apresentando biodisponibilidade média de 99% após admnistração oral (Vinge *et al.*, 1983), sendo relatados casos de biodisponibilidade média maior que 100%, como resultado da circulação enterohepática (Lamp *et al.*, 1999). Em voluntários sadios, as concentrações plasmáticas declinam através de cinética de primeira ordem e apresentam correlação linear com as doses na faixa de 150 mg a 2 g (Lau *et al.*, 1992).

Após administração oral de comprimidos contendo 500mg de tinidazol, o pico de concentração plasmática foi atingido 1,6 horas após a administração, com valor médio de 10,1 μg/mL (Mattila *et al.*, 1983). A administração oral de 2 g em dose única apresentou pico de concentração plasmática médio entre 40 e 58 μg/mL, entre 0,5 a 2 horas após a administração (Chaikin *et al*, 1982; Lamp *et al*, 1999; United States, 2004b).

DISTRIBUIÇÃO

O tinidazol difunde-se através da maioria dos tecidos e fluidos corpóreos, apresentando-se ligado às proteínas plasmáticas em cerca de 10 a 12% (Lau *et al.*,

1992; Lamp *et al.*, 1999). Concentrações teciduais tem sido determinadas no FCE (fluido cérebro espinal), sítios abdominais (bile, mucosa intestinal e peritoneal), sítios ginecológicos (secreções vaginais, útero e trompas de falópio), dentes e saliva. Na maioria dos tecidos as concentrações são similares às concentrações sanguíneas (Nord, Kager, 1983; Lamp *et al.*, 1999).

O volume de distribuição aparente é de 0,6 a 0,8 L/kg (Lau *et al.*, 1992; Lamp *et al.*, 1999).

METABOLISMO E ELIMINAÇÃO

O tinidazol é parcialmente biotransformado por oxidação, hidroxilação e conjugação. O metabólito hidroximetilado apresenta atividade antimicrobiana insignificante devido às baixas concentrações séricas atingidas (Lamp *et al.*, 1999). A biotransformação é realizada pelo sistema enzimático microsomal citocromo P-450, principalmente pela isoenzima CYP3A4 (Drug Information, 2004).

Após uma infusão intravenosa de 800 mg de 14C-tinidazol, aproximadamente 32% da dose foi recuperada na urina na forma inalterada e 12% da dose foi excretada nas fezes. O metabólito ethyl 2-(5-hydroxy-2-methyl-4-nitro-1-imidazolyl)ethyl sulphone foi encontrado em 30% da dose e 9% foi identificado como 2-hidroximetiltinidazol, que também foi encontrado no plasma (Wood *et al.*, 1986).

A meia-vida de eliminação encontra-se entre 12 e 16 horas, sendo detectáveis concentrações séricas 72 horas após a administração de 2g de tinidazol (Nilsson-Ehle *et al.*, 1981; Lau *et al.*, 1992).

O clearance renal contribui em aproximadamente 25% do clearance total, sendo relatados valores médios de clearance entre 2,3 e 2,9 L/h (Mattila *et al.*, 1983; Vinge *et al.*, 1983).

Em pacientes com insuficiência renal, a farmacocinética do tinidazol não diferiu significativamente da farmacocinética em voluntários sadios, não sendo necessário ajuste de dose. Entretanto, em pacientes submetidos a hemodiálise, o clearance é significativamente aumentado e a meia-vida reduzida. Nestes casos, é recomendado a administração de 50% da dose após a sessão de hemodiálise (Lau *et al*., 1992; Lamp *et al*., 1999; United States, 2004b).

3.1.3 INDICAÇÕES E USOS

O tinidazol é administrado oralmente no tratamento de amebíase intestinal, abcesso hepático causado por *Entamoeba histolytica,* giardíase e infecções clínicas causadas por *Thricomonas vaginalis.* Apresenta atividade *in vitro* contra muitas bactérias anaeróbicas, incluindo alguns *Bacteróides* (*B. fragilis, B. melaninogenicus*), alguns *Clostridium (C. difficile, C. perfringens*), *Prevotella, Fusobacterium, Peptococcus e Peptostreptococcus*. O fármaco é ativo também contra *Helicobacter pylori* e *Gardnerella vaginalis* (Drug Information, 2004).

Nos tratamentos para erradicação de *Helicobacter pylori*, o tinidazol é administrado em conjunto com outros fármacos (Klotz, 2000).

Na prática clínica, o tinidazol tem sido amplamente utilizado no tratamento e profilaxia de infecções bacterianas anaeróbicas pós-operatórias (Nord, Kager, 1983; Martindale, 1999; Korolkovas, 2001).

3.1.4 DOSES E ADMINISTRAÇÃO

É recomendado que a administração oral de tinidazol seja realizada com alimentação. Embora a alimentação não afete a biodisponibilidade do tinidazol (United States, 2004b), a administração com alimentação reduz a incidência de desconforto epigástrico e outros efeitos adversos (Drug Information, 2004).

Para o tratamento de amebíase intestinal e abcesso hepático causado por *Entamoeba histolytica* a dose recomendada é de 2 g diariamente, durante 3 dias para amebíase intestinal e durante 3 a 5 dias para abcesso hepático. Para crianças com idade acima de 3 anos, recomenda-se dose de 50mg/kg pelo mesmo período.

No caso de giardíase, é recomendada dose única de 2g para adultos e dose única de 50mg/kg para crianças acima de 3 anos.

A dose usual de tinidazol no tratamento de tricomoníase causada por *Thricomonas vaginalis* é uma dose única de 2 g. Neste caso, o parceiro sexual do paciente deve ser tratado simultaneamente com a mesma dose (Drug Information, 2004).

Na profilaxia e tratamento de infecções bacterianas anaeróbicas no pós-operatório, a dose recomendada é de 2 g administrados 12 horas antes da cirurgia, por via oral ou 1,6 g administrados em via intravenosa imediatamente antes da cirurgia (Martindale, 1999).

3.1.5 EFEITOS ADVERSOS

Os principais efeitos adversos relatados na literatura incluem efeitos gastrointestinais como náusea, vômito, anorexia, dispepsia, sensação de gosto metálico, desconforto epigástrico e constipação e ocorrem em aproximadamente 1% dos pacientes (Drug Information, 2004).

3.2 MEDICAMENTOS GENÉRICOS E MEDICAMENTOS SIMILARES

3.2.1 HISTÓRICO

Os medicamentos genéricos surgiram inicialmente nos países onde existiam leis de patentes para medicamentos. Nestes países, como por exemplo: Inglaterra, Estados Unidos e Alemanha, os genéricos representam atualmente mais de 40% do mercado de medicamentos (Bueno, 2004).

A introdução dos medicamentos genéricos no mercado farmacêutico do país tem por finalidade disponibilizar medicamentos de menor preço e de qualidade assegurada, que apresentem a mesma eficácia e segurança do medicamento de referência no país. O medicamento genérico é uma especialidade farmacêutica fabricada para ser intercambiável com o produto inovador ou original, que obteve o primeiro registro para comercialização. É geralmente produzido após expiração ou renúncia da patente e de direitos de exclusividade (Storpirtis, 1999).

Até pouco tempo, o Brasil não reconhecia patentes de medicamentos. A cópia era permitida e podia ocorrer simultaneamente ao lançamento do produto no mercado internacional, sem exigência dos testes de equivalência farmacêutica e/ou

terapêutica. Desta forma, não houve desenvolvimento de medicamentos genéricos no Brasil, apenas dos medicamentos similares *com* e *sem* marca.

A partir de 1996, o Brasil passou a respeitar patentes na área de medicamentos e instituiu o medicamento genérico. As patentes são concedidas aos respectivos laboratórios que pesquisam um princípio ativo ou uma molécula e documentam científica e clinicamente suas propriedades, estabelecendo parâmetros de utilização do produto. Essas patentes são concedidas por até 20 anos, e após este período, a tecnologia passa a ser de domínio público, quando poderão ser registrados os medicamentos genéricos.

Em 10 de fevereiro de 1999, foi promulgada a Lei n.9787, que estabeleceu as diretrizes, normas e critérios para a implantação dos medicamentos genéricos no Brasil, determinando os seguintes itens:

1. Os critérios e condições para o registro e controle de qualidade dos medicamentos genéricos;
2. Os critérios para as provas de biodisponibilidade de produtos em geral;
3. Os critérios para a aferição da equivalência terapêutica, mediante as provas de bioequivalência de medicamentos genéricos, para a caracterização de sua intercambialidade;
4. Os critérios para a dispensação de medicamentos genéricos nos serviços farmacêuticos governamentais e privados, respeitada a decisão expressa de não intercambialidade do profissional prescritor (Bueno, 2004).

Dessa forma, em 9 de agosto de 1999 foi publicada a Resolução RDC 391 que estabelecia o regulamento técnico para registro de medicamentos genéricos no Brasil. Esta Resolução foi revisada e revogada pelas versões posteriores (RDC 10,

2001; RDC 84, 2002; RDC 135, 2003), que implantaram novas alterações e complementaram a versão original.

Após a introdução do medicamento genérico e das ações para sua consolidação, com o objetivo de adequar o mercado de medicamentos brasileiro, foram publicadas resoluções que estabeleceram novos critérios para registro de medicamentos similares, com base na comprovação da equivalência farmacêutica e da biodisponibilidade relativa, além de critérios para adequação dos medicamentos similares já registrados aos novos padrões de qualidade, segurança e eficácia (Brasil, 2003a,b).

Para a renovação do registro de medicamentos similares já existentes no mercado e registro de novos produtos, além da equivalência farmacêutica passou a ser necessário o estudo de biodisponibilidade relativa. O termo estudo de biodisponibilidade relativa foi adotado apenas para diferenciar as provas realizadas para medicamentos similares daquelas realizadas para medicamentos genéricos, embora os estudos de biodisponibilidade relativa e de bioequivalência sejam planejados e conduzidos de forma idêntica.

3.2.2 MEDICAMENTO GENÉRICO

A intercambialidade entre o genérico e seu respectivo medicamento de referência baseia-se no conceito de equivalência terapêutica entre os mesmos, geralmente assegurada pela comprovação da equivalência farmacêutica, da bioequivalência e das boas práticas de fabricação e controle de qualidade (Storpirtis, 2004).

Para garantir a intercambialidade de medicamentos genéricos com o medicamento inovador, é necessário comprovar que ambos apresentam a mesma eficácia clínica e segurança, ou seja, são equivalentes terapêuticos. A avaliação da equivalência terapêutica por métodos convencionais geralmente requer a realização de ensaios clínicos de longa duração, que envolvem elevado número de pacientes e altos recursos financeiros. Em função destas dificuldades, a comparação clínica direta tem sido substituída por avaliações indiretas, ou seja, com base no princípio de que curvas estatisticamente semelhantes de decaimento plasmáticos de fármacos produzem o mesmo resultado em termos de eficácia e segurança (Kano, 2002).

Portanto, para que um produto seja considerado um equivalente terapêutico de um medicamento de referência, é necessário que seja um equivalente farmacêutico, ou seja, contenha a mesma quantidade do princípio ativo, na mesma forma farmacêutica e mesma via de administração, cumprindo com todas as especificações farmacopeicas vigentes e produzido em concordância com as Boas Práticas de Fabricação. Além disso, deve ser bioequivalente, não apresentando diferença significativa com relação a velocidade e extensão pelas quais o princípio ativo torna-se disponível no local de ação (Benet, 1999; Dighe, 1999).

O medicamento genérico contém o mesmo princípio ativo, na mesma dose e forma farmacêutica de um medicamento de referência, administrado pela mesma via e com a mesma indicação terapêutica e apresentando a mesma segurança do medicamento de referência no país, podendo ser, com este, intercambiável (Brasil, 1999).

3.2.3 MEDICAMENTO SIMILAR

De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil, 1999), o medicamento similar é aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, preventiva ou diagnóstica, do medicamento de referência registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes ou veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca.

Atualmente, no Brasil, para que um novo produto adquira o status de similar, e também para a renovação do registro dos produtos já comercializados, são necessários estudos que demonstrem a equivalência terapêutica dos mesmos em relação a um produto de referência.

3.3 DEFINIÇÕES

O termo biodisponibilidade foi introduzido na literatura científica no início da década de 70, com a publicação de um trabalho descrevendo as diferenças nas curvas de decaimento plasmático obtidas após a administração de quatro formulações de digoxina em voluntários sadios (Marzo, Balant, 1995). Nesta época, foram relatados episódios de intoxicação decorrentes de diferenças na biodisponibilidade de comprimidos de digoxina, o que ocasionou aumento de

interesse por estes estudos e maior divulgação dos conceitos relativos a biodisponibilidade e bioequivalência (Porta, 1999).

Atualmente, os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência constituem um dos temas mais proeminentes da área biofarmacêutica (Gleiter *et al.*, 1998; Porta, 1999).

A recente introdução de vários conceitos no mercado farmacêutico brasileiro, tais como biodisponibilidade, bioequivalência; equivalência farmacêutica e equivalência terapêutica representaram o início de muitas mudanças que visam elevar a qualidade e ampliar o acesso da população aos medicamentos.

3.3.1 BIODISPONIBILIDADE

Biodisponibilidade é definida como a fração ou porcentagem da dose de fármaco presente em determinada formulação farmacêutica que atinge a circulação sistêmica (Winter *et al.*, 1988).

A ANVISA define biodisponibilidade como sendo a velocidade e extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração x tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina (Brasil, 1999).

A EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1998) define biodisponibilidade como a velocidade e extensão pela qual a substância ativa é liberada da forma farmacêutica e torna-se disponível na circulação sistêmica.

A definição utilizada pela agência regulatória americana (United States, 2002) é a mais amplamente divulgada e define biodisponibilidade como a velocidade e

extensão pelas quais a substância ativa é absorvida do produto farmacêutico e torna-se disponível no local de ação. Para formas farmacêuticas que não pretendem liberar o fármaco na corrente sanguínea, a biodisponibilidade pode ser avaliada por medidas que refletem a velocidade e extensão pelas quais o fármaco torna-se disponível no sítio de ação.

3.3.2 BIOEQUIVALÊNCIA

Bioequivalência significa a ausência de diferença significativa na velocidade e extensão pelas quais o fármaco presente em equivalentes ou alternativas farmacêuticas torna-se disponível no local de ação, quando administrado na mesma dose molar e sob condições similares em um estudo de desenho apropriado (United States, 2004).

A EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1998) considera dois produtos farmacêuticos bioequivalentes se forem equivalentes ou alternativas farmacêuticas cujas biodisponibilidades, após administração da mesma dose molar, forem semelhantes, e tenham os mesmos resultados em termos de eficácia e segurança.

De acordo com a ANVISA, a bioequivalência consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio(s) ativo(s), e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental.

No Brasil, apenas equivalentes farmacêuticos podem ser considerados bioequivalentes, enquanto que FDA e EMEA consideram, na avaliação da bioequivalência, os equivalentes e as alternativas farmacêuticas.

3.3.3 BIODISPONIBILIDADE RELATIVA

Definida como biodisponibilidade relativa, a bioequivalência que envolve a comparação entre um produto farmacêutico teste (T) e um produto farmacêutico referência (R), onde T e R podem variar, dependendo da comparação a ser efetuada, por exemplo: produto genérico *versus* produto referência, produto com alteração na formulação ou processo de fabricação *versus* produto pré-alteração, produto farmacêutico a ser comercializado *versus* produto utilizado no estudo clínico (United States, 1999).

O termo biodisponibilidade relativa foi introduzido pela ANVISA com o intuito de diferenciar a denominação do produto teste avaliado, ou seja, quando o produto avaliado for registrado como um medicamento similar, tal denominação é utilizada para avaliação da bioequivalência com o produto inovador (Brasil, 2003a).

Biodisponibilidade relativa representa o quociente da quantidade e velocidade de princípio ativo que chega à circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um preparado e a quantidade e velocidade de princípio ativo que chega à circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um produto de referência que contenha o mesmo princípio ativo (Brasil, 2003a).

Deve-se ressaltar que a ANVISA (Brasil, 2003a) especifica que medicamentos similares deverão ser equivalentes farmacêuticos do produto referência, não abrangendo portanto, as alternativas farmacêuticas.

3.3.4 EQUIVALENTES FARMACÊUTICOS

O FDA (United States, 2004) e a ANVISA (Brasil, 1999) definem como equivalentes farmacêuticos dois produtos que contém a mesma quantidade de um mesmo fármaco, na mesma forma farmacêutica e mesmo sal ou éster da molécula terapeuticamente ativa, podendo diferir apenas em relação aos excipientes. Devem cumprir com as especificações farmacopeicas ou outros padrões de qualidade, em relação a identidade, teor, qualidade, pureza e potência, e quando aplicáveis, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução.

A EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1998) classifica como equivalentes farmacêuticos os produtos farmacêuticos que contém a mesma quantidade de fármaco(s) na mesma forma farmacêutica, e que cumprem requisitos de qualidade iguais ou comparáveis.

3.3.5 EQUIVALENTES TERAPÊUTICOS

A ANVISA (Brasil, 2003) considera dois medicamentos terapeuticamente equivalentes se estes produtos são equivalentes farmacêuticos e, após administração na mesma dose molar, seus efeitos em relação à eficácia e segurança

são essencialmente os mesmos, o que se avalia por meio de estudos de bioequivalência, ensaios farmacodinâmicos, ensaios clínicos ou estudos *in vitro.*

Um produto farmacêutico é considerado equivalente terapêutico quando contém a mesma substância ativa e clinicamente demonstre a mesma eficácia e segurança do produto cuja eficácia e segurança tenham sido estabelecidos (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1998).

3.3.6 ALTERNATIVAS FARMACÊUTICAS

Alternativas farmacêuticas são produtos farmacêuticos que contém a mesma substância ativa mas diferem na forma química do ativo, como por exemplo sal ou éster, na forma farmacêutica ou teor (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1998).

O FDA (United States, 2004) considera alternativas farmacêuticas os produtos que contém o mesmo fármaco, ou seu precursor, mas não necessariamente na mesma quantidade, forma farmacêutica ou mesmo sal ou éster. Cada produto deve cumprir, individualmente, com suas especificações farmacopeicas ou outros padrões aplicáveis de qualidade, em relação a identidade, teor, qualidade, pureza, potência e quando aplicáveis, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução.

De acordo com a ANVISA (Brasil, 1999), alternativas farmacêuticas são 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 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.

3.4 FATORES QUE AFETAM A BIODISPONIBILIDADE DE MEDICAMENTOS

A biodisponibilidade de uma forma farmacêutica administrada por via oral pode ser influenciada por diversos fatores fisiológicos e físico-químicos. Considerando-se que a absorção ocorre somente após a solubilização do fármaco, os processos de desintegração da forma farmacêutica sólida, liberação e dissolução do fármaco e sua permeabilidade através das membranas biológicas, são etapas determinantes na biodisponibilidade (Storpirtis, Consiglieri, 1995; Serra, 1998; Shargel, Yu, 1999).

Alguns autores recomendam que os termos absorção oral e biodisponibilidade oral sejam adequadamente diferenciados, pois não podem ser utilizados de forma intercambiável. A absorção oral refere-se ao movimento do fármaco através das membranas do trato gastrintestinal enquanto biodisponibilidade oral representa a disponibilidade do fármaco no sítio de medida, ou seja, a circulação sistêmica ou o sítio de ação farmacológico (Gleiter *et al.*, 1998; Chiou, 2001).

Os principais fatores que irão influenciar na biodisponibilidade de uma forma farmacêutica podem ser divididos em:

- características físico-químicas do fármaco;
- características da forma farmacêutica e seus excipientes;
- fatores fisiológicos relacionados ao trato gastrintestinal (TGI).

3.4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO FÁRMACO

O processo de absorção do fármaco através das membranas biológicas irá depender, principalmente, de sua solubilização prévia nos fluidos gastrintestinais.

A solubilidade do fármaco pode ser influenciada por diversos fatores: características do próprio fármaco como constante de dissociação e lipossolubilidade; tamanho de partícula; forma cristalina e a forma molecular apresentada (sais ou ésteres).

A solubilidade de ácidos e bases fracas é dependente de suas constantes de ionização (Ka) e do pH do meio de dissolução. Solubilidade intrínseca pode ser definida como a solubilidade de um composto na forma de ácido ou base livre. A medida que o pH do meio de dissolução aumenta, a solubilidade dos ácidos aumenta devido à contribuição da forma ionizada; o inverso ocorre no caso de bases fracas. Portanto, o pH dos fluidos gastrintestinais exerce grande influência na solubilidade de fármacos ionizáveis (Horter, Dressman, 2001).

Fármacos de caráter lipofílico, nas formas menos ionizadas podem ser absorvidos por difusão passiva através das membranas (Charman *et al.*, 1997).

Partículas de tamanho reduzido apresentam maior área de superfície de contato com o líquido do TGI, com conseqüente aumento da velocidade de dissolução e de absorção, que ocasiona alterações na biodisponibilidade (Storpirtis,

1999). A micronização para obtenção de partículas de 3 a 5 μm é freqüentemente utilizada para aumentar a velocidade de dissolução, como no caso da griseofulvina (Horter, Dressman, 2001).

Entretanto, a diminuição no tamanho da partícula nem sempre assegura absorção melhor ou mais rápida. No caso do cloridrato de tetraciclina, a administração de produtos contendo tamanhos de partículas diferentes ocasiona os mesmos níveis sanguíneos, pois o fármaco é suficientemente solúvel para que o tamanho da partícula não exerça qualquer influência sobre sua absorção (Storpirtis, 1999).

O polimorfismo, propriedade de fármacos que apresentam duas ou mais formas cristalinas diferentes, é particularmente importante na solubilidade do fármaco, pois os polimorfos metaestáveis são mais solúveis, e tenderão a se transformar nas formas estáveis, menos solúveis. O fármaco pode também existir na forma amorfa, que é mais solúvel que a forma cristalina (Serra, 1998; Storpirtis, 1999). Entretanto, o aumento da velocidade de dissolução ocasionado pela apropriada seleção polimórfica nem sempre conduz a um aumento da biodisponibilidade. Embora a solubilidade da forma metaestável do analgésico diflunisal seja duas vezes maior que da forma estável, os perfis plasmáticos obtidos após administração das duas formas não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Horter, Dressman, 2001).

No caso de fármacos de baixa solubilidade aquosa, em geral é realizada a modificação molecular para a forma de sal, que apresentará dissolução mais rápida no TGI e, portanto, maior absorção (Panchagnula, 2000). Alguns tipos de complexação também podem levar ao aumento de solubilidade de um fármaco.

Formas farmacêuticas contendo complexos fármaco-ciclodextrina apresentaram melhoria na liberação de fármacos pouco solúveis (Storpirtis, 1999).

3.4.2 CARACTERÍSTICAS DA FORMA FARMACÊUTICA

As formas farmacêuticas de administração oral mais utilizadas são: soluções, suspensões, comprimidos, drágeas e cápsulas. Dentre estas, as formas farmacêuticas sólidas (comprimidos, drágeas e cápsulas) e as suspensões apresentam maiores alterações em termos de biodisponibilidade.

As suspensões são utilizadas geralmente para veicular fármacos insolúveis ou pouco solúveis em água. Para estas formas farmacêuticas o tamanho das partículas, a forma cristalina do fármaco, a complexação do fármaco com algum excipiente, agentes tensoativos ou substâncias que aumentam a viscosidade podem ocasionar alterações na biodisponibilidade (Serra, 1998).

No caso das formas farmacêuticas sólidas, devido à tecnologia de produção envolvida e aos excipientes empregados, a ocorrência de alterações na biodisponibilidade é geralmente maior. Particularmente no caso dos comprimidos e drágeas, cuja formulação normalmente emprega diluentes, aglutinantes, desintegrantes, lubrificantes e tensoativos e a tecnologia de fabricação envolve os processos de compressão e/ou granulação, a liberação do fármaco a partir de sua forma farmacêutica constitui um processo relativamente complexo, razão pela qual é fundamental o adequado desenvolvimento farmacotécnico e controle de qualidade neste tipo de formulação (Ferraz, 1997).

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação, da dissolução ou solubilização dos mesmos em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas. Para os dois primeiros fatores, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo* (Ferraz, 1998; Kano, 2002).

Atualmente, os testes de dissolução são utilizados para garantir a qualidade lote a lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento após determinadas alterações (Brasil, 2002). Além disso, permitem a otimização durante a fase de desenvolvimento, estudos de estabilidade, monitoramento dos processos de fabricação, bem como o estabelecimento de correlações *in vivo/in vitro* (Kano, 2002).

3.4.3 FATORES FISIOLÓGICOS RELACIONADOS AO TGI

Os processos de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e passagem do fármaco através das membranas biológicas podem ser alterados por vários fatores, influenciando a absorção de fármacos. A coadministração de fármacos com alimentos, outros fármacos e componentes da formulação, além de fatores como idade e doenças do trato gastrintestinal podem ocasionar alterações na fisiologia gastrintestinal e na resposta fisiológica, resultando em aterações na absorção (Fleisher *et al*, 1999).

Dentre os fatores que influenciam a velocidade de esvaziamento gástrico, podem ser citados: conteúdo e volume do estômago, pH, calorias, osmoloridade, viscosidade, temperatura e capacidade sequestrante de cálcio. Embora a velocidade

de esvaziamento gástrico de conteúdos sólidos seja mais lenta, o conteúdo líquido calórico também controla a cinética de esvaziamento. Quando uma medicação oral é administrada com volumes maiores que 200 mL de líquidos não calóricos, não tamponados, a velocidade de esvaziamento será maior e dependente do volume administrado (Selen, 1991; Fleisher *et al.*, 1999).

O tempo de trânsito intestinal médio é de geralmente 3 a 4 horas, e, independe das condições de jejum ou alimentação. Entretanto, vários fármacos e excipientes demonstram influenciar a extensão de absorção por uma aceleração do tempo de trânsito intestinal (Fleisher *et al.*, 1999).

A habilidade da molécula em atravessar as membranas biológicas é um parâmetro importante que controla a absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos. Para que um fármaco consiga atravessar as várias membranas biológicas e atingir seu sítio de ação, deve haver um equilíbrio entre suas propriedades hidrofílicas e lipofílicas. De maneira geral, quanto maior a lipofilicidade, maiores serão o metabolismo, a ligação às proteínas plasmáticas e a distribuição. A alta ligação às proteínas plasmáticas pode resultar em interações farmacocinéticas na administração concomitante com outros fármacos (Panchagnula *et al.*, 2000).

A presença de alimentos no trato gastrintestinal pode alterar de maneira acentuada a biodisponibilidade oral de alguns fármacos, através de mudanças no tempo de trânsito, pH e capacidade de solubilização do trato gastrintestinal (Charman *et al.*, 1997).

Interações potenciais de alimentos com fármacos tem sido freqüentemente relatadas. A velocidade de absorção e a biodisponibilidade de fármacos administrados com alimentos podem sofrer influência de mudanças na velocidade de dissolução da forma farmacêutica, ligação do fármaco com constituintes dos

alimentos, alterações da motilidade e esvaziamento gástrico, mudanças no pH gástrico, degradação ou ativação de fármacos pela flora intestinal e biotransformação pré-sistêmica. Tais fatores podem aumentar, diminuir, retardar ou acelerar o processo de absorção (Fleisher *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1999).

A ingestão de carne, particularmente as com alto conteúdo de gordura, retardam o esvaziamento gástrico. O leite e derivados elevam o pH gástrico, podendo acelerar a dissolução de comprimidos de liberação entérica, que resultaria em absorção alterada e irritação gástrica. Em alguns casos, o leite e outros produtos contendo cálcio complexam-se com os fármacos, como por exemplo a norfloxacina, prejudicando sua absorção. A inibição da absorção pode ocorrer quando alguns fármacos são administrados com sucos de frutas ácidas, bebidas gasosas ou cafeína (Leibovitch *et al.*, 2004). Além disso, os nutrientes podem afetar o tempo de trânsito intestinal, o fluxo sanguíneo hepático e esplênico, e podem agir como uma barreira física para a dissolução do produto (comprimidos ou cápsulas), ligando-se ao fármaco ou impedindo que o mesmo alcance a superfície da mucosa do trato gastrointestinal (Singh *et al.*, 1999).

3.5 REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

No planejamento de um estudo de bioequivalência, várias questões devem ser consideradas para minimizar a variabilidade externa e assegurar que fatores não relacionados às formulações dos produtos influenciem na qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos. Informações com relação a farmacocinética,

farmacodinâmica e toxicidade do fármaco em estudo são essenciais para que o planejamento seja adequado (Nation, Sansom, 1994; Consiglieri, Storpirtis, 2000).

A escolha do método mais adequado para a avaliação da bioequivalência entre produtos farmacêuticos depende do objetivo do estudo, dos métodos analíticos disponíveis e da natureza do produto farmacêutico.

O método mais utilizado por ser considerado o mais exato, preciso e reprodutível é o ensaio *in vivo* em seres humanos, com determinação do fármaco ou metabólito ativo em sangue, plasma ou soro, em função do tempo. A determinação do fármaco pode ser realizada também na urina, através dos dados de excreção urinária do fármaco. Tal abordagem é utilizada para fármacos que apresentam excreção predominantemente por via renal, em velocidade constante (Marzo, Balant, 1995; Porta, 1999; United States, 2004).

No caso de formas farmacêuticas de ação tópica, que não pretendem liberar o fármaco na circulação sistêmica ou para fármacos que sofrem absorção sistêmica mas não existem métodos disponíveis para sua quantificação em fluidos biológicos, a bioequivalência pode ser avaliada através da medida de um efeito farmacológico agudo, desde que este efeito seja mensurável e esteja relacionado à eficácia do produto. Um exemplo seriam os broncodilatadores inalatórios de ação local, como o salbutamol, onde o efeito farmacológico avaliado é a brondodilatação causada pela administração do produto (Leon-Molina *et al.*, 2002; United States, 2004).

Ensaios clínicos controlados que estabelecem a segurança e eficácia do produto são considerados menos exatos, sensíveis e reprodutíveis que os métodos anteriormente citados. Este tipo de estudo requer a utilização de elevado número de pacientes, envolvendo altos recursos financeiros e maior período de tempo. São utilizados no caso de formas farmacêuticas de ação local e fármacos que sofrem

absorção sistêmica, para os quais não existe método analítico adequado à sua quantificação em líquidos biológicos e que não produzem efeito farmacológico mensurável, relacionado a eficácia (Porta, 1999; United States, 2004).

Por ser considerado o método mais exato, sensível e reprodutível, a maioria dos ensaios de bioequivalência são realizados em humanos, com medida do fármaco ou metabólito ativo em fluidos biológicos. As considerações que serão descritas a seguir tem como base este tipo de estudo.

3.5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O delineamento de estudo de bioequivalência deve ter como princípio a diminuição da variabilidade no estudo, assegurando que fatores não relacionados com as formulações não interfiram na confiabilidade dos resultados obtidos (Nation, Sansom, 1994).

O delineamento experimental mais utilizado em estudos de bioequivalência/biodisponibilidade relativa é o estudo cruzado. Neste tipo de estudo, os indivíduos são divididos em grupos e cada grupo recebe mais de uma formulação do mesmo fármaco, em períodos diferentes. Esse tipo de delineamento apresenta algumas vantagens:

- cada indivíduo serve como seu próprio controle;
- a variabilidade inter-individual é removida da comparação entre as formulações;

- com uma aleatorização apropriada de indivíduos para a seqüência de administração das formulações, o planejamento conduz a melhores estimativas para a diferença entre as formulações (Brasil, 2003f).

De maneira geral, para formas farmacêuticas orais de liberação imediata são recomendados estudos de dose única, pois geralmente apresentam maior sensibilidade na avaliação da liberação do fármaco do produto farmacêutico na circulação sistêmica. Os estudos de doses múltiplas são recomendados em algumas circunstâncias:

- sensibilidade inadequada do método analítico para quantificar o fármaco ou metabólito com exatidão e precisão adequados após uma dose única;
- formulações de liberação controlada;
- alto grau de variabilidade interindividual na biodisponibilidade;
- diferenças na velocidade de absorção mas, não na extensão da absorção;
- considerações éticas que impedem a utilização de voluntários sadios, como no caso de medicamentos citotóxicos, sendo o estudo efetuado em pacientes (Nation, Sansom, 1994; United States, 2004).

Outro importante fator a ser considerado em um estudo cruzado é o período de eliminação ou *washout*. Cada indivíduo irá receber as duas formulações, em períodos separados. O intervalo de tempo entre estes dois períodos deve garantir que nenhum efeito residual da primeira administração esteja presente no próximo período, pois a presença de efeitos residuais tem grande impacto na inferência

estatística de bioequivalência entre formulações. Este intervalo de tempo deve ser de no mínimo sete meias-vidas de eliminação do fármaco (Brasil, 2003f).

3.5.2 NÚMERO DE VOLUNTÁRIOS

O número de voluntários do ensaio deve ser adequado para assegurar, com razoável probabilidade, que resultados significativos serão obtidos (Nation, Sansom, 1994).

O poder do teste de um estudo de bioequivalência é definido como a probabilidade de aceitar a bioequivalência entre os produtos teste e referência corretamente. Para que obtenha-se um poder desejado (por exemplo, 80%) é fundamental estabelecer o número de indivíduos necessários. Existem diversas maneiras para deteminar o tamanho da amostra; a metodologia comumente utilizada é o cálculo da função do poder do teste baseado numa estimativa de coeficiente de variação intra-individual obtida através da literatura ou de um estudo piloto. O número mínimo é de 12 voluntários, sendo que na ausência de dados relativos ao coeficiente de variação do fármaco, o número de voluntários deve ser de, no mínimo, 24 (Brasil, 2003d).

De acordo com a EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1998) o número de voluntários é determinado pela variância residual associada com o parâmetro primário avaliado, estimado através de um estudo piloto, de estudos anteriores ou dados da literatura, pelo nível de significância desejado e pelo desvio suposto em relação ao produto referência. É recomendado o mínimo de 12 voluntários.

3.5.3 SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS

A participação em estudos de bioequivalência deve ser voluntária. Os pesquisadores devem esclarecer todas as características e objetivos do estudo, além da possível ocorrência de efeitos adversos. Após o esclarecimento, todos os participantes deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os participantes do estudo devem ser voluntários sadios, exceto no caso de estudos com medicamentos citotóxicos, para os quais o estudo deve ser realizado em pacientes voluntários, portadores da patologia para a qual o medicamento é indicado (Brasil, 2004). Estudos com medicamentos que reconhecidamente apresentam efeitos adversos graves devem ser cuidadosamente planejados, por questões éticas e de segurança (Marzo, 1999).

A maioria dos critérios de inclusão e exclusão na seleção de voluntários tem como objetivo minimizar as variações tanto quanto possível (Marzo, Balant, 1995).

Os critérios de inclusão poderão variar de acordo com o medicamento em estudo. Os participantes devem ser capazes de fornecer seu consentimento livre e esclarecido e ter idade entre 18 e 50 anos. Podem ser incluídos no estudo indivíduos do sexo masculino, feminino ou de ambos. Na utilização de ambos os sexos, o número de homens e mulheres deve ser igual e distribuído igualmente entre as seqüências. O peso deverá estar em um limite de ± 15% do peso considerado normal, levando-se em consideração altura e estrutura física (Brasil, 2004).

O FDA (United States, 1999) recomenda que a os participantes do estudo formem um grupo tão heterogêneo quanto possível, com um balanço razoável de homens e mulheres, jovens e idosos, e indivíduos de diferentes etnias.

A seleção de voluntários irá depender também de seu histórico médico, exames físicos e laboratoriais (Nation, Sansom, 1994; Brasil, 2000)

3.5.4 ADMINISTRAÇÃO DOS PRODUTOS

As condições do ensaio devem ser padronizadas para minimizar a variabilidade de todos os fatores envolvidos, exceto os relacionados aos produtos avaliados. Portanto, é recomendada a padronização da dieta, ingestão de fluidos, exercícios e postura durante o estudo (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2000).

De forma geral, é recomendado um período de jejum de 8 horas antes da administração do medicamento, sendo recomendados estudos com alimentação no caso de fármacos que tenham a absorção influenciada pela presença de alimentos, resultando em alterações clinicamente significativas e caso exista indicação de administração do medicamento com alimentos (Brasil, 2004).

Os produtos devem ser administrados com volume de líquido padronizado, geralmente 200 mL de água, sendo recomendado que o período de jejum continue por 4 horas após a administração dos produtos (Nation, Sansom, 1994; United States Pharmacopoeia, 2000).

3.5.5 PERÍODO DE COLETA DAS AMOSTRAS

O número e período de coleta das amostras deve ser adequado para definir os parâmetros utilizados na avaliação da bioequivalência. As coletas devem ser realizadas de maneira que seja possível determinar C_{max} e T_{max} com precisão razoável, e assegurar a estimativa exata da constante de eliminação terminal (β). A duração das coletas deve ser suficiente para definir no mínimo 80% da $ASC_{0-\infty}$., que é calculada por extrapolação.

Após a fase pós-absortiva, o intervalo de tempo entre as coletas poderá ser mais espaçado, entretanto, devem ser evitados períodos muito longos, de forma que não excedam a meia-vida de eliminação do fármaco (Nation, Sansom, 1994).

O período de coleta das amostras deve contemplar um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida do fármaco ou metabólito (Brasil, 2004).

3.5.6 RESULTADOS PARA AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA

O objetivo de um estudo de bioequivalência é demonstrar que os parâmetros relacionados a velocidade e extensão da absorção de um fármaco ou metabólito, obtidos após administração dos produtos referência e teste, são equivalentes numa faixa aceita clinicamente (Nation, Sansom, 1994).

Os parâmetros avaliados num estudo de bioequivalência do tipo cruzado, de dois períodos e dose única são:

- C_{max} = concentração plasmática máxima obtida após a administração;

- ASC_{0-t} = área sob a curva de decaimento plasmático do fármaco ou metabólito ativo, calculada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao tempo t , onde t é o último ponto de coleta);
- $ASC_{0-\infty}$ = área sob a curva de decaimento plasmático do fármaco ou metabólito ativo, do tempo zero ao infinito ;
- T_{max} = tempo necessário para atingir $C_{max.}$

Na determinação da bioequivalência são utilizados os parâmetros ASC_{0-t} e C_{max}, transformados logaritmicamente, e T_{max}. As agências regulatórias consideram dois produtos bioequivalentes quando o intervalo de confiança de 90% (IC 90%) da razão entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos estiver entre 80 e 125% (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1998; United States, 2001; Brasil, 2004).

3.6 SITUAÇÕES ESPECIAIS

3.6.1 FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO MODIFICADA

Muitos fármacos apresentam-se em formas farmacêuticas de liberação modificada em que a liberação do fámaco da matriz ocorre com cinética de ordem zero. Estas formulações tem por objetivo prolongar o período de atividade do fármaco no organismo, reduzir o número de administrações diárias e diminuir o valor de concentração máxima do fármaco (C_{max}), que freqüentemente está associado à ocorrência de efeitos adversos. Em certos casos parte da dose é incluída no núcleo

do comprimido, para liberação com cinética de ordem zero, e parte da dose na camada exterior do comprimido, para liberação imediata. (Marzo, 1995).

O FDA (United States, 2002) e a ANVISA (Brasil, 2004) recomendam que para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação modificada sejam realizados estudos de biodisponibilidade/bioequivalência em jejum e com alimentação. Devem ser realizados dois estudos, um com alimentação e um em jejum, com desenho randomizado, de dose única, dois períodos, duas seqüências e cruzado, para avaliar os efeitos da alimentação na biodisponibilidade. A formulação teste deve ser administrada em jejum em um dos períodos e com alimentação em outro período.
Estado de jejum: após um período de jejum de no mínimo 10 horas, o produto deve ser administrado aos voluntários com 240 mL de água. O jejum deve ser mantido durante 4 horas após a administração.
Estado com alimentação: a alimentação deve conter conteúdo altamente calórico (800 a 1000 calorias), sendo o produto administrado 30 minutos após o início da alimentação. Após a administração do produto, nenhuma alimentação deve ser permitida durante 4 horas.

3.6.2 DIFERENTES DOSAGENS E FORMULAÇÕES

Alguns fármacos são comercializados em várias dosagens. Nestes casos, os compêndios europeus, o FDA e a ANVISA sugerem a possibilidade de determinar a bioequivalência de apenas uma dosagem, geralmente a média ou a mais alta, extrapolando-se os resultados para as dosagens mais baixas. Para tal, as condições a seguir devem ser satisfeitas:

- os excipientes e o processo de produção são os mesmos para todas as dosagens;
- o perfil de absorção do fármaco está bem estabelecido;
- a liberação “in vitro” é similar para todas as dosagens;
- apresenta farmacocinética linear (Marzo, 1999).

3.6.3 FÁRMACOS DE ALTA VARIABILIDADE

Os requisitos atuais de bioequivalência podem não ser suficientes para fármacos que exibem um alto grau de variabilidade nos parâmetros farmacocinéticos tais como o verapamil e o nadolol. Um alto grau de variabilidade nos perfis farmacocinéticos, dificulta a avaliação da bioequivalência (Meredith, 2003).

Fármacos com cinética altamente variável podem ser observados quando:

- a variabilidade é uma característica intrínseca da molécula, freqüentemente devido a um significante metabolismo pré-sistêmico ou a um processo de absorção enteral ineficiente ou incompleto;
- o produto de referência demonstra variabilidade muito maior que o produto teste, o que compromete os resultados de bioequivalência. Neste caso, o registro do produto teste deveria ser facilitado pelas agências regulatórias;
- o produto teste apresenta uma variabilidade muito maior que o produto referência. Neste caso, o produto teste deve ser reformulado.

No primeiro caso, quando os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos dos produtos referência e teste se sobrepõe, é necessário um grande número de

voluntários para cumprir com os critérios aceitos de bioequivalência. Possíveis soluções seriam:

- trabalhar no estado de equilíbrio estacionário para diminuir a variabilidade;
- aumentar a faixa de aceitabilidade, que é de 0,80 – 1,25, principalmente para o parâmetro C_{max}, que geralmente apresenta maior variabilidade que ASC (Marzo, 1999).

3.6.4 METABÓLITOS

Em estudos de biodisponibilidade, a escolha das substâncias a serem quantificadas em fluidos biológicos deve levar em conta a concentração e a atividade das mesmas. Concentração refere-se a quantidade relativa do fármaco ou metabólito(s) em um certo volume de fluido biológico, tais como sangue ou plasma. Atividade refere-se à contribuição relativa do fármaco e seu metabólito(s) para a segurança e/ou eficácia do fármaco. Em estudos de biodisponibilidade, o fármaco e seu(s) metabólito(s) devem ser quantificados, sempre que seja analiticamente viável.

Em estudos de bioequivalência recomenda-se a quantificação do fármaco liberado da forma farmacêutica, não do metabólito. A razão para esta recomendação é que o perfil de concentração *versus* tempo do fármaco é mais sensível a mudanças da formulação que o do metabólito. Algumas exceções são apresentadas a seguir:

- a quantificação de um metabólito pode ser preferível quando os níveis do fármaco são muito baixos para permitir a quantificação no sangue, plasma ou soro por intervalo de tempo adequado. Neste caso, os resultados obtidos para

o metabólito seriam submetidos à análise do intervalo de confiança para demonstração de bioequivalência;

- nos casos de formação de metabólito em função de metabolismo pré-sistêmico e quando este metabólito contribui significativamente para a eficácia e/ou segurança do tratamento, tanto o fármaco quanto o metabólito devem ser quantificados, embora a bioequivalência seja avaliada por meio dos resultados obtidos para o fármaco (United States, 2002).

3.6.5 SUBSTÂNCIAS ENDÓGENAS

As concentrações basais de substâncias endógenas são mantidas através de um equilíbrio homeostático que previne aumentos ou diminuições deletérias ao organismo. A síntese endógena e absorção exógena freqüentemente coexistem e podem interagir uma com a outra. A fração absorvida, juntamente com a fração já presente no organismo, contribui para a concentração plasmática final da substância. Como resultado destes mecanismos, a administração oral de uma substância endógena freqüentemente produz somente leves aumentos das concentrações basais. Portanto, os níveis basais devem ser cuidadosamente mensurados durante o dia anterior à administração do produto. Num estudo de biodisponibilidade ou bioequivalência, o foco principal deve ser o aumento líquido devido à dose administrada, mas, para a maioria das substâncias endógenas, este valor é insignificante, além de estar associado a ampla variabilidade. Potássio e magnésio comportam-se de maneira similar à maioria das outras substâncias endógenas, tais como L-carnitina, ferro, alumino, tiroxina e glutamina, produzindo

apenas pequenos aumentos dos níveis basais após a administração do produto. Entretanto, o comportamento do ácido fólico é diferente, produzindo grandes aumentos nos níveis plasmáticos após administração oral.

Com a maioria das substâncias endógenas, surgem duas questões:

- com a subtração dos níveis basais dos resultados obtidos após a administração de uma substância endógena, seriam necessários centenas ou milhares de voluntários para avaliar a bioequivalência, o que é inaceitável dos pontos de vista ético e financeiro;
- sem a subtração dos níveis basais, um número de até dez voluntários seria suficiente para avaliar os valores obtidos. Entretanto, a bioequivalência calculada com este procedimento tende a demonstrar que os indivíduos são similares entre eles mesmos após a administração de duas formulações em vez de mostrar que as duas formulações são intercambiáveis.

Estudos no estado de equilíbrio estacionário, principalmente nos casos onde uma deficiência precisa ser corrigida, como no caso dos hormônios tireoidianos no hipotireoidismo, podem contornar o problema da subtração dos níveis basais. Este tipo de estudo é sugerido, quando possível (Marzo, 1999).

3.6.6 SUBSTÂNCIAS ESTEREOISÔMERAS

Em estudos de biodisponibilidade, a medida dos enantiômeros individuais pode ser importante. Em estudos de bioequivalência, o FDA (United States, 2002)

recomenda a medida da mistura racêmica num ensaio aquiral. A medida dos enantiômeros individuais é recomendada somente quando todas as seguintes condições são observadas:

- os enantiômeros exibem diferentes características farmacodinâmicas;
- os enantiômeros exibem diferentes características farmacocinéticas;
- a atividade primária de eficácia e segurança deve-se ao enantiômero em menor quantidade;
- a absorção é não-linear para ao menos um dos enantiômeros.

Nestes casos, os critérios de bioequivalência devem ser aplicados a cada um dos enantiômeros separadamente (United States, 2002).

3.6.7 FÁRMACOS DE ESTREITA FAIXA TERAPÊUTICA

O FDA (United States, 2002) e a ANVISA (Brasil, 2003) consideram produtos de estreita faixa terapêutica aqueles que contém fármacos que são sujeitos a monitoramento da concentração terapêutica ou farmacodinâmica, e/ou quando a bula do produto indica uma estreita faixa terapêutica. Exemplos incluem: digoxina, lítio, fenitoína, teofilina e varfarina. É recomendado que os pesquisadores responsáveis considerem testes ou controles adicionais nestes casos, de forma a assegurar a intercambialidade destes produtos. Recomenda-se que os limites tradicionais de 80 – 125% permaneçam inalterados para as medidas de bioequivalência (ASC e C_{max}) de fármacos de estreita faixa terapêutica.

3.7 BIOEQUIVALÊNCIA INDIVIDUAL, MÉDIA E POPULACIONAL

Na bioequivalência média a análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos ASC (área sob a curva) e C_{max} (concentração plasmática máxima) é realizada para determinar se os valores médios para os parâmetros farmacocinéticos medidos após administração dos produtos T e R a um grupo de voluntários são comparáveis. Este procedimento envolve o cálculo do IC 90% para a razão das médias dos parâmetros para os produtos T e R. Para estabelecer a bioequivalência, o intervalo de confiança calculado deve estar dentro de um limite de bioequivalência, geralmente 80 – 125% para a razão das médias. Atualmente, a bioequivalência média é aceita para o registro de medicamentos pelo FDA, EMEA, ANVISA e outras agências regulatórias

O FDA (Unites States, 1999) recomenda que a bioequivalência média seja suplementada com duas novas abordagens, denominadas bioequivalência individual e bioequivalência populacional, em função da limitações da bioequivalência média. A bioequivalência média realiza apenas a comparação entre as médias das medidas de bioequivalência de interesse e não avalia as variâncias das medidas dos parâmetros; tampouco avalia a interação sujeito-formulação, ou seja, a variação na diferença entre T e R entre os indivíduos. Em contraste, as bioequivalências populacional e individual incluem comparações das médias e variâncias das medidas em estudo. A bioequivalência populacional avalia a variabilidade total da medida na população e a bioequivalência individual avalia a variabilidade intra-sujeito dos produtos T e R, assim como a interação sujeito-formulação.

A avaliação das bioequivalências populacional e individual reflete diferenças que estão incorporadas nos conceitos de *prescribability* e *switchability*.

Prescribability refere-se a intercambialidade do produto para um novo paciente, ou seja, quando o médico prescreve o produto ao paciente pela primeira vez. Neste caso, é necessário que o medicamento T apresente a mesma eficácia e segurança do produto R quando prescrito a pacientes em início de tratamento e pode ser constatada pela bioequivalência populacional. *Switchability* refere-se a intercambialidade para o mesmo paciente, ou seja, quando o médico prescreve o produto T em substituição a um produto R já utilizado e com a dose individualizada. Nesta circunstância, é necessário assegurar que o produto T apresentará a mesma eficácia e segurança do produto que está sendo substituído, neste paciente em particular, o que pode ser constatado pela bioequivalência individual (Chow, Liu, 2000; Midha, Hubbard, 1994).

3.8 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

O sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) é um sistema de classificação baseado na solubilidade aquosa e na permeabilidade intestinal dos fármacos. De acordo com o SCB, os fármacos podem ser classificados em:

- classe 1: alta solubilidade e alta permeabilidade;
- classe 2: baixa solubilidade e alta permeabilidade;
- classe 3: alta solubilidade e baixa permeabilidade;
- classe 4: baixa solubilidade e baixa permeabilidade (Amidon *et al.*, 1995).

Adicionalmente, as formas farmacêuticas de liberação imediata são classificadas como tendo dissolução lenta ou rápida. Os critérios para a determinação da solubilidade, permeabilidade e dissolução são descritos a seguir:

Solubilidade

Um fármaco é considerado altamente solúvel quando sua dosagem mais elevada é solúvel em 250 mL ou menos de meio aquoso, numa faixa de pH de 1 a 7,5.

Permeabilidade

A permeabilidade é baseada indiretamente na extensão da absorção (fração da dose absorvida) de um fármaco em humanos e diretamente na medida da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal. Na ausência de evidências sugerindo instabilidade no trato gastrintestinal, um fármaco é considerado altamente permeável quando a extensão da absorção em humanos é igual ou maior a 90% de uma dose administrada, baseada na determinação do balanço de massa ou em comparação a uma dose intravenosa de referência.

Dissolução

Um produto farmacêutico de liberação imediata é considerado de dissolução rápida quando no mínimo 85% da dose é dissolvida em até 30 minutos, utilizando aparato 1 a 100 rpm ou aparato 2 a 50 rpm em um volume de 900 mL, ou menos, dos seguintes meios:

- HCl 0,1N ou fluido gástrico simulado sem enzimas;
- Tampão pH 4,5;
- Tampão pH 6,8 ou fluido intestinal simulado sem enzimas (Amidon *et al.*, 1995; United States, 2000).

De acordo com este sistema, quando certos critérios são atingidos, o SCB pode ser utilizado como uma ferramenta para justificar a isenção de ensaios de bioequivalência (Yu *et al.*, 2002).

Diferenças observadas na velocidade e extensão de absorção de um fármaco a partir de dois produtos equivalentes farmacêuticos podem ser devidas a diferenças na dissolução do fármaco *in vivo*. Entretanto, quando a dissolução *in vivo* de um produto farmacêutico de liberação imediata é rápida em relação ao tempo de esvaziamento gástrico e o fármaco tem alta permeabilidade, é improvável que a velocidade e extensão da absorção sejam dependentes da dissolução ou do tempo de trânsito intestinal. Nestas circunstâncias, a demonstração de bioequivalência ou biodisponibilidade *in vivo* pode não ser necessária para produtos contendo fármacos de classe 1, desde que os excipientes do produto não afetem a absorção do fármaco. Portanto, o SCB pode ser utilizado para justificar a bioisenção de produtos farmacêuticos de liberação imediata contendo fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade, que exibem rápida dissolução *in vitro* (United States, 2000; Loremberg, Amidon, 2000; Yu *et al*., 2002).

3.9 CORRELAÇÃO *IN VITRO IN VIVO*

A correlação *invitro/invivo* pode ser definida como um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma característica *in vitro* da forma farmacêutica e uma resposta variável *in vivo*. Geralmente, a característica *in vitro* é a velocidade de dissolução ou liberação do fármaco, e a resposta *in vivo* é a concentração plasmática do fármaco ou a quantidade absorvida de fármaco em função do tempo (Alvarez, 2002).

Geralmente podem ser estabelecidos três níveis de correlação: *C* que avalia um único ponto entre um parâmetro da dissolução e um parâmetro farmacocinético;

B que se baseia no tempo médio de dissolução (TMD) *in vitro* comparada ao tempo médio de residência (TMR) ou ao TMD *in vivo* e *A* que é obtida pela sobreposição do perfil de dissolução *in vitro* com a curva de concentração plasmática *versus* tempo *in vivo* (Souza, 2005; Manadas *et al*, 2002).

O estabelecimento de uma correlação *in vitro/in vivo* pode minimizar custos no desenvolvimento e pesquisa de novas opções terapêuticas. Entretanto, esta correlação pode ser aplicada somente a formas de dosagem de liberação modificada e não para formas de liberação imediata (Kano, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 AMOSTRAS

Foram avaliadas amostras de comprimidos de liberação imediata contendo 500 mg de tinidazol provenientes de dois laboratórios farmacêuticos do mercado nacional, conforme descrito a seguir:

- **Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A. – FARMASA**

  Produto: Amplium® 500 mg

  Lote: 1732

  Data de fabricação: 03/2004

  Data de validade: 03/2008

- **Pharmacia Brasil Ltda**

  Produto: Pletil® 500 mg

  Lote: G311

  Data de fabricação: 03/2004

  Data de validade: 03/2008

4.1.2 PADRÃO DE REFERÊNCIA

Todas as análises foram realizadas utilizando-se padrão secundário de tinidazol lote 04020635 0, teor de pureza 99,0%, com validade até dezembro de

2008, fornecido por Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A. – FARMASA e padrão secundário de metronidazol (padrão interno) lote 03071103, teor de pureza de 99,35%, com validade até julho de 2007, fornecido por Sunji Trading Corporation.

4.1.3 SOLVENTES, REAGENTES E MATERIAIS

Foram utilizados os seguintes solventes, reagentes e materiais:

- metanol grau HPLC EM Science;
- acetonitrila grau HPLC EM Science;
- água ultrapura obtida em equipamento Millipore, modelo MilliQ Academic;
- fosfato de potássio monobásico p.a. Merck;
- membranas filtrantes Sartorius de acetato de celulose regenerada com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 μm;
- plasma branco fornecido pelo banco de sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
- nitrogênio White Martins;
- seringa de vidro de 10 mL;
- balão volumétrico Pirex® de100 mL;
- frascos de polipropileno de 4 mL;
- unidades filtrantes Millipore, tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore® de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 μm;
- tubos de ensaio de 10 mL;
- tubos cônicos de 10mL;

- ponteiras descartáveis Brand® ;
- gelo seco;
- coluna cromatográfica Varian®, modelo Microsorb® 100-5 C18, de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μm;
- pré-coluna cromatográfica Phenomenex®, modelo AJO-4287 C18, de 5 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μm;

4.1.4 EQUIPAMENTOS

Utilizaram-se os equipamentos a seguir:

- cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu composto por uma bomba quaternária LC-10ADvp, desgaseificador DGU-14A, injetor automático de amostras SIL-10ADvp, detector *diode array* SPD-M19Avp, forno de coluna CTO-10ADvp; unidade de controle SCL-10ADvp; software Shimadzu Class-VP®, version 5.032;
- microcomputador DELL e impressora HP 840C, acoplados ao cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu;
- balança analítica Metler Toledo, modelo AB 204-S;
- centrífuga Heraeus , modelo Megafuge 2.0 D37520;
- agitador de tubos Phoenix;
- banho ultrassônico Odontobrás, modelo 2840D;
- banho termostático Fisaton, Modelo 577;
- pipetas automáticas de volume fixo de 25, 100, e 500 μL Brand Transferpette;

- pipeta automática de volume variável de 100 a 1000 µL Eppendorf®;
- pipeta automática de volume variável de 0,5 a 5,0 mL Eppendorf®.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL EM PLASMA

Estão descritos na literatura alguns métodos para quantificação de tinidazol em plasma através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção ultra-violeta (Lanbeck; Lidstrom, 1979; Nilsson-Ehle *et al.*, 1981; Viitanen *et al.*, 1983; Habel *et al.*, 1997;Rajnarayana *et al.*, 2002; Krishnaiah *et al.*, 2003).

No presente trabalho, desenvolveu-se e validou-se método exato, preciso, sensível e reprodutível para quantificação de tinidazol em plasma, utilizando-se metronidazol como padrão interno, conforme descrito a seguir.

4.2.1.1 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL

A purificação de amostras de plasma padrão da curva de calibração, amostras de plasma branco, amostras de plasma de controle de qualidade e amostras de plasma de voluntários que receberam tinidazol foi realizada através de precipitação de proteínas plasmáticas com acetonitrila. Adicionaram-se 500 µL de

plasma a tubos de ensaio contendo 25 μL de solução de padrão interno (metronidazol) em metanol na concentração de 60 μg/mL, previamente evaporados em corrente de nitrogênio, homogeneizando-se em agitador de tubos por 15 segundos. A seguir, procedeu-se à precipitação das proteínas plasmáticas adicionando-se 2,0 mL de acetonitrila e homogeneizando-se em agitador de tubos por 60 segundos. Após centrifugação das amostras a 3500 rpm por 10 minutos, o extrato orgânico foi filtrado em unidade HV Millex com membrana Durapore® de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 μm. O filtrado foi transferido para tubo cônico e evaporado em corrente de gás nitrogênio com auxílio do banho-maria à temperatura de 40°C. Ressuspendeu-se o resíduo em 500 μL de fase móvel para injeção em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

4.2.1.2 PREPARO DE AMOSTRAS DE PLASMA PADRÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para garantir a estabilidade das amostras de plasma padrão da curva de calibração, estas foram preparadas diariamente a partir de soluções-padrão de 0,2 μg/mL, 0,5 μg/mL, 5 μg/mL, 20 μg/mL, 30 μg/mL, 45 μg/mL, 60 μg/mL e 75 μg/mL de tinidazol em metanol. Tomaram-se alíquotas de 100 μL de solução-padrão de tinidazol em metanol e 25 μL de solução-padrão de metronidazol a 60,0 μg/mL em metanol, evaporando-se o solvente em corrente de nitrogênio. Adicionaram-se 500 μL de plasma branco e as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex por 15 segundos.

A Tabela 4.1 apresenta as diluições realizadas para obtenção das amostras de plasma padrão da curva de calibração.

Tabela 4.1 Obtenção de amostras de plasma padrão de tinidazol da curva de calibração.

Concentração da solução-padrão de tinidazol	Alíquota	Volume de plasma branco	Concentração final de tinidazol
0,2 μg/mL	100 μL	500 μL	**0,04 μg/mL**
0,5 μg/mL	100 μL	500 μL	**0,1 μg/mL**
5,0 μg/mL	100 μL	500 μL	**1,0 μg/mL**
20,0 μg/mL	100 μL	500 μL	**4,0 μg/mL**
30,0 μg/mL	100 μL	500 μL	**6,0 μg/mL**
45,0 μg/mL	100 μL	500 μL	**9,0 μg/mL**
60,0 μg/mL	100 μL	500 μL	**12,0 μg/mL**
75,0 μg/mL	100 μL	500 μL	**15,0 μg/mL**

4.1.2.3 PREPARO DE AMOSTRAS DE PLASMA DE CONTROLE DE QUALIDADE

Para preparação das amostras de plasma de controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), transferiram-se alíquotas de solução-padrão de tinidazol em metanol, nas concentrações de 10,0 μg/mL ou 2000,0 μg/mL, conforme descrito na Tabela 4.2, para balões volumétricos de 100 mL. A seguir, adicionou-se lentamente o plasma branco e homogeneizou-se gentilmente para evitar a formação de espuma. Após completar o volume agitou-se vigorosamente para garantir a homogeneização.

Após o preparo, estas amostras foram aliquotadas em frascos de polipropileno de 4 mL , devidamente identificados. Um conjunto de amostras foi analisado (amostra zero) e as demais foram armazenadas em freezer a -20°C.

Tabela 4.2 Obtenção de amostras de plasma de controle de qualidade de tinidazol.

Controle de Qualidade	Concentração da solução-padrão de tinidazol	Alíquota	Volume de plasma	Concentração final de tinidazol
CQB	10,0 μg/mL	1000 μL	100 mL	0,1 μg/mL
CQM	2000,0 μg/mL	300 μL	100 mL	6,0 μg/mL
CQA	2000,0 μg/mL	600 μL	100 mL	12,0 μg/mL

4.2.1.4 CONDIÇÕES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Empregou-se para separação coluna de marca Varian®, modelo Microsorb® 100-5 C18, de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μm, precedida de pré-coluna Phenomenex®, modelo AJO-4287 C18, de 5 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μm.

A fase móvel foi constituída por mistura de solução de fosfato de potássio monobásico 20 mM, metanol e acetonitrila, na proporção de 80:10:10 (v/v/v). O fluxo

da fase móvel e temperatura da coluna utilizados foram de 1,0 mL/min e 40°C, respectivamente.

O comprimento de onda selecionado foi de 320 nm, e, foram injetados 50µL de extrato reconstituído no sistema cromatográfico.

4.2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL EM PLASMA

A validação foi realizada conforme critérios relatados por Bressole *et al.* (1996) e Causon (1997) e estabelecidos pelas diretrizes para validação de métodos bioanalíticos do FDA (United States, 2001) e da ANVISA (Brasil, 2003e).

Foram determinados os parâmetros especificidade, recuperação, limite de deteção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade.

4.2.2.1 ESPECIFICIDADE

Especificidade é definida como a capacidade do método em diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra (Causon, 1997). Na análise de amostras biológicas, interferentes potenciais incluem componentes endógenos, metabólitos, produtos de decomposição ou medicação administrada concomitantemente ao estudo (United States, 2001).

Tal parâmetro foi investigado pela análise de seis amostras de plasma branco para verificação da existência de interferência por parte de componentes

endógenos, sendo uma amostra de plasma lipêmico, uma amostra de plasma hemolisado e quatro amostras de plasma normal, obtidas de voluntários sadios e isentas de fármaco e padrão-interno (Brasil, 2003e). A amostra de plasma lipêmico foi obtida após ingestão de refeição rica em gordura, enquanto que a amostra de plasma hemolisado foi obtida por congelamento e descongelamento de sangue de voluntário e posterior centrifugação a 3500 rpm durante 15 minutos.

4.2.2.2 RECUPERAÇÃO

A recuperação corresponde à relação entre o resultado obtido na análise de amostra submetida ao procedimento de extração e o resultado obtido na análise de amostra não submetida ao procedimento de extração. Embora porcentagens de recuperação próximas a 100% sejam desejáveis, admitem-se valores menores de recuperação, desde que o método seja preciso e exato (Brasil, 2003e).

A recuperação foi determinada comparando-se resultados de análises de amostras de plasma adicionado de padrão de tinidazol e padrão-interno, submetidas ao processo de extração, a resultados de análises de amostras de tinidazol e padrão interno em metanol, não submetidas a esse processo, em três diferentes concentrações para tinidazol (concentrações das amostras de controle de qualidade) e seis repetições.

4.2.2.3 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção é a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído do equipamento (Brasil, 2003e).

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

4.2.2.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO INFERIOR

O limite de quantificação inferior representa a menor concentração quantificável com exatidão e precisão aceitáveis (Brasil, 2003e).

Para estabelecer este parâmetro, utilizaram-se concentrações decrescentes do fármaco, em seis repetições, até o menor nível detectado com precisão e exatidão dentro dos limites estabelecidos. A exatidão deve estar entre ± 20 % do valor nominal da concentração, com precisão, indicada pelo coeficiente de variação de, no máximo, 20 % (Bressole *et al.*, 1996).

4.2.2.5 LINEARIDADE

A linearidade indica a relação entre concentração do analito e resposta do método, representada, neste estudo, pela área do pico cromatográfico (Bressolle *et al.*, 1996). A preparação da curva de calibração deve ser realizada na mesma matriz biológica das amostras que serão analisadas, através da adição de concentrações

conhecidas do analito, escolhidas com base na faixa de concentração esperada (United States, 2001) .

Para a construção da curva de calibração utilizaram-se amostras de plasma adicionado de padrão de tinidazol em oito concentrações diferentes, em seis repetições. O intervalo da curva de calibração incluiu o limite de quantificação inferior e concentrações correspondentes a 80% da concentração mais baixa e a 120% da concentração mais alta que se pretendia analisar. Estabeleceu-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x) e área do pico, considerada variável dependente (y). Os parâmetros da correlação foram estimados através do método dos mínimos quadrados (Brasil, 2003e).

4.2.2.6 PRECISÃO

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância dos resultados obtidos quando o procedimento analítico é aplicado repetidamente (United States, 2001).

Esse parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações e em cinco réplicas no mesmo ensaio (precisão intra-ensaio) ou em quatro dias diferentes (precisão inter-ensaios), sendo calculado através da seguinte equação:

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

4.2.2.7 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é uma medida de erro sistemático e é definida como concordância entre o valor determinado e o valor real (Causon, 1997).

O referido parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações e em cinco repetições no mesmo ensaio (exatidão intra-ensaio) ou em quatro dias diferentes (exatidão inter-ensaios), sendo calculado segundo a equação:

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

4.2.2.8 ESTABILIDADE

A estabilidade de um fármaco numa matriz biológica é dependente de suas propriedades químicas, das condições de armazenamento, do tipo de matriz biológica e do material de acondicionamento (United States, 2001).

A determinação da estabilidade é fundamental para garantir que a concentração da substância a ser analisada não sofreu alteração no intervalo de tempo entre a coleta e a análise (Causon, 1997).

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras (Brasil, 2003e).

Determinou-se a estabilidade das soluções-padrão mantidas à –20ºC utilizadas para preparação diária da curva de calibração, de amostras de plasma

mantidas a -20°C e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento, de amostras de plasma descongeladas e mantidas à temperatura ambiente durante 4 horas, de amostras de plasma processadas e mantidas por 24 horas e 60 horas à temperatura ambiente e estabilidade durante o intervalo de tempo entre a coleta das amostras e sua análise, conforme recomendado pela ANVISA (Brasil, 2003e).

4.2.2.8.1 ESTABILIDADE EM CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

Para determinar este parâmetro foram utilizadas triplicatas amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações, submetidas às seguintes condições: congelamento a –20°C por 12 horas, descongelamento e recongelamento por mais 12 horas e assim sucessivamente até completar três ciclos. A concentração do fármaco nas amostras de plasma de controle de qualidade foi determinada nos três ciclos, inclusive no tempo zero, correspondente à preparação das amostras de plasma de controle de qualidade e análise das mesmas antes do congelamento.

4.2.2.8.2 ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO

Foram utilizadas triplicatas de amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações, submetidas a descongelamento natural e mantidas a temperatura ambiente durante 4 horas. Após este período, as amostras foram analisadas e os resultados comparados com os da amostra zero.

4.2.2.8.3 ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO

Este parâmetro avaliou a estabilidade das amostras processadas, contemplando o período de espera no auto-injetor do cromatógrafo. Triplicatas de amostras de controle de qualidade processados, em três concentrações, foram analisados após 24 e 60 horas a temperatura ambiente.

4.2.2.8.4 ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO

Este parâmetro avaliou a estabilidade das amostras durante o período de tempo entre a data da coleta das amostras de plasma de voluntários que receberam tinidazol e a data do término das análises. Os resultados das amostras de controle de qualidade analisadas em triplicata, em três concentrações diferentes, após 35 dias mantidas a –20ºC, foram comparados com os resultados de amostras recém-preparadas.

4.2.2.8.5 ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES-PADRÃO

Para avaliar a estabilidade das soluções-padrão em metanol, estas foram analisadas diariamente durante as etapas de validação e análise de amostras de voluntários, com monitoramento diário das áreas dos picos cromatográficos obtidos. Os resultados obtidos diariamente foram comparados com os resultados de amostras recém-preparadas.

4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL NAS AMOSTRAS DE PLASMA

A quantificação de tinidazol nas amostras de plasma foi realizada conforme metodologia analítica descrita no item 4.2.1.1.

As amostras de plasma de voluntários que receberam tinidazol foram analisadas paralelamente a curva de calibração com oito pontos e amostras de plasma de controle de qualidade em triplicata, quadruplicata ou quintuplicata, em três diferentes concentrações:

- Controle de qualidade alto (CQA): 12,0 μg/mL
- Controle de qualidade médio (CQM): 6,0 μg/mL
- Controle de qualidade baixo (CQB): 0,1 μg/mL

A curva de calibração e amostras de controle de qualidade são amostras padrão de concentração conhecida, preparadas adicionando-se o fármaco à matriz biológica em estudo.

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

4.2.4 ENSAIO CLÍNICO DE BIOEQUIVALÊNCIA

O protocolo clínico do ensaio de bioequivalência foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (ANEXO A).

4.2.4.1 CASUÍSTICA

O estudo foi realizado em humanos, de acordo com as normas éticas internacionais e nacionais para ensaios desta natureza e com a regulamentação estabelecida pela ANVISA (Brasil, 2000).

Foram selecionados para este estudo 26 voluntários sadios, sendo 13 do sexo masculino e 13 do sexo feminino, com idade média de 30 anos, peso e altura médios de 64 kg e 168 cm, respectivamente (Tabela 4.3), devidamente informados sobre as características da pesquisa e que assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, em duas vias.

Os voluntários satisfizeram os seguintes critérios:

- ⇨ não fumantes;
- ⇨ bom estado de saúde, idade entre 21 e 45 anos e peso dentro do ideal ± 15 %, calculado pela fórmula PI = 0,9 (H – 100) em que PI é o peso ideal (kg) e H, a altura do voluntário (cm);
- ⇨ ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;

- ⇨ sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;
- ⇨ não estavam em tratamento com medicamentos;
- ⇨ voluntários do sexo feminino não estavam em estado de gravidez (comprovado através de exame laboratorial) ou em período de amamentação.

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

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

Tanto o exame clínico quanto os exames laboratoriais, exceto a sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C, foram repetidos no período pós-estudo.

Tabela 4.3 Características dos voluntários incluídos no ensaio de bioequivalência de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol.

Voluntário	Sexo	Idade (anos)	Altura (cm)	Peso (Kg)	DPI (%)
1	M	21	169	57	-8
2	M	22	167	59	-3
3	M	26	169	67	8
4	M	24	172	70	8
5	M	26	179	75	5
6	M	31	163	58	2
7	M	21	169	56	-10
8	M	23	192	85	3
9	M	40	163	65	14
10	M	27	178	64	-9
11	M	31	191	80	-3
12	M	37	186	88	14
13	M	35	171	73	14
14	F	30	169	66	5
15	F	35	164	63	9
16	F	39	166	68	14
17	F	22	169	65	5
18	F	38	167	57	-6
19	F	21	166	63	5
20	F	26	148	48	11
21	F	26	156	51	1
22	F	36	156	55	10
23	F	31	162	61	9
24	F	33	159	53	0
25	F	31	163	58	2
26	F	36	165	67	14
	Média	30	168	64	4
	DP	6	10	10	8

D.P.I. = desvio do peso ideal; D.P. = desvio padrão

4.2.4.2 PROCEDIMENTO DO ENSAIO DE BIOEQUIVALÊNCIA

O estudo foi do tipo quantitativo direto com delineamento aleatório, cruzado e aberto, formando-se dois grupos com igual número de voluntários, A e B.

Na Fase 1, os voluntários do grupo A receberam 1 comprimido de Pletil® contendo 500 mg de tinidazol, empregado como produto referência, enquanto que os do grupo B receberam 1 comprimido de Amplium® contendo 500 mg de tinidazol, considerado como o produto teste. Na Fase 2 o procedimento foi repetido, invertendo-se os grupos. Entre as fases houve um período de "wash out" de 7 dias, correspondente a, no mínimo, 10 vezes o valor da meia-vida de eliminação da tinidazol.

O desenho amostral para o estudo de bioequivalência de comprimidos de tinidazol está detalhado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Desenho amostral para ensaio de bioequivalência de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol.

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

R = produto referência (Pletil® lote G311, produzido por Pharmacia Brasil Ltda);

T = produto teste (Amplium® lote 1732, produzido por Laboratório Americano de Farmacoterapia S/A - Farmasa);

M = masculino;

F = feminino

4.2.4.3 LOCAL E FORMA DE INTERNAÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Os voluntários foram internados na noite anterior ao estudo, aproximadamente às 19:30 horas, no Hospital Universitário da USP. Receberam jantar padronizado às 20:30 horas e, após as 23:00 horas, a ingestão de qualquer alimento ou líquido foi proibida. Permaneceram em jejum até a administração dos medicamentos, que ocorreu às 7:00 horas. Nas duas fases, os voluntários permaneceram no local do ensaio durante, aproximadamente, 24 horas, para coletas até a décima segunda hora após a administração, retornando ao hospital para as demais coletas, mas sem internação.

4.2.4.4 ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS

Os produtos foram administrados aos voluntários pela manhã, após jejum de 8 horas, e foram ingeridas com auxílio de 200 mL de água à temperatura ambiente.

4.2.4.5 PERÍODO DE JEJUM E ALIMENTAÇÃO

O período de jejum antes da administração dos medicamentos foi de, no mínimo, 8 horas.

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

Foram, ainda, orientados a não ingerir bebidas alcoólicas, café e outras bebidas xânticas 48 horas antes do ensaio, e, durante a sua realização, estas bebidas não foram oferecidas. Além disso, foram orientados a não tomarem qualquer medicamento uma semana antes do estudo ou durante sua realização.

4.2.4.6 COLETA, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de 8 mL de sangue em tubo heparinizado 0; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 36; 48 e 72 horas após a administração dos produtos. As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos e o plasma, aliquotado em duplicata, foi armazenado a -20°C até a realização das análises de quantificação do fármaco.

4.2.5 AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS PRODUTOS

A bioequivalência entre os produtos foi determinada após quantificação de tinidazol nas amostras de plasma provenientes do estudo clínico, através da comparação dos parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção do fármaco a partir das duas formulações (Ritschel, 1992; Shargel, Yu, 1999; Dipiro *et al.*, 1996; Winter, 1988).

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 total 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 da fase terminal. Recomenda-se que a ASC_{0-t} seja igual ou superior a 80% da $ASC_{0-\infty}$.

- 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 indicador da 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 relativos à eliminação:

- $t_{(1/2)el}$: meia-vida de eliminação plasmática do fármaco, calculada por meio da fórmula: $t_{(1/2)el} = 0{,}693/ k_{el}$

- ⇨ 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.

4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada conforme recomendado pelo FDA (United States, 2001), pela ANVISA (Brasil, 2003f) e de acordo com os critérios relatados por Pabst, Jaeger (1990); Rescigno (1992), Powers (1993), Ormsby (1994), Chow; Liu (2000) e Senn (2001). Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e da construção do intervalo de confiança 90 %. Foi realizada análise multivariada, utilizando-se análise de variância (ANOVA), para os parâmetros C_{max}, t_{max}, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$, na escala original e na escala logarítmica. Em seguida, foi determinado o intervalo de confiança 90 % (I.C. 90 %) para as relações entre os valores de C_{max}, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ dos produtos teste e referência, utilizando-se para tal 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:

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

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

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

no qual:

$ASC_{0\text{-}t}$ = área sob a curva, do tempo zero a t (tempo relativo à última concentração determinada experimentalmente)

$ASC_{0\text{-}\infty}$ = área sob a curva, do tempo zero a infinito

C_{max} = concentração plasmática máxima

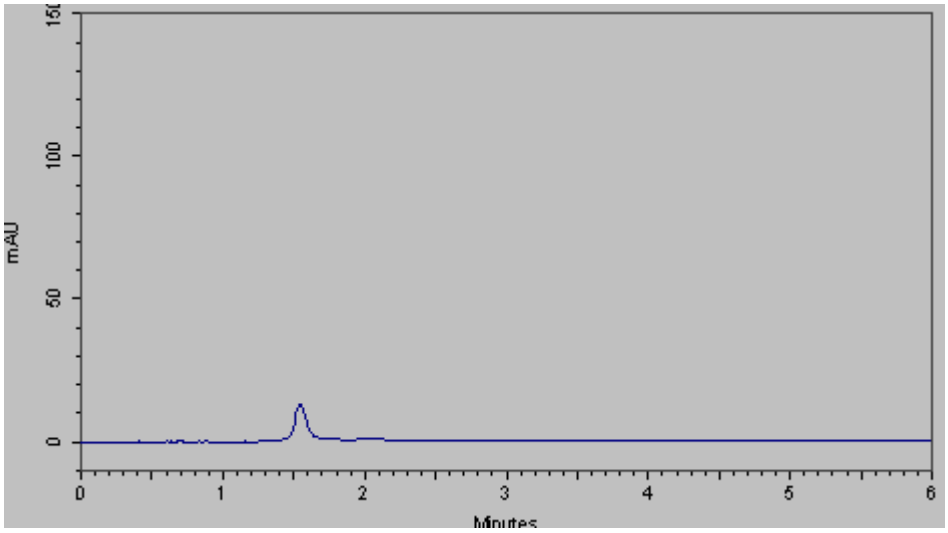
5 RESULTADOS

5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL EM PLASMA

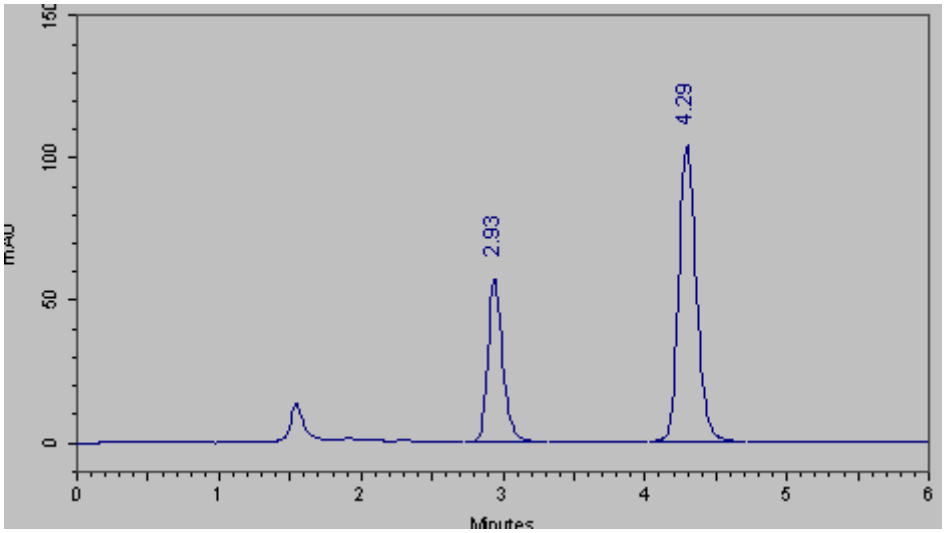
O método desenvolvido demonstrou-se adequado à quantificação de tinidazol em amostras de plasma, apresentando especificidade, recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão e estabilidade dentro dos limites estabelecidos (United States, 2001; Brasil, 2003e), conforme descrito a seguir.

5.1.1 ESPECIFICIDADE

O método desenvolvido demonstrou-se específico para tinidazol e metronidazol (padrão interno), obtendo-se boa separação destes entre si e dos componentes do plasma normal, lipêmico ou hemolisado, com tempos de retenção de 4,29 e 2,93 minutos, respectivamente (Figura 5.1).



(A)



(B)

Figura 5.1 Cromatogramas referentes a amostras de: (A) – plasma obtido de voluntário sadio antes da administração oral de 500 mg de tinidazol; (B) – plasma obtido de voluntário sadio 1 hora após administração oral de 500 mg de tinidazol (tempo de retenção = 4,29 minutos), adicionado de padrão interno (tempo de retenção = 2,93 minutos).

5.1.2 RECUPERAÇÃO

A recuperação média da extração foi de 102,9 % para tinidazol e 99,94 % para metronidazol, com precisão e exatidão dentro dos limites especificados (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Recuperação média do procedimento de purificação das amostras de plasma para tinidazol (padrão) e metronidazol (padrão interno). Cada valor representa a média de seis determinações.

Concentração de tinidazol (µg/mL)	Recuperação (%)	
	Padrão (CV%)	Padrão interno (CV%)
0,1	110,00 (3,71)	103,70 (1,83)
6,0	107,76 (1,28)	107,29 (0,84)
12,0	90,94 (7,86)	88,83 (8,54)
Média	102,9 (10,12)	99,94 (9,79)

CV = coeficiente de variação

5.1.3 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção do método foi de 0,02 µg/mL.

5.1.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO INFERIOR

O limite de quantificação inferior do método foi de 0,04 µg/mL, com precisão de 3,10% e exatidão de 99,23%.

5.1.5 LINEARIDADE

O método mostrou-se linear entre as concentrações de 0,04 e 15,0 µg/mL. A Figura 5.2 apresenta a reta de calibração, e os parâmetros relativos a ela estão representados na Tabela 5.2.

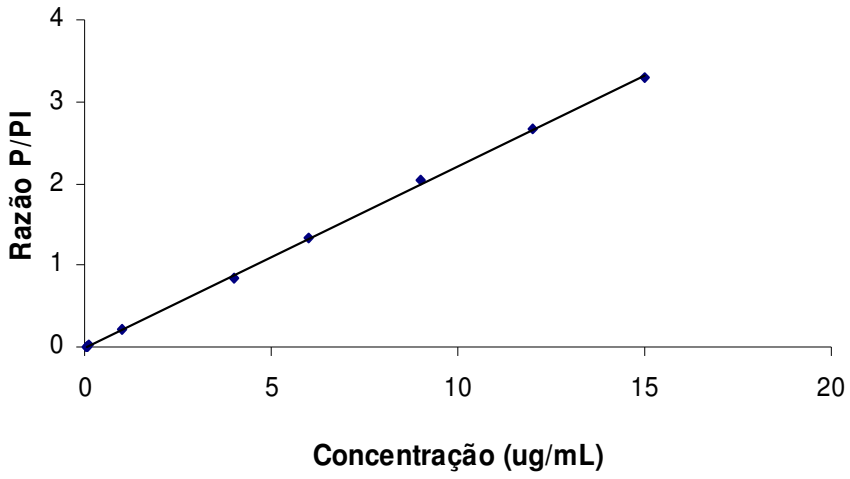


Figura 5.2 Reta de calibração do método analítico para quantificação de tinidazol em plasma por CLAE na faixa de concentração de 0,04 a 15,0 µg/mL

Tabela 5.2 Parâmetros relativos a reta de calibração do método analítico para quantificação de tinidazol em plasma por CLAE na faixa de concentração de 0,04 a 15,0 μg/mL

Parâmetro	Valor
Inclinação (a)	0,2221
Intercepto (b)	-0,0018
Coeficiente de correlação (r^2)	0,9995

5.1.6 PRECISÃO

A precisão variou entre 1,38 e 2,97 % para amostras analisadas no mesmo ensaio (intra-ensaio) e entre 9,44 e 11,32 % para amostras analisadas em dias diferentes (inter-ensaios). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.3.

5.1.7 EXATIDÃO

A exatidão variou entre 99,56 e 110,66% e 94,97 e 102,89% para análises intra-ensaio e inter-ensaios respectivamente (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 Precisão e exatidão intra-ensaio e inter-ensaios referentes a método analítico para quantificação de tinidazol em plasma por cromatografia líqüida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis determinações para precisão e exatidão intra-ensaio e réplicas de 6 amostras por 4 dias para precisão e exatidão inter-ensaios.

Concentração	Precisão (%)		Exatidão (%)	
(μg/mL)	Intra-dia	Inter-dias	Intra-dia	Inter-dias
0,1	2,97	11,32	99,56	94,97
6,0	1,94	9,44	110,66	102,89
12,0	1,38	10,48	108,72	99,20

5.1.8 ESTABILIDADE

5.1.8.1 ESTABILIDADE EM CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

As amostras mantiveram-se estáveis quando mantidas a –20°C e analisadas após três ciclos de congelamento e descongelamento (Tabelas 5.4, 5.5 e 5.6). Os resultados obtidos foram comparados com os de amostras recém-preparadas, sendo aceitos desvios entre ± 15%.

Tabela 5.4 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações.

Conc. Nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas			Ciclo 1			
	Conc.det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc.det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,10	0,10	3,67	96,78	0,10	1,18	97,11	0,35
6,0	5,88	1,55	98,08	6,62	0,96	110,27	12,43
12,0	12,18	1,64	101,52	12,58	1,69	104,87	3,30

Desvio = desvio em relação à amostra recém-preparada

Tabela 5.5 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações.

Conc. Nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas			Ciclo 2			
	Conc.det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc.det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,10	0,10	3,67	96,78	0,09	2,06	88,02	-9,05
6,0	5,88	1,55	98,08	5,61	1,71	93,49	-4,68
12,0	12,18	1,64	101,52	10,70	1,93	89,13	-12,21

Desvio= desvio em relação à amostra recém-preparada

Tabela 5.6 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma, analisadas imediatamente após o preparo, mantidas à temperatura de -20°C e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações.

Conc. Nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas			Ciclo 3			
	Conc.det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc.det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,10	0,10	3,67	96,78	0,09	1,38	90,97	-6,01
6,0	5,88	1,55	98,08	5,87	0,55	97,87	-0,21
12,0	12,18	1,64	101,52	11,49	4,53	95,72	-5,71

Desvio= desvio em relação à amostra recém-preparada

5.1.8.2. 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. Os resultados foram comparados com os de amostras recém-preparadas, sendo aceitos desvios entre ± 15%.

Tabela 5.7 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma, analisadas após permanência de 4 horas à temperatura ambiente. Cada resultado representa a média de três determinações.

Conc. Nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras processadas após 4 horas à temperatura ambiente			
	Conc.det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc.det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,10	0,10	3,67	96,78	0,09	0,64	87,20	-9,90
6,0	5,88	1,55	98,08	5,53	2,89	92,11	-6,08
12,0	12,18	1,64	101,52	11,18	1,79	93,14	-8,26

Desvio= desvio em relação à amostra recém-preparada

5.1.8.3. ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO

A estabilidade pós-processamento, representada pela estabilidade no tempo e condições de 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. 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 (Tabela 5.8). Foi avaliada também a estabilidade por 60 horas (Tabela 5.9) à temperatura ambiente.

Tabela 5.8 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma analisadas 24 horas após o procedimento de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações.

Conc. Nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras analisadas 24 horas após o processamento			
	Conc. Det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. Det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,1	0,10	3,67	96,78	0,09	2,04	92,65	-4,27
6,0	5,88	1,55	98,08	5,59	2,68	93,15	-5,02
12,0	12,18	1,64	101,52	11,66	1,49	97,16	-4,30

Desvio= desvio em relação à amostra recém-preparada

Tabela 5.9 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma analisadas 60 horas após o procedimento de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações.

Conc. Nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras analisadas 60 horas após o processamento			
	Conc. Det (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. Det (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,1	0,10	3,67	96,78	0,09	2,47	85,69	-11,46
6,0	5,88	1,55	98,08	5,87	1,26	97,82	-0,26
12,0	12,18	1,64	101,52	11,54	1,61	96,16	-5,28

Desvio= desvio em relação à amostra recém-preparada

5.1.8.4. ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO

As amostras de plasma de controle de qualidade e amostras de plasma de voluntários que receberam tinidazol mantiveram-se estáveis por, pelo menos, 35 dias (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 Estabilidade de tinidazol em amostras de plasma de controle qualidade, analisadas logo após o preparo e mantidas à temperatura de -20°C por 35 dias. Cada resultado representa a média de três determinações.

Conc. Nominal (µg/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras armazenadas a -20ºC durante 35 dias			
	Conc. Det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. Det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,1	0,10	3,67	96,78	0,09	5,42	94,10	-2,77
6,0	5,88	1,55	98,08	6,20	6,96	103,41	5,44
12,0	12,18	1,64	101,52	10,73	1,27	89,39	-11,95

Desvio= desvio em relação à amostra recém-preparada

5.1.8.5 ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO

A estabilidade das soluções padrão de tinidazol e metronidazol em metanol foi determinada, e os resultados obtidos apresentaram-se dentro dos limites especificados, com desvio médio de –0,30% para o padrão e de –1,88% para o padrão interno.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE TINIDAZOL EM AMOSTRAS DE PLASMA DE VOLUNTÁRIOS

A análise de todas as amostras de plasma contendo tinidazol foi concluída dentro dos períodos de tempo definidos para estabilidade das amostras e nas condições determinadas na validação do método.

Os sinais cromatográficos foram integrados automaticamente pelo programa do sistema cromatográfico – Shimadzu Class-VP®, version 5.032. Para integração foram utilizados os valores de 2 para “width” e 5000 para “slope”.

5.3 ENSAIO CLÍNICO DE BIOEQUIVALÊNCIA

Durante a Fase 2, o voluntário 9 apresentou mal estar após a administração do medicamento, apresentando vômito após a quarta hora. Após análise destas amostras, observou-se diminuição significativa da área sob a curva, sendo este voluntário excluído na análise estatística.

Os cromatogramas do voluntário 11, Fase 2, apresentaram interferente em tempo de retenção muito próximo ao do tinidazol, inclusive na amostra branco (zero hora), impossibilitando a integração do pico do padrão de maneira adequada. Estas amostras foram reanalisadas, apresentando os mesmos resultados. Este voluntário também foi excluído na análise estatística.

5.4 AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE OS PRODUTOS

A Tabela 5.11 apresenta as concentrações plasmáticas médias de tinidazol após administração, respectivamente, dos produtos referência e teste a 24 voluntários sadios. Os valores individuais estão apresentados no ANEXO C.

Tabela 5.11 Concentrações plasmáticas médias de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios.

Tempo (h)	Concentração plasmática média (μg/mL)					
	Pletil (produto referência)			Amplium (produto teste)		
	Média	D.P.	C.V. (%)	Média	D.P.	C.V. (%)
0,0	NQ	.....	.....	NQ	.....	.....
1,0	9,29	3,40	36,64	9,53	3,22	33,80
1,5	9,92	2,56	25,76	10,13	1,97	19,47
2,0	10,14	2,39	23,53	10,16	1,77	17,43
2,5	9,90	2,18	22,00	9,97	1,62	16,22
3,0	9,84	2,01	20,40	9,59	1,62	16,91
3,5	9,64	1,68	17,39	9,45	1,49	15,71
4,0	9,35	1,69	18,11	9,10	1,40	15,33
5,0	8,82	1,51	17,13	8,38	1,43	17,10
6,0	7,96	1,45	18,27	7,88	1,27	16,14
8,0	7,12	1,09	15,34	6,93	1,03	14,86
12,0	5,73	0,97	16,90	5,53	0,81	14,60
24,0	2,99	0,53	17,56	2,99	0,50	16,85
36,0	1,60	0,36	22,51	1,60	0,38	23,99
48,0	0,93	0,26	28,05	0,87	0,23	26,53
72,0	0,29	0,11	36,28	0,27	0,10	37,17

D.P. = desvio padrão; C.V. = coeficiente de variação; NQ = não quantificável

As curvas médias de decaimento plasmático referentes aos dois produtos estão apresentadas na Figura 5.3. As curvas individuais encontram-se no ANEXO C.

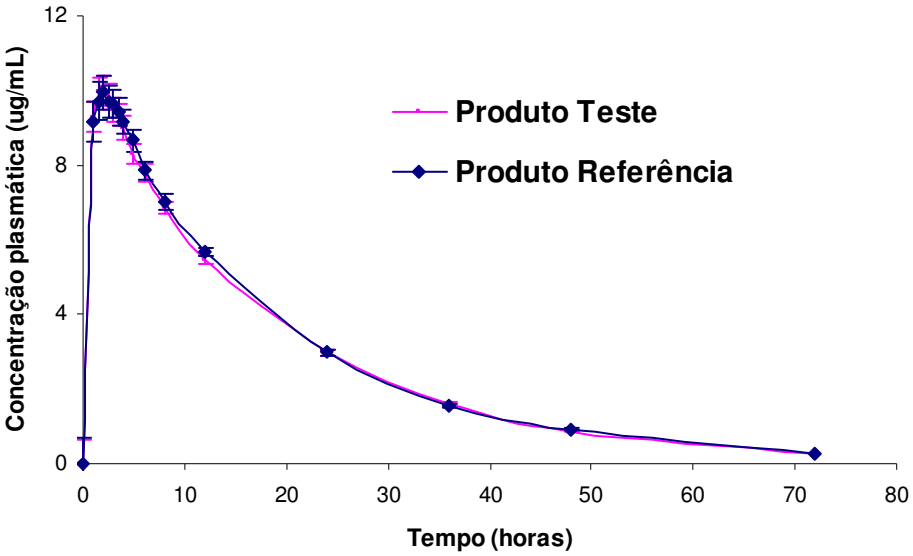


Figura 5.3 Curvas médias "concentração plasmática *versus* tempo" após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios. As barras verticais representam o erro padrão da média.

As Tabelas 5.12 e 5.13 apresentam os parâmetros farmacocinéticos C_{max}, t_{max}, $t_{(1/2)\beta}$, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, obtidos após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732), respectivamente, aos voluntários sadios.

Tabela 5.12 Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração do produto referência (Pletil®, lote G311) a 24 voluntários sadios.

	Pletil® (produto referência)				
Voluntário	**t_{max} (h)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC_{0-t} (µgxh/mL)**	**$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)**	**$t_{(1/2)el}$ (h)**
1	2,00	11,53	211,96	217,90	13,51
2	3,00	12,56	249,19	260,54	16,74
3	1,00	9,70	186,24	191,25	14,11
4	1,00	10,37	186,49	192,69	14,71
5	1,50	8,35	187,24	196,11	16,86
6	1,50	9,92	196,95	205,72	16,19
7	2,00	12,47	211,19	221,55	17,11
8	2,00	7,32	139,27	143,96	15,97
10	1,00	10,89	196,37	206,15	16,54
12	2,00	7,28	176,70	183,16	15,20
13	1,50	10,93	173,39	182,81	15,30
14	1,00	11,22	193,83	196,35	11,89
15	1,50	12,27	225,62	230,05	12,31
16	1,00	10,91	161,73	163,48	10,76
17	1,00	13,26	233,29	236,94	11,71
18	1,00	11,69	194,11	198,08	13,33
19	1,50	11,74	192,86	199,40	15,13
20	2,00	14,26	247,50	252,11	12,46
21	2,50	13,93	213,90	222,76	10,39
22	3,50	11,07	233,13	240,16	13,25
23	1,00	12,37	180,97	183,16	12,67
24	1,50	12,80	192,52	195,43	12,24
25	3,00	12,52	231,52	239,53	14,90
26	1,00	12,78	230,08	238,80	13,94
Média	**1,67**	**11,34**	**201,92**	**208,25**	**14,05**
D.P.	**0,73**	**1,83**	**27,44**	**28,43**	**1,99**
C.V. (%)	**43,94**	**16,18**	**13,59**	**13,65**	**14,14**

DP = desvio padrão, CV= coeficiente de variação

Tabela 5.13 Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração do produto teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios.

	Amplium ® (produto teste)				
Voluntário	**t_{max} (h)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC_{0-t} (µgxh/mL)**	**$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)**	**$t_{(1/2)el}$ (h)**
1	1,50	10,35	207,68	213,61	14,32
2	1,00	11,14	236,67	243,37	13,94
3	2,00	9,75	194,61	200,75	14,20
4	2,50	9,58	191,99	199,25	15,07
5	1,00	11,12	199,86	210,51	17,37
6	2,50	11,63	208,01	214,54	14,26
7	2,00	11,47	187,96	194,29	15,50
8	2,00	6,75	124,96	127,59	13,03
10	1,00	10,22	195,68	203,07	14,87
12	1,00	9,38	168,55	175,10	15,64
13	1,00	10,12	193,54	202,65	15,86
14	1,00	11,54	155,19	157,37	11,73
15	2,00	14,71	238,39	245,08	13,54
16	1,50	9,16	158,05	160,28	11,95
17	1,50	11,32	209,03	212,62	12,53
18	1,00	12,31	184,15	186,75	12,42
19	2,00	9,56	182,00	190,50	17,24
20	1,50	13,00	208,88	212,16	12,51
21	3,00	13,76	218,15	220,04	10,53
22	2,50	11,04	209,86	217,15	14,68
23	2,00	11,95	196,62	199,85	12,31
24	3,00	11,84	227,61	229,80	10,52
25	1,50	12,23	227,30	235,84	15,86
26	1,00	12,79	230,90	239,02	13,92
Média	**1,71**	**11,11**	**198,15**	**203,80**	**13,91**
DP	**0,66**	**1,69**	**27,33**	**28,24**	**1,87**
CV (%)	**38,52**	**15,21**	**13,79**	**13,86**	**13,45**

DP = desvio padrão, CV= coeficiente de variação

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A Tabela 5.14 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros farmacocinéticos C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios.

Tabela 5.14 Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo e período em relação aos parâmetros C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios

Fonte de Variação	**Nível Descritivo (p)**		
	lnC_{max}	**$lnAUC_{0-t}$**	**$lnAUC_{0-\infty}$**
Produto	0,4899	0,2772	0,2192
Grupo	0,2759	0,9313	0,9523
Período	0,7293	0,4685	0,4409

$p > 0,05$: não há efeito

As Tabelas 5.15, 5.16 e 5.17 apresentam, respectivamente, os resultados de ANOVA para C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, incluindo fonte, grau de liberdade, soma dos quadrados, quadrado médio, valor de F e resíduo.

Tabela 5.15 Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro $C_{max,}$ transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Produto	1	0,0041	0,0041	0,4930	0,4899
Grupo	1	0,0611	0,0611	1,2486	0,2759
Período	1	0,0010	0,0010	0,1228	0,7293
Voluntário (Grupo)	22	1,0761	0,0489		
Resíduo	22	0,1842	0,0084		

Tabela 5.16 Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro AUC_{0-t}, transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Produto	1	0,0052	0,0052	1,2414	0,2772
Grupo	1	0,0003	0,0003	0,0076	0,9313
Período	1	0,0023	0,0023	0,5443	0,4685
Voluntário (Grupo)	22	0,8680	0,0395		
Resíduo	22	0,0927	0,0042		

Tabela 5.17 Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação dos efeitos de produto, grupo, período e voluntário dentro do grupo em relação ao parâmetro $AUC_{0-\infty}$, transformado em escala logarítmica, obtido após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Produto	1	0,0068	0,0068	1,5993	0,2192
Grupo	1	0,0001	0,0001	0,0037	0,9523
Período	1	0,0026	0,0026	0,6161	0,4409
Voluntário (Grupo)	22	0,8837	0,0402		
Resíduo	22	0,0936	0,0043		

Os intervalos de confiança 90 % (IC 90 %) para as relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios, são apresentados na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 Intervalos de confiança 90% (IC 90 %) para as relações entre os parâmetros C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos teste (Amplium, lote 1732) e referência (Pletil®, lote G311) a 24 voluntários sadios.

IC 90 %		
ln C_{max}	**ln AUC_{0-t}**	**ln $AUC_{0-\infty}$**
93,9 % – 102,6 %	94,9 % – 101,1 %	94,6 % – 100,8 %

As razões entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ transformados logaritmicamente, obtidos após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) a 24 voluntários sadios, são apresentados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19 Razões entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, transformados em escala logarítmica, obtidos após administração dos produtos teste (Amplium®, lote 1732) e referência (Pletil®, lote G311) a 24 voluntários sadios.

Parâmetro	Razão entre as médias	Limite inferior	Limite superior
ln(Cmax)	-0,02	-0,06	0,03
ln(AUC_{0-t})	-0,02	-0,05	0,01
ln($AUC_{0-\infty}$)	-0,02	-0,06	0,01

O poder estatístico dos testes utilizados para determinação dos intervalos de confiança 90% das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ dos produtos teste e referência, transformados logaritmicamente, está apresentado na Tabela 5.20.

Tabela 5.20 Poder estatístico dos testes utilizados para determinação do intervalo de confiança 90% (IC 90%) das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max}, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ dos produtos teste (Amplium®, lote 1732) e referência (Pletil®, lote G311) transformados logaritmicamente.

Parâmetro	Poder estatístico (%)
ln C_{max}	100,00
ln AUC_{0-t}	100,00
ln $AUC_{0-\infty}$	100,00

6 DISCUSSÃO

O ensaio de bioequivalência foi realizado com delineamento randomizado, cruzado e aberto, no qual todos os voluntários receberam ambos os produtos avaliados.

O desenho cruzado é um desenho randomizado em bloco, no qual cada bloco pode ser constituído de um indivíduo ou um grupo de indivíduos. Neste desenho, cada bloco recebe mais que uma formulação de um fármaco em diferentes períodos. O desenho cruzado apresenta algumas vantagens nos estudos de bioequivalência:

- a administração de ambos os produtos para cada voluntário reduz a variabilidade inter-individual, pois cada voluntário constitui seu próprio controle;
- remove a variabilidade interindividual da comparação entre as formulações;
- com uma randomização apropriada dos indivíduos para a seqüência das administrações, fornece a melhor estimativa imparcial para as diferenças entre as formulações (Chow; Liu, 2000).

O período de *washout* é definido como o intervalo de tempo entre dois tratamentos para o qual o efeito de uma formulação administrada num tratamento não interfere no próximo. Entre as fases houve um período de *washout* de uma semana, intervalo de tempo superior a 10 meias-vidas do tinidazol, garantindo a total eliminação do fármaco e evitando a presença de possíveis efeitos residuais.

As amostras de plasma provenientes do ensaio de bioequivalência foram quantificadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com metodologia bioanalítica desenvolvida e previamente validada, para obtenção de resultados preciso e exatos.

Durante o desenvolvimento de métodos cromatográficos, uma importante consideração é a escolha da utilização de padrão externo ou interno. A utilização do padrão externo implica na comparação da resposta do analito com uma reta de calibração gerada a partir da resposta do padrão externo. O padrão interno é a opção de escolha sempre que é possível obter um padrão isotópico ou estruturalmente semelhante ao analito. Este é adicionado inicialmente às amostras passando por todas as etapas de pré-tratamento. Para determinar a concentração do analito é utilizada a razão entre as respostas do analito e do padrão interno, o que possibilita minimizar os erros decorrentes de possíveis perdas durante o preparo das amostras (Causon, 1997).

Neste trabalho utilizou-se metronidazol como padrão interno, que é estruturalmente semelhante ao tinidazol, apresentando adequada seletividade no método desenvolvido.

A literatura apresenta diversos trabalhos para quantificação de tinidazol em soro (Nilsson-Ehle *et al.*, 1981; Habel *et al.*, 1997; López-Martinez *et al.*, 1997; Guermouche *et al.*, 1999; Rajnarayana *et al.*, 2002) ou em plasma (Alton; Patrick, 1979; Lanbeck; Lindstrom, 1979; Chaikin *et al.*, 1982; Krishnaiah *et al.*, 2003).

Dentre os trabalhos realizados para quantificar tinidazol em soro humano, Guermouche *et al.* (1999) determinou a concentração de tinidazol em soro humano através de cromatografia líquida de alta eficiência em camada delgada, obtendo resultados satisfatórios em comparação à cromatografia líquida de alta eficiência.

López-Martinez *et al.* (1997) desenvolveu método espectrofotométrico baseado na reação de hidrólise alcalina do tinidazol. Em meio alcalino, o tinidazol é hidrolisado originando uma nova espécie com absorbância a 368 nm, de maior sensibilidade e estabilidade. Entretanto, este método requer uma etapa adicional na

purificação da amostra, para que a reação de hidrólise ocorra, o que representa uma desvantagem em estudos farmacocinéticos.

A grande maioria dos trabalhos realizam a quantificação de tinidazol através de cromatografia líquida de alta eficiência CLAE com detecção no ultravioleta, com comprimento de onda entre 318 e 320 nm. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta tem sido amplamente utilizada, por ser uma técnica rápida, sensível, específica e que permite a quantificação simultânea de diferentes fármacos e seus metabólitos.

As amostras biológicas obtidas dos voluntários e destinadas aos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência devem passar por um tratamento prévio à sua análise no cromatógrafo. Diversos são os motivos que justificam tal procedimento, destacando-se a complexidade das matrizes biológicas, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a concentração das substâncias a serem analisadas. O pré-tratamento objetiva uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (Queiroz *et al.*, 2001).

A extração líquido-líquido de tinidazol com a utilização de solventes orgânicos não é uma técnica muito utilizada, devido às características polares da molécula. Lanbeck *et al.* (1978) realizou extração de tinidazol com uma mistura de éter e diclorometano, entretanto, foi necessária uma dupla extração para adequada recuperação do fármaco, o que na prática, ocasiona maior consumo de tempo e elevado consumo de solventes. A maioria dos trabalhos realizam a purificação das amostras através da precipitação de proteínas plasmáticas com ácido perclórico (Nilsson-Ehle *et al.*, 1981; Krishnaiah *et al.*, 2003) ou acetonitrila (Habel *et al.*, 1997; Rajnarayana *et al.*, 2002).

O método bioanalítico utilizado no presente trabalho foi desenvolvido e validado com base na literatura mencionada anteriormente, apresentando algumas vantagens com relação aos parâmetros cromatográficos, como fluxo da fase móvel e tempo de corrida.

O fluxo da fase móvel utilizado (1 mL/min) foi menor que o fluxo utilizado por Nilsson-Ehle *et al*. (1981) e igual ao utilizado por Rajnarayama et al. (2002).

O tempo de cada análise cromatográfica foi de 6 minutos, sendo que nos demais métodos o tempo de análise foi de 10 a 20 minutos. A redução do tempo de análise apresenta muitas vantagens, pois a quantidade de fase móvel utilizada é reduzida e a coluna cromatográfica apresenta maior tempo de vida útil.

O limite de quantificação (0,04 μg/mL) foi inferior ao obtido por Alton; Patrick (1979), Nilsson-Ehle *et al*. (1981), Habel *et al*. (1997), Rajnarayana *et al*. (2002) e próximo ao obtido por Krishnaiah *et al*. (2003). A precisão e exatidão na determinação deste parâmetro foram de 3,10% e 99,23%, respectivamente, estando dentro dos critérios de aceitabilidade que estabelecem um desvio máximo de ±20% em relação à concentração nominal, com coeficiente de variação de no máximo 20% (Bressole et al., 1996; Brasil, 2003). O limite de quantificação (LQ) determinado (0,04 μg/mL) possibilitou a quantificação de tinidazol na faixa de decaimento plamático, onde são observadas baixas concentrações, sendo que valores de concentração inferiores ao LQ não são utilizados no cálculo de ASC.

A análise da regressão da curva de calibração demonstrou que o método é linear no intervalo de concentração de 0,04 a 15,0 μg/mL, com alto índice de correlação (r^2 = 0,9995).

A recuperação média foi de 102,9% para o tinidazol e de 99,94% para o padrão interno, demonstrando completa recuperação do fármaco e padrão interno após o procedimento de purificação das amostras de plasma.

Os resultados obtidos na análise da precisão e exatidão intra e inter-ensaios apresentaram valores de precisão menores que 15% e exatidão entre 85 a 115%. Os valores obtidos para análise de amostras de tinidazol no mesmo dia (intra-ensaio) apresentaram precisão entre 1,8 e 2,97% e exatidão entre 99,56 e 110,66%. Amostras analisadas em dias diferentes (inter-ensaios) apresentaram precisão entre 9,44 e 11,32% e exatidão entre 94,97 e 102,89%, estando de acordo com os critérios estabelecidos para avaliação destes parâmetros (Bressole *et al.*, 1996; Brasil, 2003).

Os resultados da estabilidade de tinidazol em amostras de plasma mantidas a -20℃ e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento demonstraram que as mesmas permanecem estáveis por até três ciclos de congelamento e descongelamento. A análise de amostras de plasma descongeladas e mantidas à temperatura ambiente durante 4 horas e de amostras de plasma processadas e mantidas por 24 horas e 60 horas à temperatura ambiente não demonstraram alteração significativa em relação a concentração das amostras recém-preparadas, indicando adequabilidade do método ao tempo e condições de análise. A estabilidade de longa duração foi avaliada durante o intervalo de tempo entre a coleta das amostras no ensaio clínico até o último dia de análise. Este período foi de 35 dias, durante o qual as amostras mantiveram-se estáveis. As soluções-padrão utilizadas para preparação diária da curva de calibração, armazenadas a –20ºC, não apresentaram degradação durante o período de análise

da validação e amostras de voluntários, com desvio médio de –0,30% para o padrão e –1,88% para o padrão interno.

De acordo com os resultados anteriormente apresentados, o método apresentou-se específico, sensível, linear, preciso e exato, justificando sua aplicação em estudos farmacocinéticos e de bioequivalência.

O produto teste Amplium®, lote 1732 – FARMASA e o produto referência Pletil®, lote G311 – Pharmacia Brasil, 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 intercambialidade entre estes produtos, sendo necessária a realização do estudo *in vivo* para que se obtenha conclusões definitivas sobre a bioequivalência dos produtos em estudo.

As curvas médias de decaimento plasmático dos produtos teste e referência, e as médias dos parâmetros farmacocinéticos C_{max} (referência: 11,34 µg/mL; teste: 11,11 µg/mL); t_{max} (referência: 1,67h; teste: 1,71h), ASC_{0-t} (referência: 201,92 µgxh/mL; teste: 198,15 µgxh/mL) e $ASC_{o-\infty}$ (referência: 208,25 µgxh/mL; teste: 203,80 µgxh/mL) apresentaram-se semelhantes.

Os resultados obtidos neste trabalho são compatíveis com os previamente reportados por Matilla *et al*. (1983) e Rajnarayana *et al*. (2002), que obtiveram valores de C_{max} entre 10,1 e 11,7 µg/mL, t_{max} entre 1,6 e 2,7 h e $ASC_{o-\infty}$ entre 216,8 e 299,8 µgxh/mL, após administração oral de 500 mg de tinidazol.

Os resultados referentes à meia-vida de eliminação deste trabalho (referência: 14,1 h; teste: 13,9 h) são semelhantes aos relatados por outros autores (Nilsson-Ehle *et al*., 1981; Chaikin *et al*., 1982; Matilla *et al*, 1983; Rajnarayana *et al*, 2002).

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, 1993). 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 não invalida o ensaio, desde que as causas sejam devidamente investigadas e justificadas. 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. Este efeito pode ser ignorado se o estudo aplicou dose única; incluiu apenas voluntários sadios e normais; o fármaco não consistiu em uma molécula endógena; foi aplicado adequado período de *washout* entre as duas fases e o estudo preencheu todos os critérios científicos e estatísticos preconizados (protocolo de ensaio; validação de metodologia analítica; coleta adequada de dados; análise estatística apropriada e intervalos de confiança adequados). 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 não sejam clinicamente equivalentes. 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).

No presente estudo, para os parâmetros farmacocinéticos utilizados na avaliação da bioequivalência, C_{max}, 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, não havendo portanto diferença significativa entre os dois períodos do ensaio, entre os dois grupos de indivíduos, entre os produtos avaliados e entre os voluntários.

O intervalo de confiança 90% é utilizado para demonstrar se a biodisponibilidade do fármaco no produto teste é muito baixa ou muito alta em comparação ao produto referência, ou seja, determina se existem grandes diferenças entre os parâmetros médios (Shargel, Yu, 1993). Os limites do intervalo de confiança 90% são estimados para as médias dos resultados, sendo que o limite inferior não deve ser menor que 80% e o limite superior não deve ser maior que 125% (United States, 2001; Brasil, 2003).

Os resultados do intervalo de confiança 90% para os parâmetros farmacocinéticos avaliados C_{max} (93,9 – 102,6 %), ASC_{0-t} (94,9 – 101,1 %) e $ASC_{0-\infty}$ (94,6 – 100,8 %) encontraram-se dentro dos limites estabelecidos, demonstrando que os produtos avaliados são bioequivalentes.

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. O poder do teste dependerá do tamanho da amostra, variabilidade dos resultados e nível desejado de significância. Quanto maior o poder do teste, maior a probabilidade dos resultados serem válidos.

O poder estatístico dos testes utilizados para determinação do intervalo de confiança 90% das relações entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max}, ASC_{0-t} e

$ASC_{0-\infty}$ foi de 100% em todos os casos, indicando que o número de voluntários utilizado no estudo foi adequado.

A avaliação da bioequivalência de diferentes produtos farmacêuticos é baseada na seguinte hipótese, denominada hipótese fundamental de bioequivalência:

"quando dois produtos farmacêuticos são equivalentes em relação a velocidade e extensão pelos quais o fármaco ou substância ativa é absorvido e torna-se disponível no sítio de ação, assume-se que eles serão 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).

A definição de uma diferença clinicamente significativa é importante para a avaliação de equivalência terapêutica em termos de eficácia, segurança e relação risco/benefício. Em estudos de bioequivalência, a intenção é considerar bioequivalência em termos de equivalência terapêutica. Entretanto, esta hipótese pode ser verificada somente através de rigorosos ensaios clínicos que relacionem parâmetros de biodisponibilidade com efeitos clínicos através de resultados de concentração sanguínea e avaliações clínicas de eficácia e segurança. Na prática, tais estudos clínicos raramente são efetuados devido às seguintes dificuldades:

- ao contrário dos voluntários sadios que são freqüentemente utilizados em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência, os pacientes não podem ser selecionados de forma controlada;
- pacientes são mais heterogêneos em uma ampla variedade de características.

Westlake (1979) ressaltou que uma diferença estatisticamente significativa na comparação das biodisponibilidades não necessariamente significa que há um diferença clinicamente significativa entre produtos farmacêuticos. Por exemplo, a ASC para o produto teste pode exibir uma biodisponibilidade de 80% comparada ao produto referência. A diferença de 20% na ASC, que pode ser estatisticamente significativa, pode não ter significância clínica em termos de efeito terapêutico. Ou seja, embora exista uma diferença de 20%, ambos os produtos referência e teste podem atingir o mesmo efeito terapêutico. Então eles são considerados equivalentes terapêuticos. Geralmente, são definidos limites de bioequivalência para a avaliação da diferença clínica. Se a diferença na ASC entre os produtos referência e teste encontra-se dentro destes limites, não há diferença clínica ou são considerados equivalentes terapêuticos.

No presente estudo, todos os parâmetros avaliados encontraram-se dentro dos limites estabelecidos, demonstrando que os produtos avaliados são bioequivalentes e, portanto, equivalentes terapêuticos, podendo ser administrados a pacientes de maneira intercambiável, sem prejuízo do efeito terapêutico.

7 CONCLUSÕES

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

⇒ O método analítico desenvolvido e validado para a quantificação de tinidazol em plasma humano demonstrou adequada sensibilidade, reprodutibilidade, recuperação e estabilidade, justificando sua utilização em ensaios de bipoequivalência/biodisponibilidade relativa;

⇒ O produto teste Amplium®, lote 1732 – FARMASA pode ser considerado bioequivalente ao produto referência Pletil®, lote G311 – Pharmacia Brasil;

⇒ O produto teste Amplium®, lote 1732 – FARMASA e o produto referência Pletil®, lote G311 – Pharmacia Brasil, podem ser administrados a pacientes de forma intercambiável, sem prejuízo do efeito terapêutico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTON, K.B., PATRICK, J.E. High-performance liquid chromatographic assay for the antiprotozoal agent tinidazole, in human plasma. *J Pharm. Sci.*, v.68, n.5, p.599-601, 1979.

2. ALVAREZ, I.G., TERUEL, C.F., GARCIA, A.R., BERMEJO, M. Ensayos de disolución y sus correlaciones, in vitro-in vivo. *Farmacia Sulamericana*, ano 10, v.10, n.1, p.3-21, 2002.

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

4. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS – PRÓ-GENÉRICOS. História dos Medicamentos genéricos no Brasil. São Paulo: Pró-Genéricos. Disponível em www.progenericos.org.br Acesso em: 16/03/2005

5. BENET, L.Z. Understanding bioequivalence testing. *Transplant. Proc.*, New York, v.31, suppl. 3A, p. 7S-9S,1999.

6. BERGAN, T., Solhaug, J.H., Soreide, O., Leinebo, O. Comparative pharmacokinetics of metronidazole and tinidazole and their tissue penetration. Preface. *Scand. J. Gastroenterol.,* v.20, n.8, p. 945-950, 1985.

7. BRASIL. Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999. *Diário oficial da União*, Brasília, n.29, 11 de fevereiro de 1999. Seção 1, p. 1-2. [Altera a Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências].1999a.

8. BRASIL. Resolução n° 391, de 9 de agosto de 1999. *Diário oficial da União*, Brasília, n.152, 10 de agosto de 1999. Seção 1, p. 62-69. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos].1999b.

9. BRASIL. Resolução n°41, de 28 de abril de 2000. *Diário Oficial da União*, Brasília, 3 maio de 2000. Seção 1. 2000. Disponível em: http://e-

legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=2114 Acesso em 20/03/2005.

10 BRASIL. Resolução RDC n°10, de 2 de janeiro de 2001. *Diário Oficial da União*, Brasília, 9 de janeiro de 2001. Seção 1. 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/10_01.rdc.htm Acesso em 20/03/2005.

11 BRASIL. Resolução RDC n° 84, de 19 de março de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, 20 de março de 2002. Seção 1, p. 75-77. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. 2002.

12 BRASIL. Resolução RDC n° 133, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1. [Dispõe sobre o registro de medicamento similar e dá outras providências]. 2003a. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=7901 Acesso em 20/03/2005.

13 BRASIL. Resolução n° 134, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1. [Dispõe sobre a adequação dos medicamentos já registrados]. 2003b. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=7904 Acesso em 20/03/2005.

14 BRASIL. Resolução n° 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.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=7909 Acesso em 20/03/2005.

15 BRASIL. Resolução n° 896, 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 provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos]. 2003d. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=3690 Acesso em 20/03/2005.

16 BRASIL. Resolução n° 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]. 2003e. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=5745 Acesso em 20/03/2005.

17 BRASIL. Resolução n° 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/bioequivalência de medicamentos.]. 2003f. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=2489 Acesso em 20/03/2005.

18 BRASIL. Resolução RE n° 397, de 12 de novembro de 2004. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 de novembro de 2004. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para provas de biodisponibilidade/bioequivalência de medicamentos]. 2004. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=13226 Acesso em 20/03/2005.

19 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista de Genéricos. Atualizada até Diário Oficial da União de 22 de abril de 2005. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/lista/display.pdf Acesso em 20/03/2005.

20 BRESSOLE, F., BROMET-PETIT, M., AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.,* Amsterdam*, v.* 686, n.1, p. 3-10, 1996.

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

22 CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B: Biom. Appl.,* Amsterdam, *v.* 689, n.1, p. 175-180, 1997.

23 CHAIKIN P., ALTON K.B., SAMPSON C., WINTRAUB H.S. Pharmacokinetics of tinidazole in male and female subjects. *J. Clin. Pharmacol.*, v.22, n.11-12, p.562-570, 1982.

24 CHARMAN, W.N., PORTER, C.J.H., MITHANI, S., DRESSMAN, J.B. Physicochemical ad physiological mechanisms for the effects of food on drug absortion: the role of lipd ans pH. *J. Pharm. Sci.*, v.86, n.3, p.269-282, 1997.

25 CHIOU, W.L. The rate and extent of oral bioavailability versus the rate and extent of oral absortion: clarification and recommendation of terminology. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.*, v.28, n.1, p.3-6, 2001.

26 CHOW, S.C., LIU, J.P. *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*, Marcel Dekker, New York, 2000.

27 CONSIGLIERI, V.O., STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. Rev. Bras. Ciênc. Farm., São Paulo, v.36, n.1, p.13-21, 2000.

28 DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas: 2003/2004. Rio de Janeiro, Publicações científicas, 2004.

29 DIGHE, S.V. A review of the safety of generic products. Transplant. Proc., New York, v.31, suppl. 3A, p. 23S-24S, 1999.

30 DIPIRO, J.T., BLOUIN, R.A., PRUEMER, J.M., SPRUILL, W.J. *Concepts in Clinical Pharmacokinetics – A Self-Instructional Course*. 2.ed., American Society of Health-System Pharmacists, 1996, 200p.

31 DRUG Information. Bethesda: American Society of Healthy-System Pharmacists, 2004.

32 EUROPEAN Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Human Medicines Evaluation Unit. Committee for Proprietary Medicinal Products. *Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence*. London: EMEA, 2001. 18p. Disponível em: http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ewp/140198en.pdf Acesso em

10/04/2005.

33 FERRAZ, H.G. Avaliação biofarmacêutica in vitro e in vivo (bioequivalência) de comprimidos de ampicilina 500 mg comercializados no Brasil São Paulo, 1997. 135p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

34 FLEISCHER D., LI C., ZHOU Y., PAO L.H., KARIM A. Drug, meal ad formulation interactions influencing drug absortion after oral administration. Clinical implications. *Clinic. Pharmacokinet.*, v.36, n.3, p.233-254, 1999.

35 GLEITER, C.H., KLOTZ, U., KUHLMANN, J., BLUME, H., STANISLAUS, F., HARDER, S., PAULUS, H., POETHKO-MULLER, C., HOLZ-SLOMCZYK, M. When are bioavailability studies required? A German proposal. *J Clin Pharmacol.* v.38, n.10, p.904-11, 1998.

36 GUERMOUCHE, M.H., HABEL, D., GUERMOUCHE, S. Assay of tinidazole in human serum by high-performance thin-layer chromatography – comparison with high-performance liquid chromatography. *J AOAC Int.*, v.82, n.2, p.244-247, 1999.

37 HABEL D., GUERMOUCHE S., GUERMOUCH M. H. Direct assay of tinidazole in human serum by micellar liquid chromatography. *Biom. Chromat.*, v.16. p.16-18, 1997.

38 HORTER, D., DRESSMAN, J.B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.46, p.75-87, 2001.

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

40 KLOTZ, U. Pharmacokinetics considerations in the eradication of Helicobacter pylori. *Clin. Pharmacokinet.*, v.38, n.3, p.243-270, 2000.

41 KOROLKOVAS, A. Dicionário Terapêutico Guanabara. ed.2000/2001. Rio de Janeiro, 2000. p. 10.24.

42 KRISHNAIAH Y.S.R., MUZIB Y.I., BHASKAR P., SATYANARAYANA V., Estimation of tinidazole in human plasma by reverse phase HPLC method. *As. J. Chemit.*, v.15, n.2, p.937-940, 2003.

43 LAMP, K.C., FREEMAN, C.D., KLUTMAN, N.E. , et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clin. Pharmacokinet.*, v.36, n.5, p. 353-373, 1999.

44 LANBECK, K., LINDSTROM, B. Determination of metronidazole and tinidazole in plasma and feces by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.162, p.117-121, 1979.

45 LAU, A.H., LAM, N.P., PISCITELLI, S.C., WILKES, L., DANZIGER, L.H. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin. Pharmacokinet.*, v.23, n.5, p.328-364, 1992.

46 LEIBOVITCH, E.R., DEAMER R.L.,SANDERSON, L.A. Food-drug interactions: Careful drug selection and patient counseling can reduse the risk in older patients. *Geriatrics*, v.59, n.3, p.19-22, 32-3, 2004

47 LÉON-MOLINA, H., FLORES-MURRIETA, F. J., CHAPELA, R. Assessment of comparative bioequivalence of two metered-dose inhaler formulations of salbutamol: measuring bronchodilatory effect in patients with asthma.*Clinical Drug Investigation,* v. 22, n.7, p. 435 – 441, 2002.

48 LÓPEZ-MARTÍNEZ L., LUNA VÁZQUEZ F.J., LÓPEZ DE ALBA P.L. Simple spectrophotometric determination of tinidazole in formulation and serum. *Anal. Chim. Acta.*, v.340, p.241-244, 1997.

49 LOREMBERG, R., AMIDON, G.L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.50, p.3-12, 2000.

50 MANADAS, R., PINA, M.E., VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.38, n.4, p.375-399, 2002.

51 MARTINDALE, *The Extra Pharmacopeia*. 31ª. ed., The Pharmaceutical Press, London, 1996.

52 MARZO, A., BALANT, L.P. Bioequivalence – an updated reappraisal addressed to applications of interchangeable multi-source pharmaceutical products. *Arzneim.-Forsch/Drug Res.*, v.45, n. 2, p.109114, 1995.

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

54 MATTILA, J., MANNISTO, P.T., MANTYLA, R., NYKANEN, S., LAMMINSIVU, U. Comparative pharmacokinetics of metronidazole and tinidazole as influenced by administration route. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 23, n. 5, p. 721-725, 1983.

55 MEREDITH, P.A. Bioequivalence and other unresolved issues in generic drug substitution. *Clin Therap.*, v.25, n.11, p.2875-2890, 2003.

56 MEREDITH, P.A. Generic drugs - Therapeutic equivalence. *Drug Saf.*, v.15, n.4, p.233-242, 1996.

57 MIDHA, K.K., HUBBARD, J.W. Aims and consequences of bioequivalence studies. In: International Conference of F.I.P. “Bio International 94”, Munich, 1994 medpharm Scientific Publ., 1994. p.29-34.

58 NATION, R.L., SANSOM, L.N. Bioequivalence requirements for generic products. *Pharmac. Ther.*, v.62, p.41-55, 1994.

59 NILSSON-EHLE I., URSING B., NILSSON-EHLE P. Liquid chromatographic assay for metronidazole and tinidazole: Pharmacokinetic and Metabolic Studies in human subjects. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, v.19, n.5, p.754-760, 1981.

60 NORD, C.E., KAGER, L. Tinidazole--microbiology, pharmacology and efficacy in anaerobic infections. *Infection*, v.11, n.1, p.54-60, 1983.

61 ORMSBY, E. Statistical methods in bioequivalence *in* Jackson A.J. *Generics and Bioequivalence*, CRC Press, 1994.

62 PABST, G. W., CHIOU, W.L. Review of methods and criteria for evaluation of bioequivalence studies. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 38, p. 3-50,

1990.

63 PANCHAGNULA, R., THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.201, p.131-150, 2000.

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

65 POWERS, J.D. Statistical considerations in pharmacokinetic study design. *Clin. Pharmacokinet.*, v.24, n.5, p.380-387, 1993.

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

67 RAJNARAYANA K., CHAULUVADI M.R., ALAPATI V.R., MADA S.R., JAYASAGAR G., KRISHNA D.R.Validated HPLC method for the determination of tinidazole in human serum and its application in clinical pharmacokinetic study. *Pharmazie*, v.57, n.8, p.535-537, 2002.

68 RESCIGNO, A. Bioequivalence. *Pharm. Res.*, v.9, v.7, p.925-928, 1992.

69 RITSCHEL, W.A. *Handbook of Basic Pharmacokinetics*. 4.ed., Hamilton: Drug Intelligence, 1992, 588p.

70 ROBSON, R.A., BAILEY, R.R., SHARMAN J.R. Tinidazole pharmacokinetics in severe renal failure. *Clin.Pharmacokinet.*, v. 9, p. 88-94, 1984.

71 SELEN, A. *Factors influencing bioavailability and bioequivalence*. In: Welling, P.G., Tse, F.L., Dighe, S. *Pharmaceutic Bioequivalence.* Marcel Dekker, Inc., 1991. p.117-148.

72 SENN, S. Statistical issues in bioequivalence. *Statistics in Medicine*, v.20, p.2785-2799, 2001.

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

USP).

74 SINGH, N.B. Effects of food on clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.*, v.37, n.3, p.213-255, 1999.

75 SHARGEL, L., YU, A.B.C. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 3 ed. London:Prentice-Hall International, 1993. 625p.

76 SHARGEL, L., YU, A.B.C. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 4 ed. Stamford: Appleton & Lange, 1999. 768p.

77 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. 290 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

78 STEINIJANS, V.W., HAUSCHKE, D. Update on the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.,* v.30, suppl.1, p. S45-S50, 1992.

79 STORPIRTIS, S., CONSIGLIERI, V.O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.31, n.2, p.63-70, 1995.

80 STORPIRTIS, S., OLIVEIRA, P.G., RODRIGUES, D., MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.35, n.1, p.1-16, 1999.

81 STORPIRTIS, S., MARCOLONGO, R., GASPAROTTO, F., VILANOVA, C.M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade 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 20/03/2005.

82 UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. *Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence.* 2001. Disponível em:

http://www.fda.gov/cder/guidance/3616fnl.pdf Acesso em 11/11/2004.

83 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./cder/guidance/4252fnl.pdf Acesso em 11/11/2004

84 UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products – general considerations.* 2002. p.1-24. Disponível em: http://www.fda.gov/cder/guidance/3616fnl.pdf Acesso em 11/11/2004

85 UNITED STATES. National Archives and Records service. Office of the Federal register. Code of Federal regulations. Title 21:Food and Drugs. Subchapter D: Drugs for human use. Part 320. *Bioavailability and Bioequivalence Requirements*. 2004a. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/CFRSearch.cfm?CFRPart=320 Acesso em 11/11/2004

86 UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Drug Specific Information. *Tindamax Labeling*. 2004b. 8p. Disponível em: http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/21618_tindamax_lbl.pdf Acesso em 11/11/2004

87 UNITED States Pharmacopoeia: USP 24. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 1999.

88 VIITANEN, J., AUVINEN, O., TUNTURI, T. Serum and tissue tinidazole concentrations after intravenous infusion. *Chemotherapy*, v.29, p.13-17, 1983.

89 VINGE, E., ANDERSSON, K.E., ANDO, G., LUNELL, E. Biological availability and pharmacokinetics of tinidazole after single and repeated doses. *Scand J Infect Dis.*, v.15, n.4, p.391-397, 1983.

90 WESTLAKE, W.J. Statistical aspects of comparative bioavailability trials. *Biometrics*, v.32, p.273-280, 1979.

91 WILLIAMS, R.L. Bioequivalence and therapeutic equivalence. In: Welling, P.G., Tse, F.L., Dighe, S. *Pharmaceutic Bioequivalence.* Marcel Dekker, Inc., 1991. p.1-16.

92 WINTER, M.E., KODA-KIMBLE, M.A., YOUNG, L.Y. *Basical clinical pharmacokinetics*. 2.ed. Washington: Applied Therapeutics, 1988.

93 WOOD S.G., JOHN B.A., CHASSEAUD L.F., BRODIE R.R., BAKER J.M., FAULKNER J.K., WOOD B.A., DARRAGH A., LAMBE R.F. Pharmacokinetics and metabolism of 14-C tinidazole in humans. *Antimicrob. Chemother.*, v.17, n.6, p.801-809, 1986.

94 YU, L.X., AMIDON, G.L., POLLI, J.E., ZHAO, H., MEHTA, M.U., CONNER, D.P., SHAH, V.P., LESKO, L.J., CHEN, M.L., LEE, V.H.L., HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. Pharm. Res., v.19, n.7, p.921-925, 2002.

ANEXO A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 053/2004

São Paulo, 02 de junho de 2004.

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

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de maio p.p., **APROVOU** o projeto "Avaliação de biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol produzidos pro Laboratório Americano de Farmacoterapia S/A (Farmasa) e Pharmacia Brasil." (Protocolo nº 250) apresentado por Vossa Senhoria.

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

Atenciosamente,

Profª. Drª. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP.

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 - Fax (11) 3031-8986 - e-mail: rtrigo@usp.br

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

1. Identificação do voluntário

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

Identidade:.....

Nascimento:.....

Endereço:.....

Telefone:.....

2. Informações sobre a pesquisa

Título: **Avaliação de biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo 500 mg de tinidazol.**

Pesquisadores envolvidos: Profa. Dra. Valentina Porta, Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo, Farmacêutica Eunice Emiko Mori Koono e Farmacêutica Eunice Kazue Kano

Avaliação de risco: risco mínimo

3. Informações ao voluntário

Justificativa e objetivos da pesquisa: (esclarecer o voluntário sobre a finalidade da pesquisa): Este estudo pretende comparar dois tipos de comprimidos contendo tinidazol, produzidos por duas indústrias diferentes. O tinidazol é um remédio usado para o tratamento de pessoas com infecção por bactérias.

Procedimentos: (esclarecer o voluntário sobre os procedimentos a que será submetido): Para ser incluído no estudo, você será submetido a exames clínicos e laboratoriais, com quatro coletas de amostras de sangue e uma de urina. Serão realizados os seguintes exames laboratoriais: hemograma completo; uréia; creatinina; fosfatase alcalina; glicemia; bilirrubina total; proteínas totais e albumina; transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP); ácido úrico; colesterol total; triglicérides; urina tipo I; sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C; e β-HCG (para mulheres). As coletas de sangue e urina para exames laboratoriais serão realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, localizado à Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 17, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, que é habilitado pela ANVISA a executar exames laboratoriais em voluntários para ensaios de biodisponibilidade. Será feito também um eletrocardiograma. A avaliação médica e o eletrocardiograma serão realizados no Hospital Universitário localizado à Av. Prof. Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, pela equipe coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo. Ao final do estudo estes mesmos exames laboratoriais e clínico serão repetidos, juntamente com o eletrocardiograma. Você será internado no Setor de Ensaios Clínicos do Hospital Universitário da USP, localizado à Av. Prof. Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, na noite anterior ao estudo. Você não

poderá levar nenhum tipo de alimento pra o hospital, pois, a partir do momento da internação, você receberá dieta padronizada. No dia do estudo você tomará um comprimido de um dos produtos com água. Além disso, o jejum deverá ser mantido até quatro horas depois de tomar o remédio. Para avaliar a absorção do fármaco pelo organismo serão realizadas coletas de sangue nos seguintes tempos 0; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 36; 48 e 72 horas. Desta forma, em cada fase serão retirados 128 mL de sangue, e 256 mL no total ao final do ensaio Este procedimento será repetido com o outro produto, com intervalo de, no mínimo, seis dias. Para evitar que sua veia seja puncionada muitas vezes, será colocado um sistema apropriado para a retirada de sangue.

Ocorrência de efeitos indesejáveis (esclarecer os voluntários sobre possíveis efeitos indesejáveis associados ao ensaio): O tinidazol é um remédio utilizado mundialmente. Entre os países que aprovaram sua utilização estão os Estados Unidos e os países da Europa. Também no Brasil sua utilização é permitida pelo Ministério da Saúde. O tinidazol geralmente é bem tolerado. Devido a administração de duas doses únicas de 500 mg de tinidazol o aparecimento de algum efeito desagradável é pouco provável. Entretanto é contra-indicado em pacientes com história de alergia. Algumas reações desagradáveis são: enjôo, dor de barriga, vômito e dor de cabeça. Entretanto, tais reações são observadas em pacientes que recebem tinidazol por mais de um dia ou em doses muito altas. Nas condições em que será realizado o presente estudo (administração de doses únicas de 500 mg de tinidazol) é improvável o aparecimento de algum desses efeitos. Durante a coleta de sangue, algumas pessoas podem sentir fraqueza e até mesmo desmaiar por causa da picada. Também podem surgir hematomas e dor no local da picada. Entretanto, esses efeitos são passageiros e não são graves. A coleta de amostras será acompanhada por um médico que poderá atendê-lo no caso de alguma eventualidade, além de esclarecer qualquer dúvida.

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

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

Forma de acompanhamento e assistência: O ensaio será acompanhado por profissional médico capacitado a prestar assistência em caso de necessidade. Os pesquisadores estarão à disposição dos voluntários para quaisquer

esclarecimentos nos telefones 3815-8484 (Profa. Dra. Valentina Porta, Farmacêutica Eunice Emiko Mori Koono e Farmacêutica Eunice Kazue Kano) e 3039-9485 (Dr. Paulo Andrade Lotufo.).

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

Ressarcimento de despesas: Cada voluntário receberá R$ 330,00 (trezentos e trinta reais) como forma de ressarcimento das despesas decorrentes de sua participação na pesquisa.

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

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

4. Consentimento pós-informação

Após ter sido devidamente informado sobre a justificativa e objetivos da pesquisa e os procedimentos a que serei submetido, e receber a garantia de ser esclarecido sobre qualquer dúvida e de ter a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, consinto, de livre e espontânea vontade, em participar da pesquisa "**Avaliação de biodisponibilidade relativa de comprimidos contendo 500 mg de Tinidazol.".**

Data: _____/_____/_____

_____	_____
Voluntário	Pesquisador
_____	_____
Testemunha 1	Testemunha 2

ANEXO C

CURVAS DE DECAIMENTO PLASMÁTICO E PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS INDIVIDUAIS

VOLUNTÁRIO 1

Tabela AC.1 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 1.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	9,29	9,44	11,53	9,84	8,94	11,21	11,24	8,47	7,64	7,09	5,81	3,14	1,93	1,05	0,30
Amplium®	NQ	9,68	10,35	9,79	9,81	9,30	8,63	8,83	8,32	9,45	7,04	6,15	3,16	1,66	0,87	0,29

NQ = não quantificável

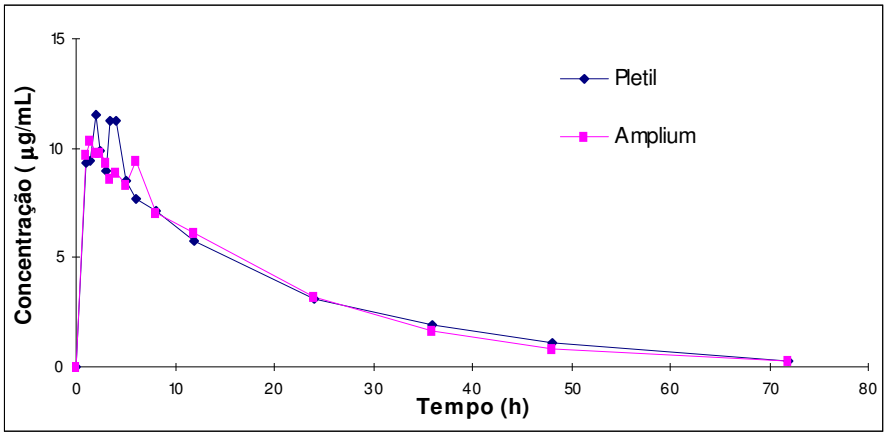


Figura AC.1 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 1.

Tabela AC.2 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 1.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	2,00	11,53	211,96	217,90	13,51	2,29	44,73
Amplium®	1,50	10,35	207,68	213,61	14,32	2,34	48,36

VOLUNTÁRIO 2

Tabela AC.3 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 2.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	6,26	7,81	10,95	11,58	12,56	10,74	11,22	10,51	11,25	8,12	7,06	3,81	2,03	1,40	0,47
Amplium®	NQ	11,14	11,08	10,17	10,70	9,67	10,73	9,62	7,92	8,31	7,87	6,37	4,24	1,95	1,21	0,33

NQ = não quantificável

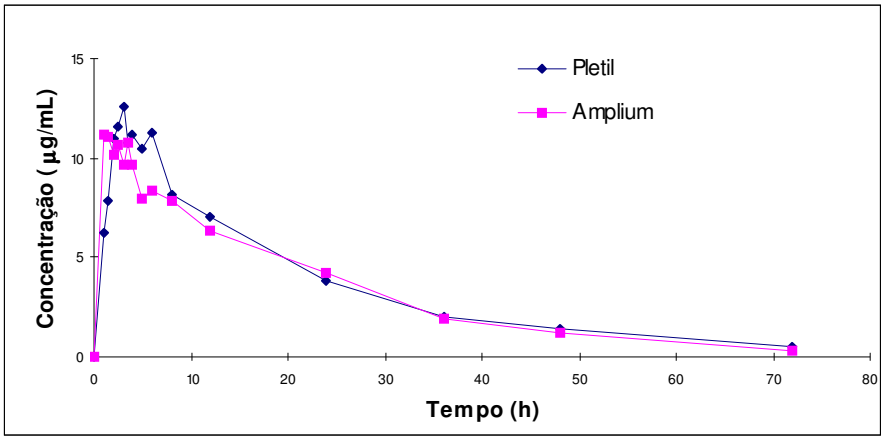


Figura AC.2 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 2.

Tabela AC.4 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 2.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	3,00	12,56	249,19	260,54	16,74	1,92	46,36
Amplium®	1,00	11,14	236,67	243,37	13,94	2,05	41,34

VOLUNTÁRIO 3

Tabela AC.5 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 3.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	9,70	9,12	8,51	8,67	8,24	8,11	7,75	6,97	6,57	6,33	6,00	2,77	1,43	0,81	0,25
Amplium®	NQ	4,01	9,59	9,75	9,27	9,40	8,73	8,67	8,34	7,60	6,59	5,41	3,16	1,77	0,90	0,30

NQ = não quantificável

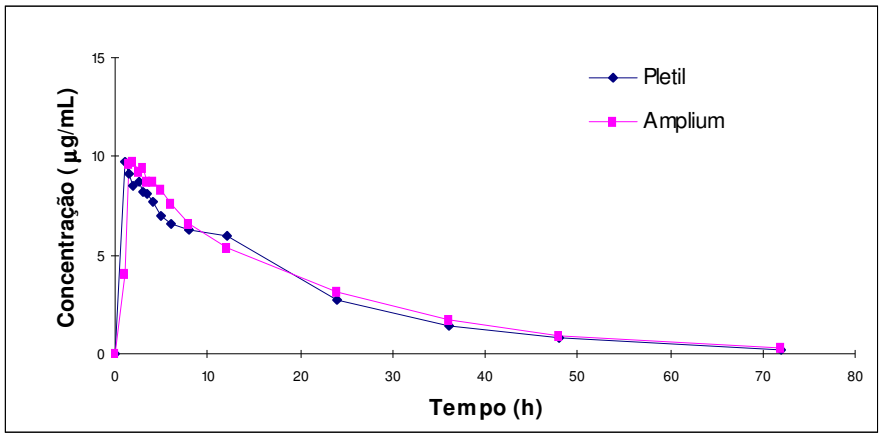


Figura AC.3 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 3.

Tabela AC.6 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 3.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,00	9,70	186,24	191,25	14,11	2,61	53,25
Amplium®	2,00	9,75	194,61	200,75	14,20	2,49	51,04

VOLUNTÁRIO 4

Tabela AC.7 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 4.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	10,37	9,52	9,47	9,33	8,70	8,56	8,00	7,75	7,13	6,10	4,84	2,88	1,56	0,98	0,29
Amplium®	NQ	9,45	8,94	9,09	9,58	8,38	8,38	8,00	8,01	6,91	5,90	5,02	3,06	1,72	1,06	0,33

NQ = não quantificável

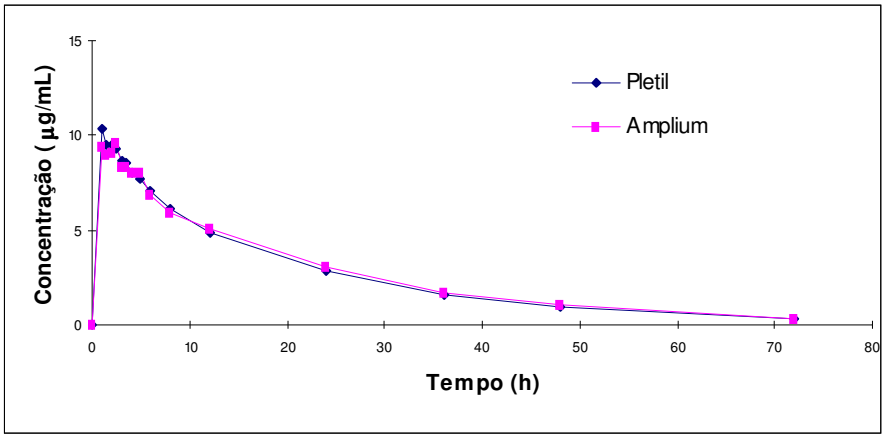


Figura AC.4 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 4.

Tabela AC.8 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 4.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,00	10,37	186,49	192,69	14,71	2,59	55,09
Amplium®	2,50	9,58	191,99	199,25	15,07	2,51	54,55

VOLUNTÁRIO 5

Tabela AC.9 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 5.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	7,29	8,35	7,83	7,86	7,63	7,57	7,58	7,46	7,03	6,35	5,22	3,02	1,59	1,00	0,36
Amplium®	NQ	11,12	9,92	9,08	8,36	8,24	8,32	7,83	7,81	7,11	6,19	5,23	3,22	1,79	1,09	0,43

NQ = não quantificável

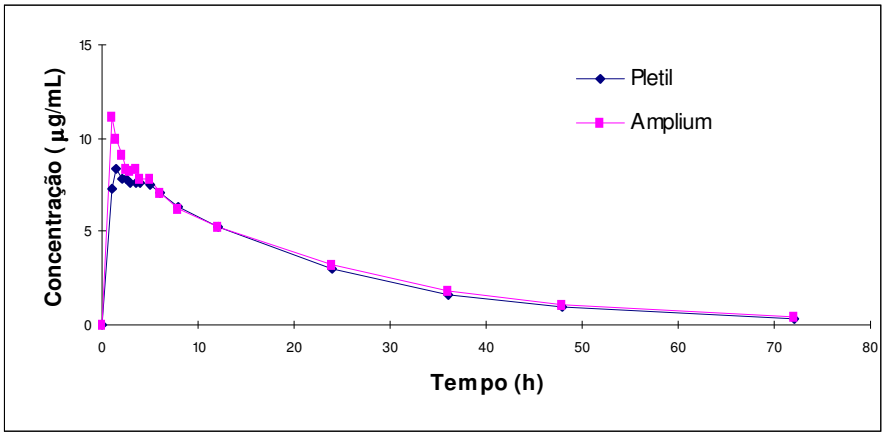


Figura AC.5 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 5.

Tabela AC.10 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 5.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,50	8,35	187,24	196,11	16,86	2,55	62,03
Amplium®	1,00	11,12	199,86	210,51	17,37	2,38	59,53

VOLUNTÁRIO 6

Tabela AC.11 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 6.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	9,53	9,92	9,58	9,69	9,62	9,15	9,15	8,56	7,51	6,57	4,76	3,08	1,76	1,04	0,38
Amplium®	NQ	1,96	4,51	7,72	11,63	11,05	10,20	10,12	9,42	8,67	7,58	5,82	3,37	1,81	1,04	0,32

NQ = não quantificável

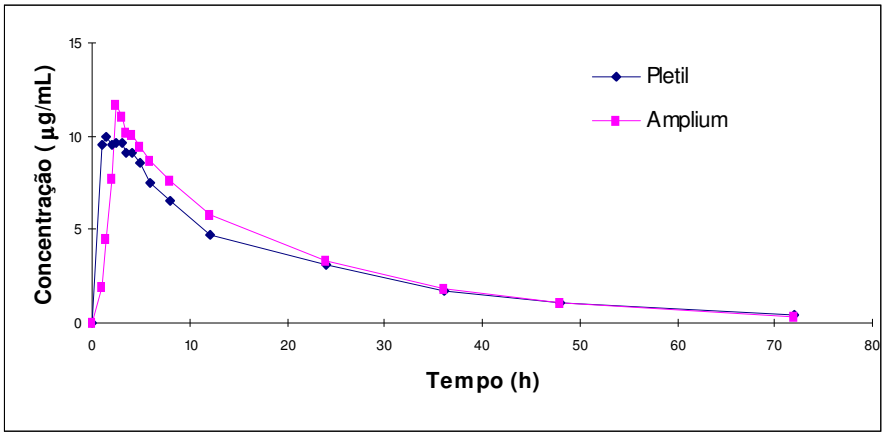


Figura AC.6 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 6.

Tabela AC.12 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 6.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,50	9,92	196,95	205,72	16,19	2,43	56,79
Amplium®	2,50	11,63	208,01	214,54	14,26	2,33	47,95

VOLUNTÁRIO 7

Tabela AC.13 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 7.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	11,65	10,69	12,47	10,38	9,91	9,55	9,19	8,94	8,17	6,97	6,07	2,67	1,81	1,09	0,42
Amplium®	NQ	3,06	10,24	11,47	10,21	10,16	9,83	9,67	9,04	8,09	7,14	5,65	2,48	1,43	0,80	0,28

NQ = não quantificável

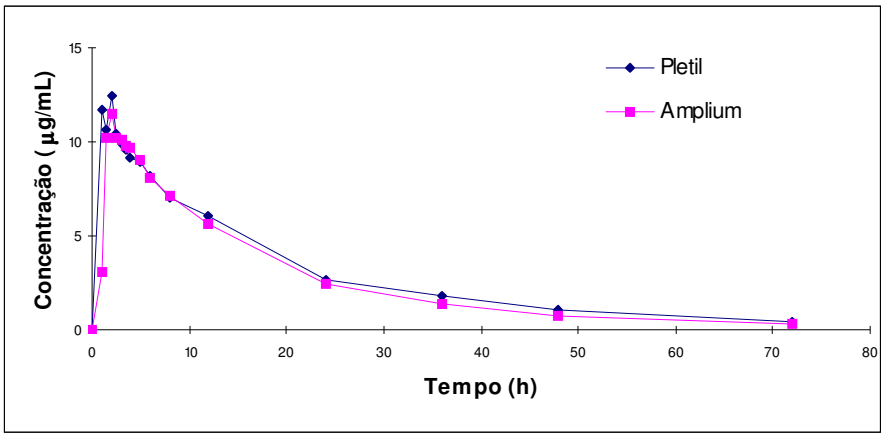


Figura AC.7 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 7.

Tabela AC.14 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 7.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	2,00	12,47	211,19	221,55	17,11	2,26	55,72
Amplium®	2,00	11,47	187,96	194,29	15,50	2,57	57,57

VOLUNTÁRIO 8

Tabela AC.15 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 8.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	5,98	6,99	7,32	7,18	7,19	6,88	6,70	6,80	5,98	5,40	4,20	1,83	0,97	0,58	0,20
Amplium®	NQ	6,28	6,32	6,75	6,24	6,10	5,98	5,99	5,50	5,29	4,77	3,53	1,80	0,93	0,53	0,14

NQ = não quantificável

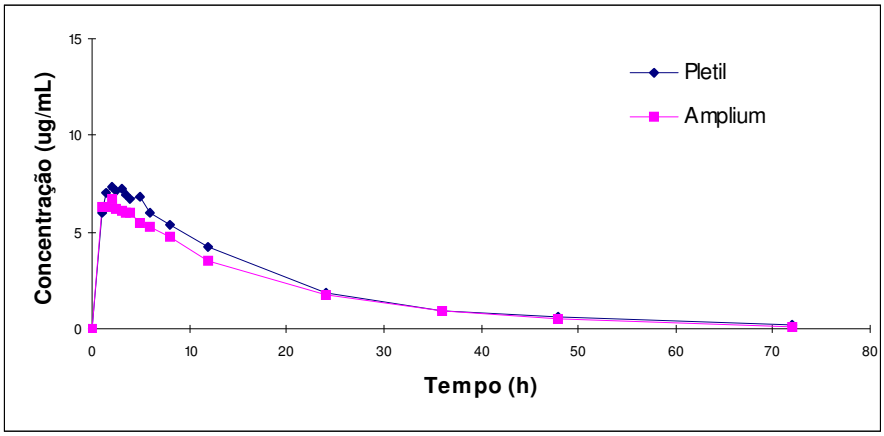


Figura AC.8 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 8.

Tabela AC.16 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 8.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	2,00	7,32	139,27	143,96	15,97	3,47	80,03
Amplium®	2,00	6,75	124,96	127,59	13,03	3,92	73,66

VOLUNTÁRIO 10

Tabela AC.17 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 10.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	10,89	9,55	8,84	8,67	8,38	8,23	8,07	7,55	7,11	6,20	4,98	2,99	1,83	1,16	0,41
Amplium®	NQ	10,22	9,62	8,99	8,62	8,31	8,28	7,86	7,52	7,08	6,49	5,24	2,99	1,86	1,02	0,34

NQ = não quantificável

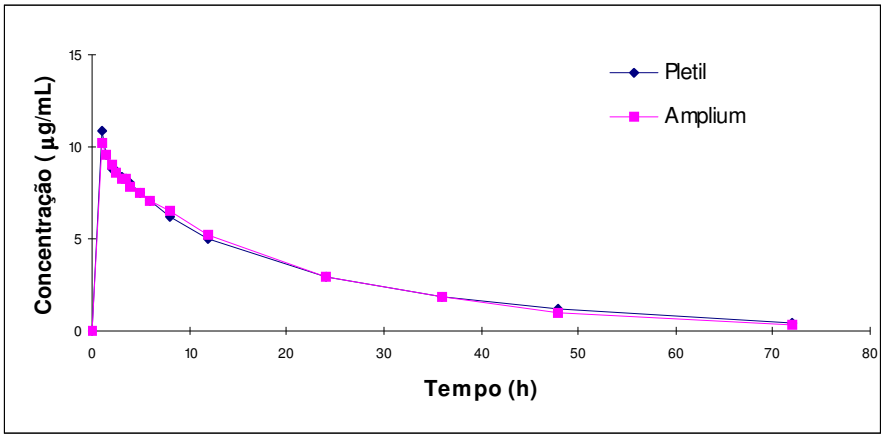


Figura AC.9 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 10.

Tabela AC.18 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 10.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,00	10,89	196,37	206,15	16,54	3,22	71,81
Amplium®	1,00	10,22	195,68	203,07	14,87	2,27	50,79

VOLUNTÁRIO 12

Tabela AC.19 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 12.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	6,88	7,26	7,28	7,07	6,73	6,63	6,58	6,28	5,83	5,34	4,52	2,87	1,52	0,88	0,29
Amplium®	NQ	9,38	8,86	8,13	7,77	7,58	6,92	6,67	5,70	5,97	5,41	4,60	2,74	1,41	0,88	0,29

NQ = não quantificável

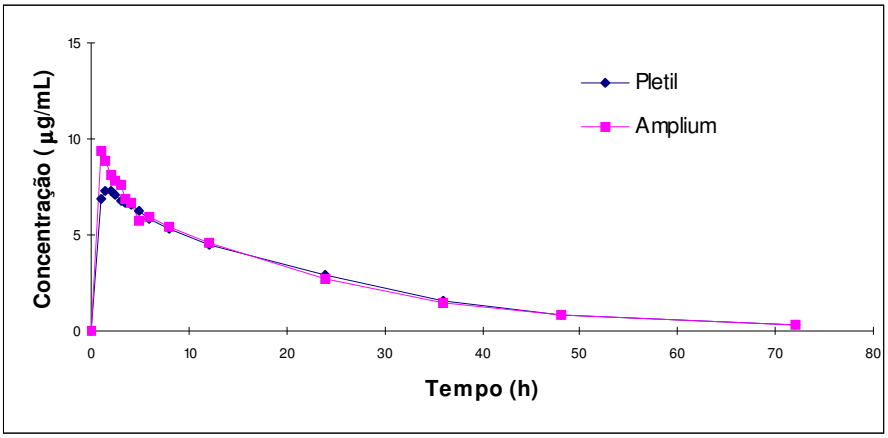


Figura AC.10 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 12.

Tabela AC.20 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 12.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	2,00	7,28	176,70	183,16	15,20	2,73	59,87
Amplium®	1,00	9,38	168,55	175,10	15,64	2,86	64,46

VOLUNTÁRIO 13

Tabela AC.21 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 13.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	8,95	10,93	9,01	8,47	8,46	7,78	7,91	7,36	6,21	6,15	4,33	2,10	1,71	0,99	0,43
Amplium®	NQ	10,12	9,52	8,27	8,08	9,00	8,07	9,47	6,51	6,63	6,56	4,91	2,87	1,94	1,08	0,40

NQ = não quantificável

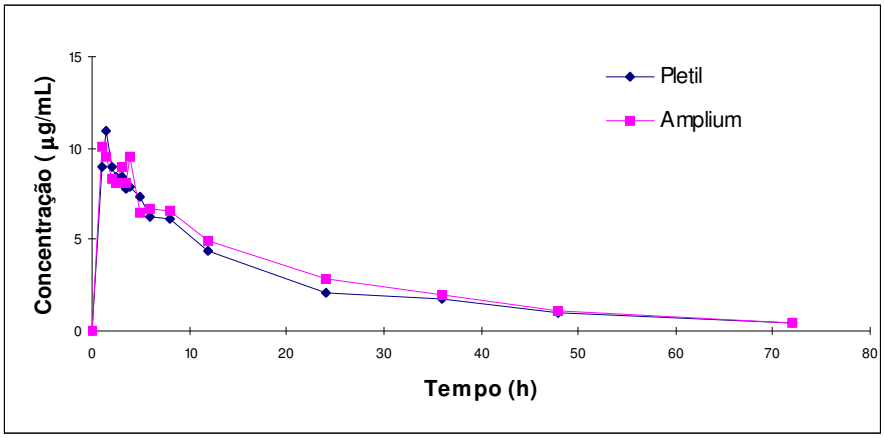


Figura AC.11 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 13.

Tabela AC.22 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 13.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,50	10,93	173,39	182,81	15,30	2,74	60,38
Amplium®	1,00	10,12	193,54	202,65	15,86	2,47	56,46

VOLUNTÁRIO 14

Tabela AC.23 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 14.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	11,22	11,10	10,17	10,63	10,54	10,84	9,46	9,07	7,78	7,74	5,90	2,67	1,14	0,72	0,15
Amplium®	NQ	11,54	10,19	9,35	7,97	7,45	8,93	8,94	7,57	5,81	5,19	4,24	2,33	1,08	0,53	0,13

NQ = não quantificável

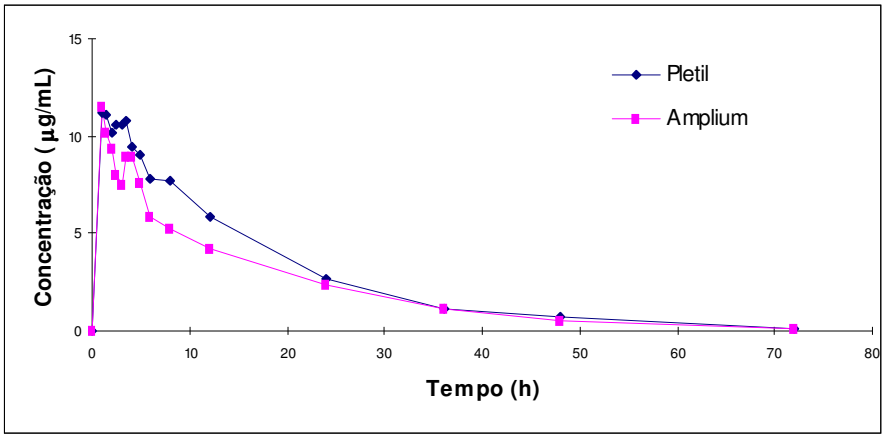


Figura AC.12 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 14.

Tabela AC.24 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 14.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,00	11,22	193,83	196,35	11,89	2,55	43,68
Amplium®	1,00	11,54	155,19	157,37	11,73	3,18	53,76

VOLUNTÁRIO 15

Tabela AC.25 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 15.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	9,79	12,27	12,26	11,87	11,79	10,67	10,21	10,06	7,95	8,57	5,84	3,64	1,89	0,97	0,25
Amplium®	NQ	13,15	12,69	14,71	12,15	10,93	11,36	10,73	8,97	9,53	8,15	5,89	3,73	2,22	1,07	0,34

NQ = não quantificável

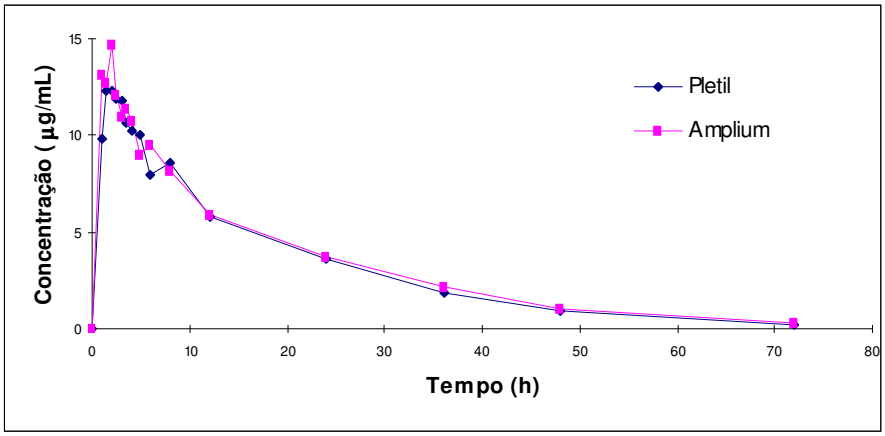


Figura AC.13 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 15.

Tabela AC.26 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 15.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,50	12,27	225,62	230,05	12,31	2,17	38,60
Amplium®	2,00	14,71	238,39	245,08	13,54	2,04	39,85

VOLUNTÁRIO 16

Tabela AC.27 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 16.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	10,91	8,67	9,90	9,19	7,94	7,60	7,69	7,17	6,37	6,26	4,65	2,34	1,11	0,59	0,11
Amplium®	NQ	9,02	9,16	9,11	8,39	8,78	8,18	6,75	6,59	6,64	6,46	4,54	2,41	1,06	0,50	0,13

NQ = não quantificável

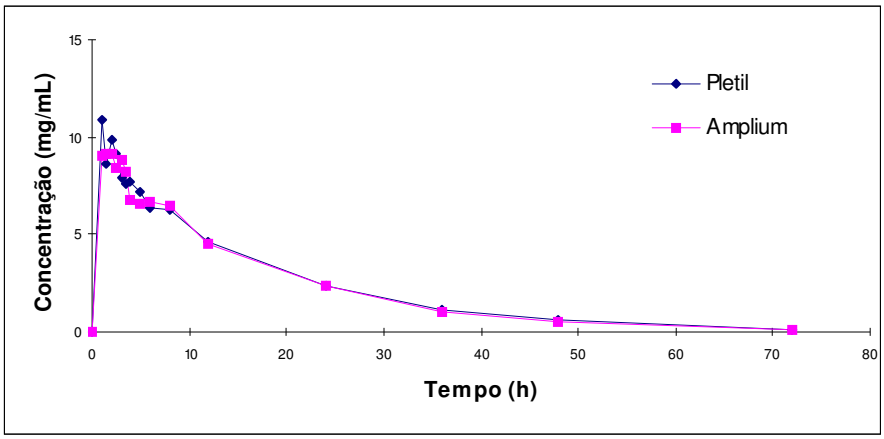


Figura AC.14 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 16.

Tabela AC.28 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 16.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,00	10,91	161,73	163,48	10,76	3,06	47,49
Amplium®	1,50	9,16	158,05	160,28	11,95	3,12	53,78

VOLUNTÁRIO 17

Tabela AC.29 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 17.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	13,26	13,01	12,36	12,34	11,74	11,15	10,96	10,57	9,64	8,45	6,39	3,49	1,79	0,96	0,22
Amplium®	NQ	10,90	11,32	10,74	10,54	10,39	10,39	10,06	9,50	8,95	7,88	6,30	2,96	1,43	0,81	0,20

NQ = não quantificável

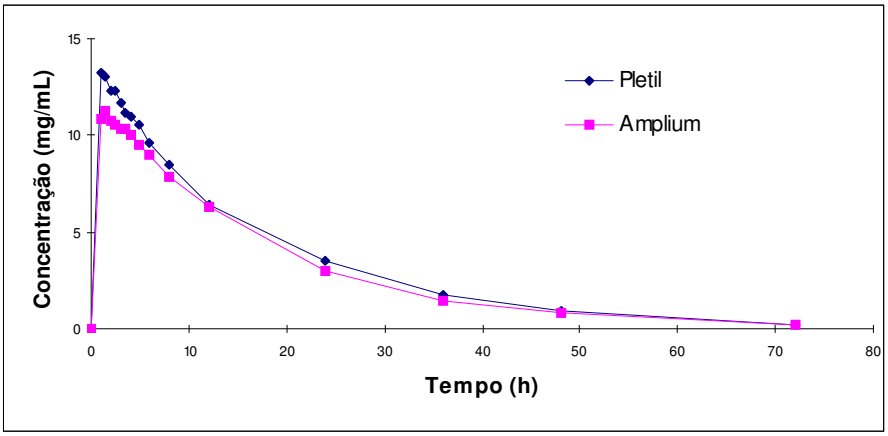


Figura AC.15 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 17.

Tabela AC.30 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 17.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,00	13,26	233,29	236,94	11,71	2,11	35,65
Amplium®	1,50	11,32	209,03	212,62	12,53	2,35	42,52

VOLUNTÁRIO 18

Tabela AC.31 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 18.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	11,69	11,30	10,82	10,23	9,91	9,83	9,00	8,81	8,61	7,36	5,51	2,76	1,34	0,71	0,21
Amplium®	NQ	12,31	11,39	11,15	11,41	10,81	10,06	9,38	8,66	7,78	6,89	5,45	2,57	1,07	0,58	0,15

NQ = não quantificável

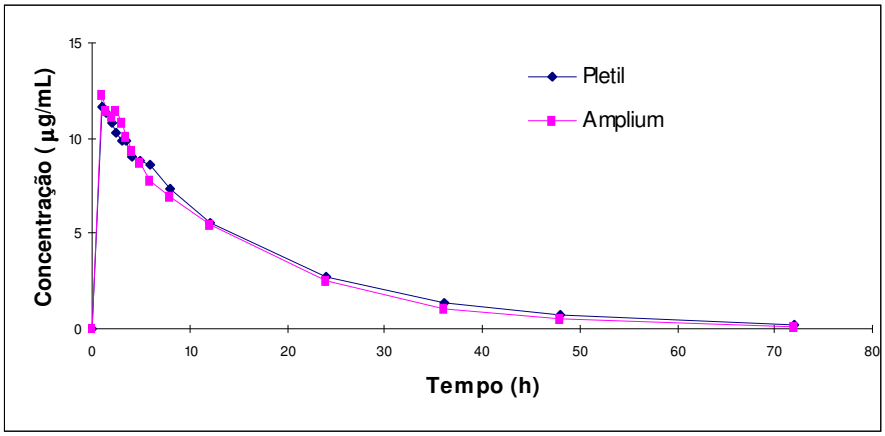


Figura AC.16 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 18.

Tabela AC.32 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 18.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,00	11,69	194,11	198,08	13,33	2,52	48,54
Amplium®	1,00	12,31	184,15	186,75	12,42	2,68	47,98

VOLUNTÁRIO 19

Tabela AC.33 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 19.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	11,36	11,74	11,61	11,26	8,82	8,88	8,27	7,92	6,97	6,26	5,11	2,95	1,55	0,91	0,30
Amplium®	NQ	5,76	9,20	9,56	9,25	8,87	8,43	8,42	7,62	7,30	6,65	5,19	2,62	1,47	0,87	0,34

NQ = não quantificável

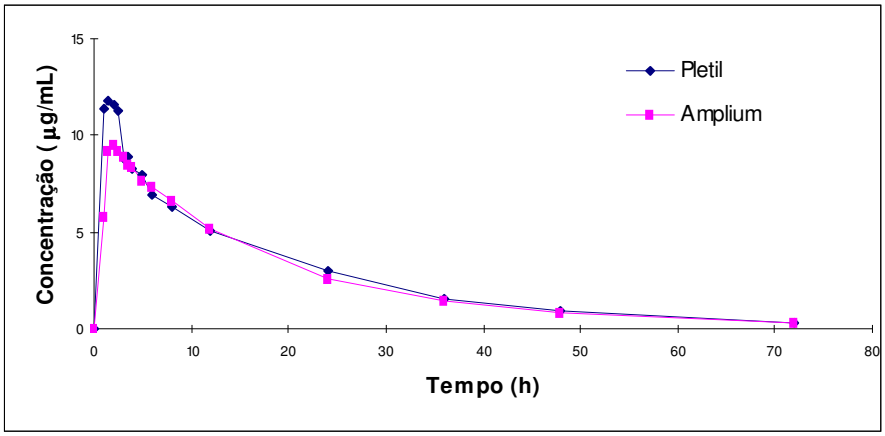


Figura AC.17 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 19.

Tabela AC.34 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 19.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,50	11,74	192,86	199,40	15,13	2,51	54,75
Amplium®	2,00	9,56	182,00	190,50	17,24	2,62	65,29

VOLUNTÁRIO 20

Tabela AC.35 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 20.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	2,35	11,54	14,26	12,89	12,92	12,47	12,19	11,76	10,50	9,18	7,63	3,71	1,88	1,01	0,26
Amplium®	NQ	12,93	13,00	11,48	11,89	10,75	10,92	10,38	9,81	8,84	7,53	6,71	2,71	1,33	0,68	0,18

NQ = não quantificável

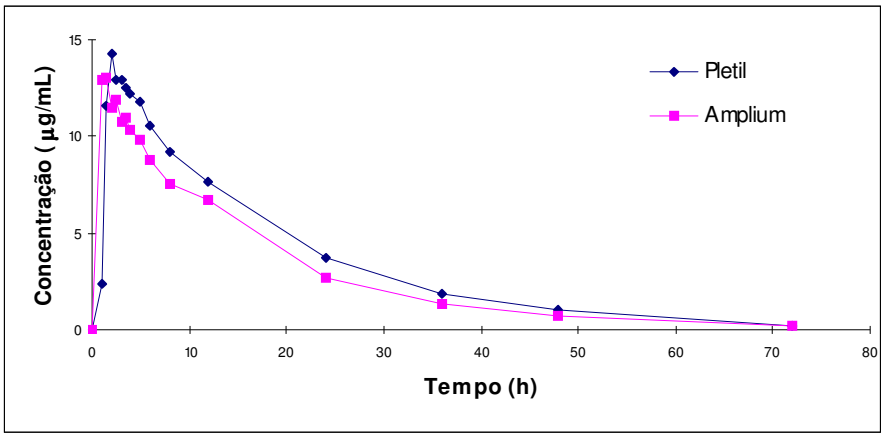


Figura AC.18 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 20.

Tabela AC.36 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 20.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	2,00	14,26	247,50	252,11	12,46	1,98	35,67
Amplium®	1,50	13,00	208,88	212,16	12,51	2,36	42,54

VOLUNTÁRIO 21

Tabela AC.37 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 21.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	13,73	13,13	13,52	13,93	13,27	12,41	12,35	10,54	9,63	9,24	6,70	2,93	1,35	0,59	NC
Amplium®	NQ	13,15	12,83	13,01	12,12	13,76	11,58	11,43	10,98	9,11	8,38	6,30	3,30	1,33	0,60	0,12

NQ = não quantificável; NC = não coletado

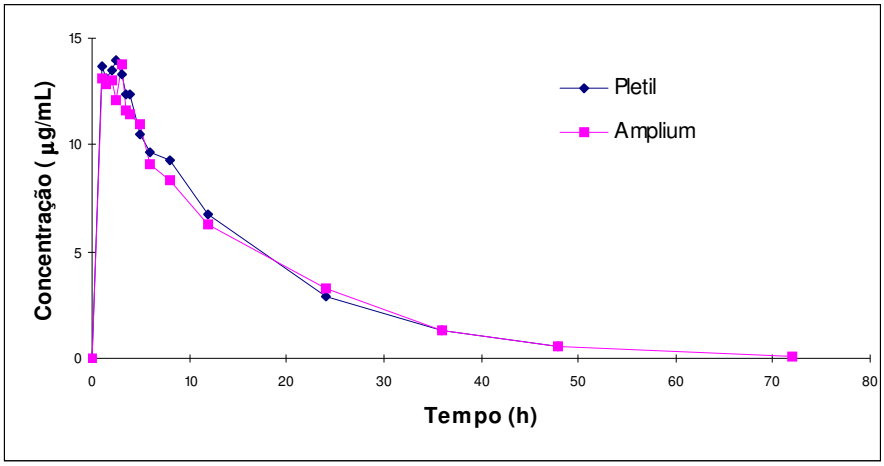


Figura AC.19 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 21.

Tabela AC.38 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 21.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	2,50	13,93	213,90	222,76	10,39	2,24	33,65
Amplium®	3,00	13,76	218,15	220,04	10,53	2,27	34,53

VOLUNTÁRIO 22

Tabela AC.39 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 22.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	0,60	1,42	2,86	3,61	7,22	11,07	10,93	10,25	9,28	7,85	7,17	4,01	2,36	1,41	0,37
Amplium®	NQ	10,68	10,24	9,97	11,04	8,95	9,91	9,38	8,23	8,19	7,37	5,68	3,07	1,92	0,98	0,34

NQ = não quantificável

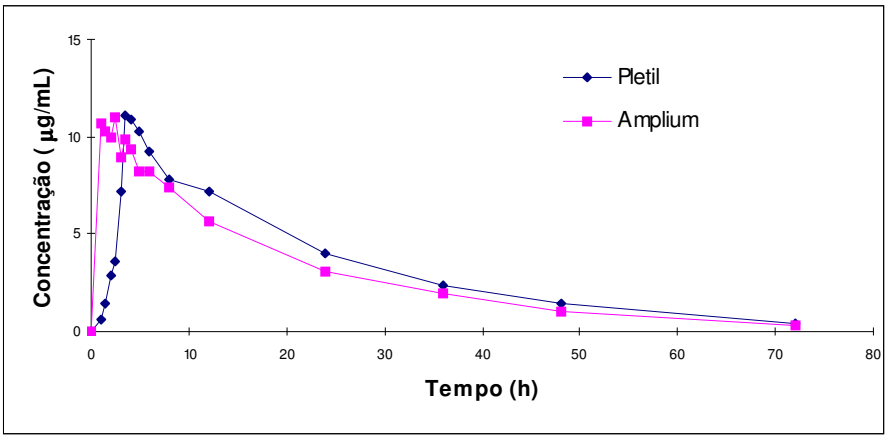


Figura AC.20 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 22.

Tabela AC.40 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 22.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	3,50	11,07	233,13	240,16	13,25	2,08	39,81
Amplium®	2,50	11,04	209,86	217,15	14,68	2,30	48,78

VOLUNTÁRIO 23

Tabela AC.41 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 23.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	12,37	11,48	10,49	10,23	10,10	10,07	8,61	9,60	7,72	7,22	5,37	2,84	0,89	0,39	0,12
Amplium®	NQ	11,62	11,62	11,95	11,31	9,17	9,77	9,55	8,59	8,40	6,09	5,85	2,99	1,37	0,73	0,18

NQ = não quantificável

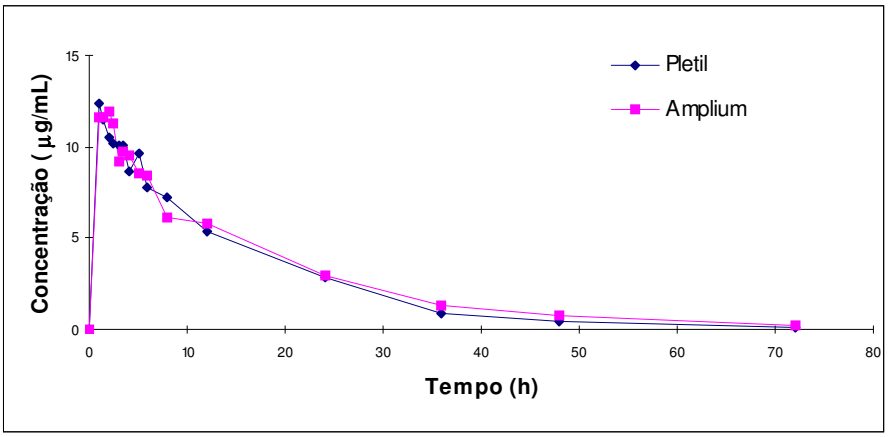


Figura AC.21 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 23.

Tabela AC.42 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 23.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,00	12,37	180,97	183,16	12,67	2,73	49,91
Amplium®	2,00	11,95	196,62	199,85	12,31	2,50	44,44

VOLUNTÁRIO 24

Tabela AC.43 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 24.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	11,60	12,80	11,02	10,30	10,78	10,39	9,63	8,39	7,79	7,50	5,84	2,61	1,28	0,62	0,16
Amplium®	NQ	6,97	8,59	11,82	11,72	11,84	11,44	11,25	10,87	10,03	8,09	6,98	3,40	NC	0,72	0,14

NQ = não quantificável; NC = não coletado

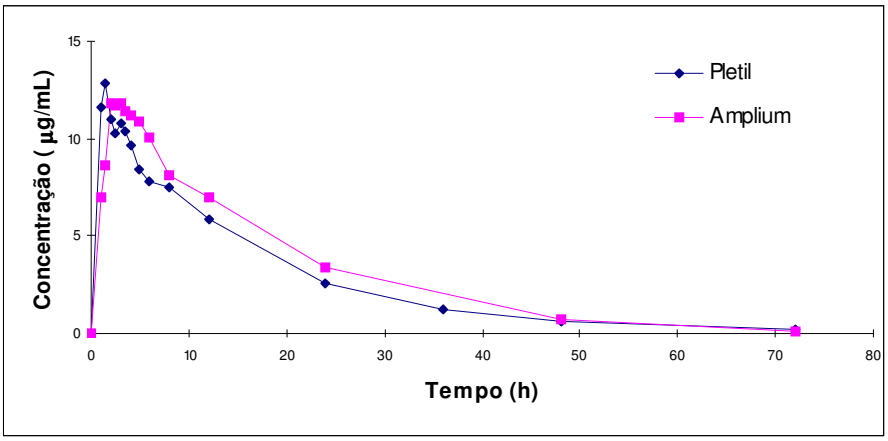


Figura AC.22 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 24.

Tabela AC.44 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 24.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,50	12,80	192,52	195,43	12,24	2,56	45,20
Amplium®	3,00	11,84	227,61	229,80	10,52	2,18	33,02

VOLUNTÁRIO 25

Tabela AC.45 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 25.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	4,40	8,35	10,53	11,03	12,52	10,67	11,45	11,06	9,81	7,94	7,08	3,11	1,96	1,20	0,37
Amplium®	NQ	11,36	12,23	11,01	10,80	10,41	10,91	10,17	10,02	9,39	7,36	6,18	3,52	1,79	1,09	0,37

NQ = não quantificável

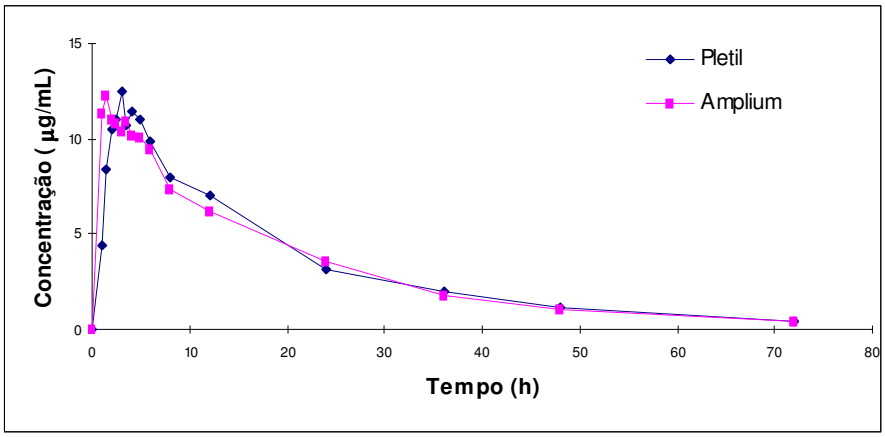


Figura AC.23 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 25.

Tabela AC.46 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 25.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	3,00	12,52	231,52	239,53	14,90	2,09	44,89
Amplium®	1,50	12,23	227,30	235,84	15,86	2,12	48,51

VOLUNTÁRIO 26

Tabela AC.47 Concentrações plasmáticas de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 26.

Produto	Concentração (µg/mL)															
	0 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Pletil®	NQ	12,78	11,72	10,83	11,25	12,35	10,94	10,34	9,90	8,63	6,82	6,50	3,56	1,71	1,14	0,43
Amplium®	NQ	12,79	11,73	10,77	10,43	10,89	10,91	9,33	9,56	8,04	8,78	5,48	3,07	2,43	1,35	0,40

NQ = não quantificável

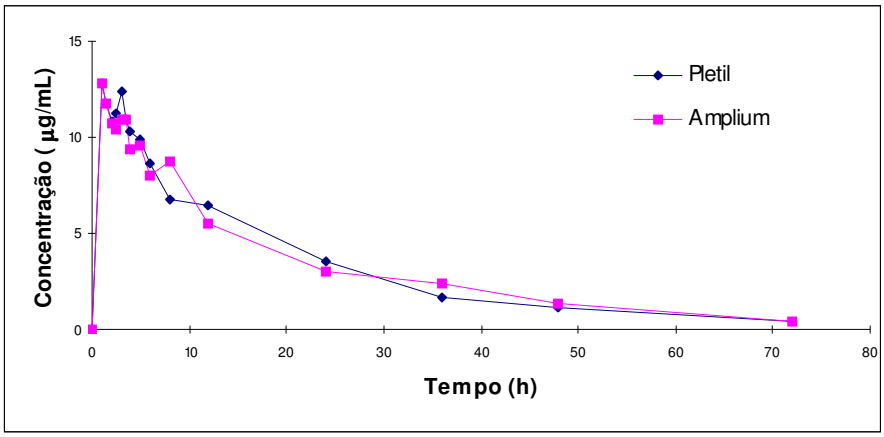


Figura AC.24 Curvas de decaimento plasmático após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 26.

Tabela AC.48 Parâmetros farmacocinéticos de tinidazol após administração dos produtos referência (Pletil®, lote G311) e teste (Amplium®, lote 1732) ao voluntário 26.

Produto	t_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-t} (µgxh/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µgxh/mL)	$t_{(1/2)el}$ (h)	Cl (L/h)	Vd (L)
Pletil®	1,00	12,78	230,08	238,80	13,94	2,09	42,13
Amplium®	1,00	12,79	230,90	239,02	13,92	2,09	42,01

ANEXO D

CÓPIA DO LAUDO DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

Equifarma	EQUIFARMA BRASIL SERVIÇOS LTDA	
NÚMERO	**NOME DO ESTUDO**	PERÍODO DO ESTUDO
001/2004	**Equivalência Farmacêutica de Tinidazol 500mg/comprimido**	**27/05/2004 à 31/05/2004**

CERTIFICADO DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

1.0 DADOS DA EMPRESA

EMPRESA SOLICITANTE: Farmasa – Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A.
ENDEREÇO: Rua Nova York, n°245 – São Paulo - SP

2.0 DADOS DOS MEDICAMENTOS ANALISADOS

Dados das amostras	Medicamento Teste	Medicamento de Referência
Nome genérico (DCB ou DCI)	Tinidazol	Tinidazol
Nome fantasia	Amplium	Pletil
Fabricante	Farmasa – Laboratório Americano de Farmacoterapia AS	Pharmacia Brasil Ltda
Endereço do fabricante	Rua Nova York, n°245 – São Paulo – SP	Rua da Independência, n°706 – São Paulo - SP
CNPJ	61.150.819/0001-20	71.699.490/0008-80
Registro no MS	1.0394.0122	1.2389.0090
Forma Farmacêutica	Comprimido	Comprimido
Apresentação (dosagem)	500mg/comprimido	500mg/comprimido
Número da Nota Fiscal	111661 e 333123	28046
Número do Lote	1732	G311
Data de Fabricação	03/04	03/03
Prazo de Validade	03/08	03/06

3.0 RESULTADOS DOS MEDICAMENTOS ANALISADOS

ENSAIOS	RESULTADOS		ESPECIFICAÇÕES	REFERÊNCIA
	Medicamento Teste	Medicamento Referência		
Aspecto (descrição)	Comprimido redondo, com revestimento amarelo, impresso em uma das faces a letra F e na outra um sulco central.	Comprimido redondo, com revestimento branco, sem inscrições.	-	-
Peso Médio (mg)	706,7 com variação de -3,8% a 2,7%. De Acordo	678,1 com variação de -3,6% a 2,9%. De Acordo	Mín: 694,5mg/cp Máx: 737,5mg/cp	PA018/01 - FARMASA
Dureza (Kgf)	17,49 De Acordo	15,52 De Acordo	Não menos que 3Kgf	Farmacopéia Brasileira 4° ed.
Desintegração	14 minutos e 46 segundos	4 minutos e 18 segundos	Não mais que 30 minutos	Farmacopéia Brasileira 4° ed.
Identificação	De Acordo	De Acordo	A amostra apresenta valores Máximos e Mínimos de absorção, semelhantes ao do espectro do padrão.	PA018/01 - FARMASA
Dissolução	98,5% De Acordo	101,1% De Acordo	Q > 85%	PA018/01 - FARMASA
Doseamento	Contém 96,8% ou 484,2mg de Tinidazol por comprimido.	Contém 98,6% ou 493,1mg de Tinidazol por comprimido.	De 90% a 110% do Declarado	PA018/01 - FARMASA
Uniformidade de Dosagem	De 97,1% a 98,0% do valor declarado de Tinidazol e DPR igual a 2,8%	De 96,2% a 102,9% do valor declarado de Tinidazol e DPR igual a 4,1%	De 85% a 115% do valor declarado do fármaco e DPR menor ou igual a 6,0%	Farmacopéia Brasileira 4° ed.

4.0 OBSERVAÇÃO

- Estudo de Equivalência Farmacêutica:
  Os medicamentos teste e referência foram submetidos aos testes acima relacionados, segundo Farmacopéia Brasileira 4° edição e metodologia do contratante (PA018/01 – FARMASA).
- Resultados Encontrados:
  Os lotes em estudo do medicamento teste e do referência cumpriram as especificações contidas na Farmacopéia Brasileira 4° edição e na metodologia do contratante (PA018/01 – FARMASA).

5.0 CONCLUSÃO

Comparando os resultados encontrados para o Medicamento Teste e para o Medicamento Referência, é possível concluir serem equivalentes farmacêuticos os lotes analisados (vide item 2 deste certificado).

6.0 ASSINATURAS

Nome	Assinatura
Analista: Eliane de Brito	
Responsável Técnico: Mila Buarque	