UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

MÉTODOS BIOFARMACÊUTICOS
NA GARANTIA DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DE
MEDICAMENTOS

VALENTINA PORTA

São Paulo

2013

Valentina Porta

**Métodos Biofarmacêuticos
na Garantia de Eficácia e Segurança de
Medicamentos**

Texto sistematizado apresentado ao Departamento
de Farmácia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Livre-Docente

São Paulo

2013

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira, pela confiança e estímulo contínuos.

À Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra e à Profa. Dra. Eunice Kazue Kano, pela amizade especial e pela importante parceria científica.

À Profa. Dra. Telma Mary Kaneko, pelo incentivo e companhia.

Ao Prof. Eric Beyssac e ao Prof. Jean-Michel Cardot, pela generosidade com que me receberam em seu laboratório e compartilharam comigo seus conhecimentos.

À Profa. Silvia Santos e à Profa. Sílvia Storpirtis, por terem me proporcionado a experiência da pesquisa.

À Profa. Dra. Chang Chiann, pela colaboração em inúmeros projetos.

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz pela convivência e aprendizado no Biofar.

Aos meus orientados de trabalhos de conclusão de curso, iniciação científica, mestrado e doutorado, em especial àqueles cujas teses, dissertações e publicações compõem o presente texto.

À minha família, pelo tempo cedido.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Farmácia, pelos desafios e oportunidades de crescimento.

À Fapesp, à Capes, ao CNPq e à Pró-reitoria de Pesquisa da USP pelas bolsas e auxílios concedidos.

Aos revisores e relatores de artigos, trabalhos apresentados em congressos e projetos de pesquisa, e aos membros de todas as bancas que me avaliaram ao longo da carreira, pelas valiosas sugestões.

*Da terra o Senhor criou os remédios,
o homem sensato não os despreza.
Por eles, ele curou e aliviou,
o farmacêutico fez com eles misturas.
E assim suas obras não tem fim,
e por ele o bem-estar se difunde sobre a terra.*

Eclo 38, 4, 7-8

Prefácio

O uso racional de medicamentos, definido pela Política Nacional de Medicamentos, é o processo que compreende a prescrição apropriada; a disponibilidade oportuna e a preços acessíveis; a dispensação em condições adequadas; e o consumo nas doses indicadas, nos intervalos definidos e no período de tempo indicado de medicamentos eficazes, seguros e de qualidade.

A disponibilidade de medicamentos a preços acessíveis em nosso País vem sendo garantida, desde 1999, pela presença de medicamentos genéricos no mercado farmacêutico. Além de serem comercializados a um preço mais baixo que os medicamentos de referência, sua chegada proporcionou queda de preços também dos produtos de marca, tanto referências quanto similares.

Entretanto, para o uso racional, não basta apenas reduzir os custos: é essencial garantir a eficácia e segurança dos genéricos e demais medicamentos disponíveis para a população. Neste contexto, os métodos biofarmacêuticos tem desempenhado um papel relevante, possibilitando desde avaliações *in vitro* e *in vivo* que garantem a intercambialidade entre genéricos e referência até estudos de permeabilidade em diversos modelos de membranas para o *screening* de substâncias farmacologicamente ativas visando à seleção daquelas que apresentam características favoráveis ao seu uso no ser humano, passando por correlações *in vitro-in vivo* que garantem a excelência do desempenho *in vivo* de um determinado medicamento mesmo após alterações na sua formulação.

O presente texto apresenta projetos desenvolvidos nas linhas de pesquisa de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos, correlações *in vitro-in vivo*, quantificação de fármacos em matrizes biológicas e bioisenção. Alguns descrevem a aplicação de métodos biofarmacêuticos na avaliação de medicamentos, outros apresentam investigação sobre os próprios métodos, na tentativa de identificar suas limitações e aperfeiçoá-los. Os mais recentes avançam na direção de propor novos métodos, capazes de responder aos desafios impostos pela evolução das Ciências Farmacêuticas e às limitações decorrentes da necessidade cada vez maior de se garantir a eticidade das pesquisas científicas, diminuindo o uso de seres humanos em experimentos. Os trabalhos aqui apresentados incluem resultados de dissertações de mestrado e teses de doutorado realizadas sob orientação da autora, além de publicações em revistas especializadas, disponibilizadas ao final do volume.

É importante ressaltar que este tipo de pesquisa apresenta grande interesse para o paciente, pois possibilita garantir a qualidade do medicamento utilizado pela população. Neste sentido, os métodos biofarmacêuticos constituem ferramentas poderosas na promoção do uso racional de medicamentos.

Sumário

1 Medicamentos genéricos.....	15
1.1 Introdução.....	17
1.2 Eficácia e segurança do medicamento genérico.....	27
2 Bioequivalência.....	35
2.1 Aspectos gerais.....	37
2.2 Planejamento e execução de ensaios de bioequivalência.....	37
2.2.1 Etapa clínica.....	41
2.2.2 Etapa analítica.....	49
2.2.3 Etapa estatística.....	60
2.2.4 Avaliação de diferentes cronogramas de coleta de amostras biológicas em estudos de bioequivalência e análise da influência do teor de fármaco sobre os resultados destes estudos.....	70
2.2.5 Situações específicas.....	78
2.2.5.1 Substâncias endógenas.....	79
2.2.5.2 Misturas racêmicas.....	81
2.2.5.2.1 Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros.....	86
2.3 Intercambialidade entre genéricos.....	98
2.3.1 Emprego de metanálise para avaliação da intercambialidade entre medicamentos.....	99
3 Correlação <i>in vitro-in vivo</i>	105
3.1 Aspectos gerais.....	107
3.2 Obtenção de correlações <i>in vitro-in vivo</i> (CIVIV).....	109
3.3 Desenvolvimento de correlação <i>in vitro-in vivo</i> para comprimidos de liberação modificada contendo fármaco de classe biofarmacêutica II.....	117
4 Classificação biofarmacêutica.....	125
4.1 Aspectos gerais.....	127
4.2 Determinação de solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB).....	131
5 Considerações finais.....	139
6 Referências bibliográficas.....	145

1

Medicamentos genéricos

1.1 Introdução

Os custos da saúde vêm aumentando continuamente ao longo das últimas décadas e atualmente atingem cerca de 18% do PIB nos EUA e entre 9 e 12% do PIB nos demais países desenvolvidos. No Brasil, estes custos alcançam 9% do PIB ([Organisation for Economic Co-operation and Development, 2011](#); [Organisation for Economic Co-operation and Development, 2012a](#); [Organisation for Economic Co-operation and Development, 2012c](#)). Os medicamentos correspondem, em média, a 16% dos gastos totais com saúde ([Organisation for Economic Co-operation and Development, 2012b](#)) e, portanto, a redução de seus custos constitui uma das principais estratégias para promover economia de recursos na área da saúde ([Midha, McKay, 2009](#)). Uma maneira bastante eficiente de reduzir os custos dos medicamentos é a introdução de produtos genéricos no mercado ([Bearden, Mason, 1979](#); [Nation, Sansom, 1994](#); [Midha, McKay, 2009](#)).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, ou *World Health Organization* - WHO), o medicamento genérico é similar a um medicamento inovador (também denominado referência ou pioneiro), contém o mesmo princípio ativo que este, na mesma quantidade, além de ser administrado pela mesma via, podendo variar em relação à forma farmacêutica e à forma química do princípio ativo. Geralmente, é produzido após a expiração da proteção patentária do medicamento inovador ([World Health Organization, 2012](#)). A equivalência terapêutica entre genérico e inovador está presente quando ambos apresentam a mesma eficácia e segurança. Consequentemente, equivalentes terapêuticos podem ser utilizados de forma intercambiável, sem prejuízo para o paciente ([Midha, McKay, 2009](#); [U.S. Department of Health and Human Services, 2012](#)). A OMS não define a intercambialidade como condição essencial ao medicamento genérico, ao contrário do que acontece em muitos países que introduziram os genéricos em seu mercado farmacêutico, tais como Brasil ([Brasil, 1999a](#); [Brasil, 2007b](#)), EUA ([Meyer, 1999](#)), Japão ([Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, 2011](#)), Canadá ([Health Canada, 2006](#)) e União Europeia ([European Medicines Agency, 2010a](#)).

O desenvolvimento de versões genéricas de um medicamento não requer a realização de ensaios pré-clínicos e clínicos para avaliação de segurança e eficácia, pois estes estudos já foram realizados pelo fabricante do inovador, quando este obteve seu registro e autorização de comercialização (Dighe, 1999). Cabe ao fabricante do genérico apenas comprovar que o seu produto é semelhante ao inovador, o que pode ser feito por meio de ensaios mais simples que os ensaios pré-clínicos e clínicos. Isto reduz os custos de desenvolvimento dos genéricos, permitindo que sejam comercializados a preços mais baixos que os inovadores (Dighe, 1999).

Cerca de um terço da população mundial, e metade da população brasileira, não tem acesso a medicamentos essenciais. Além disso, são notórios os problemas causados pela baixa qualidade de matérias-primas e produtos farmacêuticos que circulam no comércio internacional (Organização Pan-Americana da Saúde, 2005). Neste contexto, fica claro que medicamentos genéricos de boa qualidade tem um papel importante a desempenhar na saúde pública, desde que algumas condições essenciais estejam presentes, tais como legislação e regulamentações adequadas; autoridade regulatória capacitada e com credibilidade; ambiente econômico favorável e iniciativas de apoio e promoção que permitam a aceitação dos medicamentos genéricos pelos pacientes e pelos profissionais de saúde (Organização Pan-Americana da Saúde, 2005).

A adoção de políticas de medicamentos genéricos é capaz de promover profundas mudanças no mercado farmacêutico. Estima-se que tenham sido economizados 8,8 bilhões de dólares no ano 2000 nos EUA em função do uso de medicamentos genéricos (Haas *et al.*, 2005). Além disso, quanto maior a quantidade de genéricos disponíveis para um determinado inovador, menor será o preço de cada um dos genéricos. Se apenas um genérico está presente no mercado, seu preço é cerca 70% do preço do inovador. Entretanto, quando existem mais de cinco genéricos, o preço cai para cerca de 30% do preço do inovador (Meyer, 1999). No Brasil, a chegada dos medicamentos genéricos causou uma reviravolta importante no comércio farmacêutico, com queda generalizada de preços de produtos de referência, além de incremento importante na qualidade dos

medicamentos disponíveis para a população ([Organização Pan-Americana da Saúde, 2005](#)).

Entretanto, a implementação de políticas com grande potencial de influência no mercado não se faz sem percalços. Seu sucesso depende de planejamento adequado baseado em profundo conhecimento do mercado local, negociações com os atores deste mercado, atuação firme e tecnicamente embasada dos órgãos reguladores, constante vigilância por parte da sociedade e flexibilidade para realizar os ajustes necessários ao longo do processo.

Nos EUA, o marco inicial da regulação do mercado de medicamentos foi a aprovação, em 1906, do *Pure Food and Drug Act*, também denominado *Wiley Act*, juntamente com a designação do *Bureau of Chemistry* para regulamentar e fiscalizar a aplicação desta lei, transformando-o em uma agência reguladora federal. O *Wiley Act* proibiu o comércio interestadual de alimentos, bebidas ou medicamentos adulterados, além de determinar que a presença de substâncias capazes de causar dependência (como álcool, ópio, cocaína e morfina, entre outras) em medicamentos fosse informada aos consumidores. Em 1927, o *Bureau of Chemistry* passou a ser chamado *Food, Drug, and Insecticide Administration*, adotando a atual denominação *Food and Drug Administration* (FDA) a partir de 1930 ([Borchers et al., 2007](#)).

O *Pure Food and Drug Act* foi substituído, em 1938, pelo *Food, Drug and Cosmetic Act*. A aprovação desta lei foi uma resposta à morte de 107 pessoas no ano anterior, em decorrência do uso de uma solução de sulfanilamida contendo etilenoglicol como veículo. Para evitar outras tragédias deste tipo, a nova lei introduziu a exigência de comprovação de segurança para o registro de medicamentos novos ([Meyer, 1999](#); [Sabatini et al. 1999](#); [Borchers et al., 2007](#)). Após a expiração da proteção patentária dos medicamentos novos, qualquer fabricante poderia lançar no mercado um produto idêntico ou semelhante sem necessidade de solicitar o registro, bastando uma declaração do FDA de que tal produto não era um medicamento novo ([Meyer, 1999](#)).

A comprovação da eficácia dos medicamentos passou a ser requisito para seu registro a partir de 1962, com a aprovação da emenda Kefauver-Harris

ao *Food, Drug and Cosmetic Act* de 1938. Adicionalmente, esta emenda determinou que o FDA realizasse uma revisão da eficácia dos cerca de 4000 produtos introduzidos no mercado entre 1938 e 1962 (Meyer, 1999; Sabatini *et al.* 1999; Organização Pan-Americana da Saúde, 2005; Borchers *et al.*, 2007; Carpenter, Tobbell, 2011). Assim, os fabricantes dos medicamentos novos registrados neste período foram solicitados a submeter evidências de eficácia de seus produtos, enquanto que os fabricantes de produtos idênticos ou semelhantes tiveram que solicitar registro por meio de ANDAs (*abbreviated new drug applications*) contendo todas as informações necessárias ao registro de medicamentos novos, exceto dados de eficácia e segurança (Meyer, 1999; Borchers *et al.*, 2007). Assumiu-se, desta forma, que a igualdade ou semelhança entre medicamentos era suficiente para garantir sua equivalência terapêutica, posição fortemente contestada pelas indústrias farmacêuticas produtoras de medicamentos inovadores (Carpenter, Tobbell, 2011).

Em 1974, o congresso dos EUA estabeleceu uma comissão composta por especialistas para analisar a questão da equivalência terapêutica entre medicamentos novos e seus semelhantes e, eventualmente, propor critérios para garantir igualdade de segurança e eficácia entre eles. Esta comissão concluiu que os critérios então adotados para registro de medicamentos semelhantes aos novos, correspondentes aos medicamentos genéricos, não garantiam equivalência terapêutica, e elaborou um relatório final com diversas recomendações para o encaminhamento deste problema, enfatizando a importância de realização de estudos de bioequivalência como condição para o registro de medicamentos (Congress of the United States, 1974; Chen *et al.*, 2001). Os estudos de bioequivalência baseiam-se na comparação entre as curvas de concentração sistêmica (concentração sanguínea, plasmática ou sérica) do fármaco em função do tempo obtidas para o medicamento novo e seu semelhante, considerando a premissa de que medicamentos que proporcionam mesma velocidade e mesma extensão de absorção do fármaco apresentarão eficácia e segurança equivalentes. (Nation, Sansom, 1994; Herchuelz, 1996; Gleiter *et al.*, 1998; Meredith, 1996; Midha, McKay, 2009).

Embora tenha reconhecido a importância da bioequivalência para garantir intercambialidade entre medicamentos, esta comissão considerou que não seria viável que os estudos de bioequivalência fossem conduzidos para todos os produtos farmacêuticos. Assim, apenas medicamentos contendo fármacos de classes específicas seriam submetidos a estes ensaios. Os fármacos para as quais a evidência de bioequivalência seria considerada crítica seriam definidos com base em características clínicas, como importância clínica, faixa terapêutica e uso em doenças graves, e em características farmacotécnicas, tais como existência de formulações de liberação controlada e insolubilidade do fármaco no trato gastrointestinal ([Congress of the United States, 1974](#)). A divulgação deste relatório intensificou a discussão a respeito de segurança dos pacientes, reações adversas a medicamentos e qualidade dos produtos farmacêuticos, especialmente genéricos. Estudo realizado por [Bearden e Mason \(1979\)](#) entre médicos e farmacêuticos revelou que estes profissionais não se sentiam seguros em prescrever ou dispensar medicamentos genéricos apenas em função da aprovação do FDA, e sem considerar a reputação do fabricante, sinalizando uma desconfiança em relação à qualidade dos genéricos e à capacidade do FDA de garanti-la. ([Bearden, Mason, 1979](#)).

Em 1977, o FDA publicou a primeira regulamentação sobre bioequivalência de medicamentos, incluindo muitas das recomendações do relatório do congresso americano ([Chen et al., 2001](#); [Organização Pan-Americana da Saúde, 2005](#)). Estabeleceram-se, assim, as bases para o advento de medicamentos genéricos de qualidade comprovada e intercambiáveis com o medicamento de referência.

Finalmente, em 1984, foi aprovado o *Drug Price Competition and Patent Term Restoration Act* (emenda Waxman-Hatch), que estendeu o período de proteção patentária para 20 anos a fim de estimular a pesquisa por novos fármacos, e definiu que o registro de genéricos poderia ser solicitado por ANDAs com a apresentação dos resultados de ensaios de bioequivalência. Esta lei estimulou a introdução de genéricos no mercado ([Dighe, 1999](#); [Sabatini et al. 1999](#); [Organização Pan-Americana da Saúde, 2005](#)).

Em 1989, veio à tona um escândalo de corrupção no FDA, envolvendo pagamentos a funcionários do órgão por parte de executivos da indústria

farmacêutica de genéricos com a finalidade de obter tratamento preferencial em relação aos seus competidores nas solicitações de registro de medicamentos. Apurou-se, ainda, que algumas empresas de genéricos haviam usado dados falsos ou fraudado ensaios de bioequivalência para obter aprovação de seus produtos, o que levou à retirada de medicamentos genéricos do mercado e à queda de confiabilidade em relação a eles (Sibbison, 1989a; Sibbison, 1989b). Em decorrência desta crise, houve um decréscimo no número de registros de medicamentos genéricos. Este número, que variava entre 400 e 800 por ano antes de 1989, foi de apenas 73 em 1990, aumentando gradualmente em seguida (Meyer, 1999). Em 2012 foram registrados 494 genéricos nos EUA (Original[...], 2012).

Na União Europeia, a primeira regulação de medicamentos comum a todos os países membros foi a Diretiva 65/65/EEC, adotada na esteira das medidas desencadeadas pelos eventos relacionados ao uso de talidomida por mulheres grávidas. Este fármaco começou a ser comercializado na Alemanha em 1957 como sedativo indicado para controle de náuseas associadas à gravidez. A talidomida foi retirada do mercado em 1961, quando seu uso foi associado à ocorrência de uma grave malformação congênita de membros superiores e inferiores, a focomelia, em recém-nascidos de mães que haviam feito uso deste fármaco durante a gravidez. Estima-se que cerca de 8.000 crianças tenham nascido com focomelia, e entre 5.000 e 7.000 tenham morrido antes do nascimento em função das malformações (Borchers *et al.* 2007). A Diretiva 65/65/EEC determinou que todos os países membros criassem um procedimento formal para o registro de medicamentos (Demortain, 2007).

Diretivas subsequentes tentaram harmonizar as normas e protocolos relacionados principalmente aos dados que devem ser exigidos dos fabricantes por ocasião do registro de um medicamento. Neste contexto, foi criado, em 1975, o *Committee for Proprietary Medicines Products* (CPMP), com a função de emitir pareceres científicos sobre temas comuns aos países membros. Várias tentativas de procedimentos compartilhados de registro foram feitas, sem sucesso. Finalmente, em 1993, foi determinada a criação da agência reguladora europeia, a *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA), atualmente conhecida como *European Medicines*

Agency (EMA). Também em 1993, foram definidos dois procedimentos europeus para o registro de medicamentos, o descentralizado e o centralizado ([Demortain, 2007](#)). Pelo procedimento descentralizado, o registro concedido por um país membro é reconhecido pelos demais, e o medicamento pode ser comercializado em toda a União Europeia. No procedimento centralizado, a EMA é responsável pelo registro do medicamento, concedendo uma autorização central de comercialização válida em toda a União Europeia. Este procedimento é obrigatório para algumas categorias de medicamentos, tais como aqueles para tratamento de HIV/AIDS, câncer, diabetes, doenças degenerativas e autoimunes, e aqueles obtidos por biotecnologia, entre outros. Medicamentos fora destas categorias, mas que sejam inovadores ou que possuam interesse para a saúde pública, podem também ser submetidos ao procedimento centralizado ([European Medicines Agency, 2013a](#)).

A EMA também é responsável por avaliar solicitações de registro de medicamentos genéricos, desde que o medicamento de referência tenha recebido uma autorização central da agência ou o medicamento genérico apresente inovação ou vantagem importante para a saúde dos pacientes. Até o momento, 120 genéricos receberam registro na EMA ([European Medicines Agency, 2013b](#)).

No Brasil, os Decretos 19.606 e 20.377, ambos de 1931, classificavam os medicamentos produzidos pela indústria farmacêutica em dois tipos: os oficiais, que podiam ser comercializados independentemente de licença especial, e as especialidades farmacêuticas, cuja comercialização estava condicionada a licenciamento prévio. A solicitação de licença deveria informar o nome comercial, a fórmula do produto, a justificativa do emprego dos componentes, o modo de preparar e usar, as indicações terapêuticas e os processos de caracterização e doseamento dos agentes terapêuticos novos presentes na fórmula. Não havia necessidade de comprovação experimental da eficácia e segurança das especialidades farmacêuticas ([Brasil, 1931a](#); [Brasil, 1931b](#)). Os Decretos 20.397, de 1946, e 43.702, de 1958, autorizaram e definiram critérios para o licenciamento de especialidades farmacêuticas semelhantes a especialidades já licenciadas. ([Brasil, 1946](#); [Brasil, 1958](#); [Said, 2004](#)).

Em 1976, foi publicada a Lei 6360, regulamentada pelo Decreto 79.094, de 1977, estabelecendo novos procedimentos para a comercialização de medicamentos no País. O licenciamento foi substituído pelo processo de registro, com exigência de comprovação científica de eficácia e segurança, inclusive para os medicamentos semelhantes aos já registrados, denominados medicamentos similares. Entretanto, nem a Lei e nem o Decreto especificaram as provas de eficácia e segurança que seriam exigidas ou aceitas pelo órgão de vigilância sanitária responsável para concessão de registros (Brasil, 1976; Brasil, 1977; Said, 2004). A Resolução Normativa CTM/CNS 4, de 1978, consolidou a definição de medicamento similar como aquele que contém a(s) mesma(s) substância(s) terapeuticamente ativa(s) e que apresenta indicações e posologia semelhantes a medicamentos previamente registrados no País e eximiu as empresas de apresentarem documentação científica para seu registro (Brasil, 1978; Said, 2004).

A primeira tentativa de introdução de medicamentos genéricos no Brasil aconteceu em 1993, com o Decreto 793, que determinou a prescrição de medicamentos pela denominação genérica e o destaque do nome genérico nas embalagens (Brasil, 1993). Pretendia-se, desta forma, possibilitar a substituição de medicamentos na farmácia, de forma que o consumidor pudesse optar pelo similar de menor custo. A inexistência de proteção patentária para medicamentos no País e a ausência de garantia de equivalência terapêutica entre os similares e o medicamento de referência impossibilitaram a implementação destas medidas. Todavia, este decreto catalisou a discussão sobre diversos aspectos relacionados à qualidade dos medicamentos no Brasil e à intercambialidade entre similares e inovadores.

A aprovação da Lei 9.279, em 1996, que regula os direitos e obrigações relativos à propriedade industrial (Brasil, 1996), e a publicação da Política Nacional de Medicamentos (PNM), em 1998 (Brasil, 1998), criaram as condições para a introdução dos medicamentos genéricos no mercado farmacêutico brasileiro. A PNM definiu medicamento genérico como aquele que é similar a um medicamento inovador, produzido após a expiração da patente deste último e comercializado sem nome de marca, de acordo com a denominação oficial (no Brasil, Denominação Comum

Brasileira ou DCB). Adicionalmente, enfatizou a necessidade de se promover seu uso com o respaldo de procedimentos para seu registro e de requisitos para a demonstração de equivalência terapêutica, e apontou mecanismos importantes para sua consolidação, tais como a adoção da denominação genérica nas compras e licitações públicas de medicamentos e a apresentação da denominação genérica nas embalagens, entre outros.

Finalmente, em 1999, a Lei 9.787 ([Brasil, 1999b](#)) e a Resolução 391 ([Brasil, 1999a](#)) definiram os critérios para registro de medicamentos genéricos, e as provas exigidas para garantir eficácia e segurança equivalentes às do produto inovador. Passaram, então, a coexistir no mercado brasileiro medicamentos inovadores ou de referência (com ou sem proteção patentária), medicamentos similares (com marca) sem garantia de equivalência terapêutica com o inovador, e medicamentos genéricos (identificados pelo nome do princípio ativo) equivalentes terapêuticos ao inovador e intercambiáveis com ele, criando-se uma distorção entre as exigências para registro de similares e de genéricos. As Resoluções RDC 133 e RDC 134, de 2003 corrigiram esta distorção. A RDC 133 determinou que as mesmas provas exigidas para registro dos medicamentos genéricos seriam também exigidas para o registro de similares, e a RDC 134 estabeleceu os prazos para adequação dos similares já registrados ([Brasil, 2003b](#); [Brasil, 2003c](#)).

Algumas das estratégias usadas para vencer dificuldades no processo de implantação de genéricos foram a definição de lista de medicamentos prioritários; a articulação com a indústria e criação de linhas de financiamento no BNDES para a produção destes medicamentos, com o objetivo de diversificar e aumentar a oferta; a criação de área técnica na ANVISA para atendimento à indústria; a contratação e capacitação de pessoal na ANVISA para diminuir o prazo médio de registro; o programa de monitoramento da qualidade pós-registro para garantir a qualidade dos genéricos após a obtenção do registro; a criação de identidade visual para genéricos para facilitar o reconhecimento pela população; o controle da diferença de preços entre genérico e referência; e as campanhas de esclarecimentos dirigidas aos médicos e à população leiga ([Organização Pan-Americana da Saúde, 2005](#)).

No Brasil, os medicamentos genéricos e referência são intercambiáveis. O medicamento genérico pode ser dispensado quando prescrito pela DCB (Denominação Comum Brasileira) ou DCI (Denominação Comum Internacional), ou em substituição ao referência. O medicamento referência pode ser dispensado quando prescrito pelo seu nome de marca ou pela DCB ou DCI. O medicamento similar não é definido como intercambiável com o medicamento de referência, e pode ser dispensado quando prescrito pelo seu nome de marca ou pela DCB ou DCI. No entanto, as provas exigidas para registro de similares a partir de 2003 ([Brasil, 2003b](#); [Brasil, 2003c](#)) garantem sua intercambialidade com o referência. Além disso, a prescrição de um medicamento pela DCB ou DCI possibilita a dispensação tanto do genérico, quanto do similar e do referência. No âmbito do SUS (Sistema Único de Saúde), as prescrições devem obrigatoriamente adotar a DCB ou DCI. Na prática, portanto, os três tipos de medicamentos disponíveis no Brasil são usados de forma intercambiável pela maioria da população ([Brasil, 2007a](#)).

Da mesma forma que nos EUA, fraudes na condução de ensaios de bioequivalência foram identificadas no Brasil, e levaram ao cancelamento de registro de genéricos e ao fechamento e suspensão de centro de bioequivalência ([Formenti, 2005](#)). Apesar destes fatos, os genéricos se consolidaram no País. Até janeiro de 2013 haviam sido registrados no Brasil 3455 medicamentos genéricos de 420 fármacos, produzidos por 102 empresas farmacêuticas ([Medicamentos genéricos - sumário geral, 2013](#)). Em 2012, o mercado farmacêutico nacional movimentou de US\$ 25,4 bilhões, correspondentes à comercialização de 2,6 bilhões de unidades (caixas) de medicamentos, ([Mercado\[...\], 2013c](#); [Mercado\[...\], 2013d](#)). Os medicamentos genéricos foram responsáveis por 22% deste valor (US\$ 5,6 bilhões) e 26% do total de unidades (caixas) de medicamentos (680 milhões de unidades) ([Mercado\[...\], 2013a](#); [Mercado\[...\], 2013b](#)). É interessante notar que, nos EUA, os genéricos correspondem a 66% dos medicamentos vendidos com prescrição, mas a menos que 13% dos recursos financeiros ([Shrank *et al.*, 2009](#)). Uma possível explicação para este fato, além da maior diferença de preço entre genérico e inovador nos EUA, é a inclusão, na estatística americana, dos dados de venda dos genéricos de marca,

correspondentes aos nossos medicamentos similares. Os dados brasileiros não incluem os medicamentos similares.

A venda de medicamentos mais baratos por si só não é capaz de resolver o problema do acesso a medicamentos em um país onde 50% das famílias tem uma renda mensal inferior a três salários mínimos ([Rendimento\[...\], 2008](#)). Para essa população, a distribuição gratuita é a única maneira de dar acesso ao medicamento, e o barateamento dos medicamentos viabilizou uma política mais eficaz de dispensação gratuita pelo Estado ([Organização Pan-Americana da Saúde, 2005](#)).

Além disso, a política de medicamentos genéricos propiciou a transformação da indústria farmacêutica instalada no Brasil, tanto nacional quanto de origem externa, no que diz respeito ao processo de registro e fabricação de medicamentos no País. A discussão das questões relativas à intercambialidade e, portanto, eficácia, segurança e qualidade dos medicamentos, trouxe à tona aspectos relativos à qualidade das matérias-primas, à formulação dos medicamentos, e às Boas Práticas de Fabricação (BPF). O genérico trouxe para a discussão dos profissionais que fazem a prescrição dos medicamentos, aspectos até então absolutamente ignorados por eles ([Organização Pan-Americana da Saúde, 2005](#)). Como consequência desta discussão, observou-se uma grande evolução na regulamentação do setor farmacêutico nacional nos últimos 15 anos, que impulsionou a melhoria da qualidade dos medicamentos presentes no mercado brasileiro.

1.2 Eficácia e segurança do medicamento genérico

[Sabatini e colaboradores \(1999\)](#) e [Olyaei e colaboradores \(1999\)](#) descrevem alguns dos benefícios resultantes da introdução de medicamentos imunossupressores genéricos no mercado: menor custo em relação aos inovadores, aumento do acesso dos pacientes a estes medicamentos (tanto por possibilitar a distribuição pelo setor público quanto por facilitar a aquisição direta pelo paciente) com consequente melhora da adesão ao tratamento, contribuindo para a redução de retransplantes e para uma

maior oferta de órgãos a outros pacientes. Benefícios relacionados à maior adesão à farmacoterapia podem ser generalizados para as demais classes de medicamentos genéricos, ilustrando sua importância na atenção à saúde.

Justamente em função desta importância, existe o imperativo de determinar a qualidade farmacêutica e o desempenho *in vivo* dos medicamentos genéricos com alto grau de confiabilidade. Mais do que isso, é necessário demonstrar que a segurança e eficácia dos genéricos são comparáveis à segurança e eficácia do medicamento inovador correspondente, já que genéricos e inovador são usados de forma intercambiável pelos pacientes (Midha, McKay, 2009).

Até cerca de metade do século passado considerava-se que medicamentos contendo o mesmo fármaco, na mesma quantidade, apresentavam eficácia e segurança equivalentes ao serem administrados a pacientes. Assim, equivalentes farmacêuticos (medicamentos que contêm o mesmo fármaco, isto é, mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica) seriam equivalentes terapêuticos e intercambiáveis (Brasil, 2007b; Brasil, 2007c; European Medicines Agency, 2010a; U.S. Department of Health and Human Services, 2012). Esta afirmação é válida até hoje para formas farmacêuticas em que não existe necessidade de liberação do princípio ativo para absorção sistêmica. Como exemplos podemos citar as soluções aquosas (e os pós para reconstituição que resultam em soluções aquosas) administradas por via parenteral, oral, otológica, oftálmica ou inalatória, os gases, as soluções oleosas parenterais, as formas farmacêuticas de uso oral contendo fármacos para ação local no trato gastrointestinal, e os medicamentos de aplicação tópica não destinados a efeitos sistêmicos. Nestes casos, considera-se que a comprovação da equivalência farmacêutica garante a equivalência terapêutica (Brasil, 2011). Isto já não acontece para medicamentos que devem liberar o princípio ativo para absorção sistêmica. Pesquisas relacionadas à absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas administradas por via oral vêm sendo desenvolvidas desde a década de 1930, quando dados de excreção urinária de salicilato foram utilizados como medida da eficácia de comprimidos de salicilato de sódio com revestimento entérico. Em 1945, a mesma técnica foi aplicada a estudos

sobre a disponibilidade fisiológica de vitaminas. Nos anos 1950, alguns autores demonstraram que a absorção de vitamina B2 e ácido p-aminossalicílico, a partir de comprimidos revestidos, dependia da desintegração do revestimento. Também nessa época, surgiram as primeiras bases teóricas para a avaliação da absorção de fármacos a partir de dados de excreção urinária, e os primeiros estudos com determinação de concentrações sanguíneas ([Abdou, 1989](#)). No início da década de 1960, constataram-se diferenças de absorção entre diferentes formulações orais contendo fármacos como prednisona, hormônios tireoidianos, varfarina, ácido acetilsalicílico, digoxina e cloranfenicol ([Gleiter *et al.*, 1998](#)).

Em 1967, o governo americano criou uma força-tarefa para determinar a exequibilidade de incluir no Medicare (programa federal de seguro-saúde social) a cobertura de medicamentos vendidos sob prescrição. Como parte de sua avaliação, a força-tarefa iniciou um programa para determinar se diferenças de absorção de fármacos poderiam estar relacionadas a diferenças nas características físicas e químicas dos medicamentos (tamanho de partícula, forma cristalina, excipientes). Com base em revisões de literatura sobre equivalência terapêutica e em avaliações do uso de medicamentos genéricos em diversos contextos e locais, a força-tarefa concluiu que a ausência de equivalência terapêutica entre equivalentes farmacêuticos havia sido totalmente exagerada como um risco para a saúde pública ([Carpenter, Tobbell, 2011](#)). Posteriormente, uma comissão nomeada para avaliar o relatório final da força-tarefa acabou, contraditoriamente, concluindo que era importante estabelecer a equivalência biológica ou terapêutica dos genéricos com o inovador, para reduzir custos ([Shirkey, 1970](#); [Carpenter, Tobbell, 2011](#)).

Por esta época, estabeleceu-se consenso em relação à influência de uma série de fatores na absorção de fármacos após administração de medicamentos por via oral. Particularmente no caso de formas farmacêuticas sólidas, a absorção acontecerá após adequadas desintegração da forma farmacêutica e liberação e dissolução do fármaco ([Langenbucher, 1978](#)). Assim, diversas características da forma farmacêutica podem afetar a absorção ([Führer, 1978](#); [Sjögren, 1978](#); [Razdan, Verma, 1992](#)).

O termo biodisponibilidade surgiu na literatura científica no início da década de 1970, com a publicação de trabalho relatando diferenças entre as curvas de decaimento plasmático obtidas após administração de quatro formulações contendo digoxina a voluntários, em estudo cruzado ([Marzo, Balant, 1995](#)). A biodisponibilidade indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo a partir de uma forma farmacêutica, e pode ser medida com base na curva de concentração sistêmica (concentração sanguínea, plasmática ou sérica) do fármaco em função do tempo ou com base na sua excreção urinária ([Brasil, 2007b](#); [U.S. Department of Health and Human Services, 2012](#)). Bioequivalência indica a ausência de diferenças significativas em relação à biodisponibilidade entre equivalentes farmacêuticos ou entre alternativas farmacêuticas (medicamentos que contêm a mesma molécula terapeuticamente ativa, ou seu precursor, mas não necessariamente na mesma quantidade, forma farmacêutica, sal ou éster) administrados na mesma dose molar e nas mesmas condições experimentais ([Brasil, 2007b](#); [European Medicines Agency, 2010a](#); [U.S. Department of Health and Human Services, 2012](#)).

A ocorrência de episódios de intoxicação na década de 1970, como consequência de alteração da biodisponibilidade de comprimidos de digoxina ([Nyberg, 1978](#)), ocasionou aumento de interesse por esses estudos, além de maior divulgação dos conceitos relativos a biodisponibilidade e bioequivalência ([Cook, 1978](#)). Vários trabalhos sobre o tema foram publicados, envolvendo fármacos como tetraciclina ([Blair *et al.*, 1971](#); [Barr *et al.*, 1972](#)), fenilbutazona ([Van Petten *et al.*, 1971](#); [Chiou, 1972](#)), fenitoína ([Alván, 1978](#)), diazepam ([Berlin-Wahlén, 1978](#)) e penicilinas ([Mizen, 1978](#)). Além disso, houve aumento da preocupação em relação à influência de fatores fisiológicos e patológicos sobre a biodisponibilidade ([Breckenridge, 1978](#); [De Blaeys, Rutten-Kingma, 1978](#); [Ehrnebo *et al.*, 1978](#); [Rowland, 1978](#); [Lindahl *et al.*, 1997](#)).

A comissão estabelecida em 1974 pelo congresso americano para analisar a questão da equivalência terapêutica entre medicamentos inovadores e seus similares reconheceu que as práticas regulatórias então vigentes, baseadas na determinação de equivalência farmacêutica, não eram capazes de garantir bioequivalência entre os produtos similares e o produto de

referência correspondente ([Congress of the United States, 1974](#)). Esta comissão também identificou fatores capazes de interferir na biodisponibilidade, tais como a ausência de Boas Práticas de Fabricação e algumas características das matérias-primas, inclusive tamanho de partículas, distribuição de tamanho de partículas, forma cristalina, compressibilidade e velocidade de dissolução ([Congress of the United States, 1974](#)).

A expansão da indústria de medicamentos genéricos, a importância de comercializá-los a preços baixos, a necessidade de garantir a intercambialidade desses produtos com o medicamento inovador e a constatação de que problemas de eficácia e segurança estavam associados a diferenças de biodisponibilidade entre medicamentos confluíram para transformar os ensaios de bioequivalência no procedimento padrão para garantir equivalência terapêutica. A demonstração direta de equivalência terapêutica entre genérico e referência exigiria a realização de ensaios clínicos de longa duração, causando elevação do custo dos medicamentos genéricos, além de trazer dificuldades éticas em função do elevado número de pacientes envolvidos em tais ensaios. Assim, a comparação clínica direta foi substituída pela avaliação indireta por meio de ensaios de bioequivalência, em que a biodisponibilidade do produto genérico é comparada à do produto inovador. Neste contexto, a bioequivalência pode ser considerada um substituto da equivalência terapêutica, desde que exista relação bem definida entre concentração do fármaco e efeito terapêutico e segurança ([Nation, Sansom, 1994](#); [Herchuelz, 1996](#); [Meredith, 1996](#); [Gleiter *et al.*, 1998](#)). A escolha da bioequivalência como critério de intercambialidade propiciou o avanço dos genéricos; se outros critérios tivessem sido escolhidos (por ex., ensaios clínicos), possivelmente os genéricos não teriam o alcance e a importância que tem atualmente ([Midha, McKay, 2009](#)). Desta maneira, a bioequivalência garante legitimidade e realidade aos genéricos, e implica em que uma *commodity* farmacêutica pode ser substituída por outra em todos os aspectos terapêuticos, definindo um cenário para transações de mercado baseadas em preços. O surgimento do conceito de bioequivalência, a partir da constatação de que a equivalência entre medicamentos dependia não só da semelhança química entre eles,

mas também de questões ligadas à absorção e à farmacocinética, exigiu a criação de definições e critérios tanto técnicos quanto regulatórios, congregando diversos atores: cientistas, profissionais clínicos (médicos e farmacêuticos), autoridades regulatórias e políticos. Podemos, então, afirmar que a bioequivalência não é apenas um conceito técnico, mas sim uma criação regulatória e científica (Carpenter, Tobbell, 2011).

Mesmo com a definição destes critérios para garantir intercambialidade de medicamentos, dúvidas relativas à eficácia sempre rondaram o uso de genéricos (Delaney, 1987; Lasagna, 1987), reforçadas por contextos específicos como casos de corrupção e fraudes (Sibbison, 1989a; Sibbison, 1989b; Fleder, 1994; Formenti, 2005), preconceito por parte da classe médica (Ansbacher, 1991) muitas vezes estimulado pelos produtores do referência, e relatos de ineficácia ou efeitos adversos na substituição do referência pelo genérico (Shirkey, 1970; Meredith, 1996). Alguns estudos demonstram esta desconfiança. Wilner (2004) realizou uma pesquisa entre neurologistas sobre a substituição de anticonvulsivantes de referência por anticonvulsivantes genéricos e observou que, entre os médicos que responderam à pesquisa, mais da metade eram contra o uso de genéricos e contra a possibilidade de substituição do medicamento prescrito por um genérico. Cerca de 68% dos neurologistas informaram a ocorrência de convulsões após substituição de referência por genérico, e 56% informaram aumento de eventos adversos após esta substituição. O autor concluiu que, embora a substituição por genéricos possa ser apropriada para muitos pacientes, existem alguns para os quais esta substituição pode representar diminuição na qualidade do tratamento (Wilner, 2004).

Nesta mesma direção, Olyaei e colaboradores (1999) reportaram a pressão sofrida por médicos e cirurgiões envolvidos em transplantes de órgãos para prescrever os medicamentos de referência, enquanto seguradoras, planos de saúde, governo e demais organizações envolvidas com pagamento de tratamentos medicamentosos exigem o uso de genéricos para diminuir os custos de tratamento (Olyaei *et al.*, 1999).

A preocupação com a substituição de medicamentos de referência por genéricos não é totalmente infundada. A intercambialidade visa garantir ao paciente proteção contra problemas de segurança e eficácia (Nation,

Sansom, 1994). Entretanto, ainda se discute se os ensaios de bioequivalência e os critérios atuais de aceitação de bioequivalência são capazes de garantir a intercambialidade em todos os casos. A faixa de aceitação de bioequivalência estabelecida pelo FDA e pelas demais agência reguladoras, por exemplo, não foi baseada em evidências, mas sim estabelecida arbitrariamente por especialistas do próprio FDA (U.S. Department of Health and Human Services, 2012). Existem dúvidas de que este critério seja adequado nos casos de fármacos de estreita faixa terapêutica (Meredith, 1996), que apresentam relação inferior a dois entre a dose média letal (LD_{50}) e a dose média eficaz (ED_{50}), ou entre a concentração sanguínea mínima tóxica e a concentração sanguínea mínima eficaz. O uso seguro e eficaz destes fármacos depende de ajuste de dose individual, já que pequenas mudanças nas concentrações sistêmicas podem ocasionar grandes mudanças na resposta farmacodinâmica (Sabatini *et al.*, 1999; Wilner, 2004). Outra questão levantada diz respeito às possíveis diferenças de biodisponibilidade entre indivíduos sadios e pacientes, afetando a bioequivalência (Wilner, 2004). Também a presença de alimentos pode exercer influências diferentes sobre a biodisponibilidade de genérico e referência, afetando a bioequivalência (Wilner, 2004). A existência de estereoisômeros pode levar a diferenças entre segurança e eficácia de genéricos com proporções diferentes entre os estereoisômeros, determinando a ausência de intercambialidade mesmo que a bioequivalência tenha sido demonstrada com base na concentração de fármaco total (Rumel *et al.*, 2006). Outro tema importante diz respeito à intercambialidade entre genéricos pois, como eles são comparados apenas com seu referência, não é possível inferir sobre a bioequivalência entre dois genéricos, mesmo que tenham sido testados contra o mesmo referência (Rumel *et al.*, 2006).

Apesar de todas estas críticas e problemas, um estudo que incluiu 224 medicamentos registrados após a aprovação da emenda Waxman-Hatch, detectou que a diferença média de bioequivalência observada entre genéricos e inovadores foi de apenas 3,5% (FDA [...], 1997), o que é uma indicação de que os padrões para substituição genérica são adequados e não requerem alterações importantes, embora algumas melhorias possam ser

feitas considerando a variabilidade intraindividual e a relação entre farmacocinética e farmacodinâmica (Olyaei *et al.*, 1999).

2

Bioequivalência

2.1 Aspectos gerais

O uso dos ensaios de bioequivalência como substitutos dos ensaios clínicos para determinação de equivalência terapêutica entre equivalentes ou alternativas farmacêuticas tem ampla aceitação mundial tanto pela indústria farmacêutica quanto pelas autoridades regulatórias e propiciou, em inúmeros países, a disponibilização de medicamentos genéricos de qualidade garantida a preços reduzidos (Midha, McKay, 2009).

A avaliação da bioequivalência baseia-se na premissa fundamental de que medicamentos que proporcionam mesma velocidade e mesma extensão de absorção do fármaco *in vivo* apresentarão eficácia e segurança equivalentes. Assim, os ensaios de bioequivalência visam à determinação de parâmetros capazes de indicar a velocidade e a extensão de absorção de um fármaco a partir de sua forma farmacêutica (Nation, Sansom, 1994; Herchuelz, 1996; Meredith, 1996; Gleiter *et al.*, 1998; Midha, McKay, 2009). Segundo o FDA, podem ser empregados, em ordem de preferência, parâmetros farmacocinéticos, parâmetros farmacodinâmicos, parâmetros clínicos e parâmetros *in vitro* (Midha, McKay, 2009; United States, 2012).

Embora mais simples que os ensaios clínicos, os ensaios de bioequivalência apresentam certa complexidade e, em situações específicas, apresentam limitações que podem comprometer sua capacidade de garantir equivalência terapêutica. A qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos dependem, entre outros fatores, do desenho do estudo, do processo de seleção de voluntários, e da forma de coleta, armazenamento e análise das amostras obtidas. Ainda hoje, muitas pesquisas são realizadas na tentativa de desenvolver formas mais eficazes de determinar bioequivalência e de garantir equivalência terapêutica entre formulações (Midha, McKay, 2009).

2.2 Planejamento e execução de ensaios de bioequivalência

Diversos métodos podem ser empregados para determinar a bioequivalência entre produtos farmacêuticos. FDA (United States, 2012)

e EMA ([European Medicines Agency, 2010a](#)) apresentam alguns destes métodos, elencados a seguir em ordem decrescente de preferência:

- ⇒ ensaio *in vivo* em seres humanos com determinação da concentração do fármaco na circulação sistêmica (em sangue, plasma, soro) ou outros líquidos biológicos adequados ou ensaio *in vitro* que apresente correlação com dados de biodisponibilidade humana. Estes estudos fornecem parâmetros farmacocinéticos que podem ser relacionados à velocidade e extensão de absorção do fármaco a partir da forma farmacêutica, tais como a área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo (ASC) e a concentração sistêmica máxima que o fármaco atinge após administração ($C_{\max}$);
- ⇒ ensaio *in vivo* em seres humanos com determinação da excreção urinária do fármaco em função do tempo. Este método é apropriado somente nos casos em que a excreção urinária é uma via importante de eliminação e, da mesma forma que o método anterior, fornece parâmetros farmacocinéticos que podem ser relacionados à velocidade e extensão de absorção do fármaco a partir da forma farmacêutica, tais como excreção urinária acumulada do fármaco (Xu_t) e velocidade máxima de excreção urinária ($dXu_{\max}/dt$);
- ⇒ ensaio *in vivo* em seres humanos com determinação de efeito farmacológico agudo em função do tempo, desde que este possa ser medido com suficiente exatidão, precisão e reprodutibilidade. Neste caso, serão usados parâmetros farmacodinâmicos que podem indicar a velocidade e extensão de absorção do fármaco a partir da forma farmacêutica bem como a eficácia e segurança dos medicamentos testados;
- ⇒ ensaio clínico controlado por meio do qual será possível comparar parâmetros clínicos relacionadas à eficácia e segurança dos medicamentos testados;
- ⇒ ensaio *in vitro* capaz de garantir bioequivalência por meio da comparação de parâmetros *in vitro* obtidos para os produtos avaliados.

A realização de estudos em seres humanos traz diversas implicações éticas. Segundo normas internacionais e nacionais de ética em pesquisa, não

devem ser realizados ensaios desnecessários em seres humanos. A bioequivalência pode ser avaliada *in vitro*, desde que exista correlação estabelecida entre os dados *in vitro* e *in vivo* que descrevem a absorção do fármaco. Infelizmente, muito poucas correlações deste tipo foram estabelecidas. Assim, a bioequivalência é geralmente determinada por meio de ensaios em seres humanos, com quantificação do fármaco ou metabólito ativo em líquido biológico apropriado, tal como sangue, plasma e soro, já que este procedimento é considerado o mais exato, preciso e reprodutível, especialmente para aquelas formas farmacêuticas que liberam o princípio ativo para absorção sistêmica ([United States, 2012](#)).

Embora o FDA considere os ensaios com dados de excreção urinária menos exatos e precisos que aqueles realizados com dados sanguíneos, plasmáticos ou séricos, diversos autores sugerem que, em algumas situações, tais ensaios seriam mais apropriados na determinação da extensão da absorção. O uso da excreção urinária acumulada do fármaco (X_u) na estimativa da extensão da absorção é válido no caso de fármacos que apresentam eliminação predominantemente renal. Nesta situação, fatores que afetem a depuração renal, como farmacocinética não-linear, fluxo urinário e pH urinário, afetarão na mesma proporção a depuração total. Diferenças na depuração renal e, conseqüentemente, na depuração total, entre as duas fases de um ensaio de bioequivalência cruzado terão maior influência no cálculo do parâmetro área sob a curva (ASC), cuja determinação apoia-se na constância da meia-vida de eliminação. Nestas circunstâncias, os dados de excreção urinária forneceriam estimativa mais exata da extensão da biodisponibilidade ([Nation, Sansom, 1994](#)).

A avaliação de bioequivalência por meio de efeito farmacológico agudo é adotada no caso de formas farmacêuticas de ação tópica, em que o fármaco não é absorvido e não atinge a circulação sistêmica, ou para fármacos que sofrem absorção sistêmica, mas para os quais não existe método analítico adequado à quantificação em líquidos biológicos ([United States, 2012](#)). Todavia, o uso de parâmetros farmacodinâmicos pode determinar resultado diferente do que seria obtido com o uso de parâmetros farmacocinéticos, em função do tipo de proporcionalidade existente entre concentração sanguínea do fármaco e efeito terapêutico ([Nation, Sansom,](#)

1994). Além disso, os estudos farmacodinâmicos geralmente exigem um número maior de voluntários, pois a variabilidade dos dados farmacodinâmicos costuma ser superior à dos dados farmacocinéticos (Della Paschoa *et al.*, 1995).

Os ensaios clínicos são considerados o método *in vivo* menos confiável para avaliação de bioequivalência, mas, entre os métodos propostos, apenas estes fornecem informações sobre eficácia e segurança dos medicamentos testados e, portanto, permitem a avaliação direta da equivalência terapêutica. Ensaio deste tipo comparando um medicamento genérico contendo o antimicrobiano cefuroxima ao seu referência apontou diferença de eficácia entre ambos, com prejuízo para o genérico, caracterizando inequivalência terapêutica (Mastoraki *et al.*, 2008). Em geral, estes ensaios são aceitos pelas agências reguladoras para comparação de formas farmacêuticas de ação tópica e também para fármacos que sofrem absorção sistêmica, mas para os quais não existe método analítico adequado à sua quantificação em líquidos biológicos e que não produzem efeito farmacológico agudo que possa ser determinado de forma exata, precisa e reprodutível (Nation, Sansom, 1994; United States, 2012).

A grande maioria das avaliações de bioequivalência empregam ensaios em seres humanos com determinação de parâmetros farmacocinéticos relacionados à absorção, por ser este o método de primeira escolha para tal fim e o de mais simples aplicação. Os estudos de bioequivalência *in vivo* são preconizados no Brasil para o registro de medicamentos genéricos e similares, com o objetivo de assegurar a equivalência terapêutica entre estes e o medicamento de referência. Tais estudos comparam a biodisponibilidade do fármaco após administração extravascular a voluntários do medicamento teste, correspondente ao candidato a genérico ou a similar, e do respectivo medicamento referência (Brasil, 2006). Os ensaios são realizados em três etapas: clínica, analítica e estatística, detalhadas a seguir.

2.2.1 Etapa clínica

Esta etapa compreende os processos de seleção e internação de voluntários, administração de medicamentos, e coleta de amostras biológicas.

Os protocolos de ensaios de bioequivalência devem ser elaborados visando reduzir a variabilidade inerente aos mesmos, de forma que quaisquer diferenças detectadas entre os parâmetros farmacocinéticos possam ser atribuídas aos produtos em estudo. Para tal, recomenda-se a adoção de ensaios de desenho aberto, cruzado e aleatório ([U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#); [Brasil, 2006](#); [European Medicines Agency, 2010a](#); [United States, 2012](#)). Segundo este desenho, a comparação entre dois produtos é realizada em dois períodos com duas sequências de administração dos produtos (equivalentes a dois grupos de voluntários). No período inicial, os voluntários da primeira sequência de administração (ou grupo) recebem um dos produtos, enquanto que os voluntários da segunda sequência recebem o outro produto. No período final, o procedimento é invertido. Quando os voluntários são igualmente divididos entre as sequências de administração, este desenho é chamado de quadrado latino. Em estudos envolvendo três ou quatro formulações, o planejamento pelo quadrado latino é o mais apropriado. Nesses casos, o número de voluntários deve ser múltiplo de três ou quatro, respectivamente ([Nation, Sansom, 1994](#); [Marzo, Balant, 1995](#)). Os diversos períodos do ensaio devem ser intercalados por um intervalo para eliminação do fármaco ou metabólito ativo do organismo, conhecido como intervalo de *washout*. A duração recomendada deste intervalo varia entre cinco a dez vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou metabólito ativo, proporcionando eliminação de 97% a praticamente 100% da molécula de interesse ([Nation, Sansom, 1994](#); [U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#); [Brasil, 2006](#); [European Medicines Agency, 2010a](#)).

A administração dos produtos aos voluntários pode ser feita em dose única ou em doses múltiplas. Ensaios em dose única são, geralmente, adequados à avaliação de bioequivalência. Entretanto, existem situações em que a administração de doses múltiplas pode ser preferível:

- ⇒ produtos que apresentam mesma extensão, mas diferentes velocidades de absorção ([United States, 2012](#));
- ⇒ fármacos que apresentam grande variabilidade inter ([United States, 2012](#)) ou intraindividual ([Nation, Sansom, 1994](#); [European Medicines Agency, 2010a](#)) para os parâmetros farmacocinéticos relativos à biodisponibilidade;
- ⇒ fármacos para os quais não existe método analítico suficientemente sensível para quantificá-los em líquidos biológicos após administração de dose única ([Nation, Sansom, 1994](#); [European Medicines Agency, 2010a](#); [United States, 2012](#));
- ⇒ formas farmacêuticas de liberação modificada ([Nation, Sansom, 1994](#); [European Medicines Agency, 1999a](#); [European Medicines Agency, 1999b](#));
- ⇒ fármacos que apresentam farmacocinética dose-dependente ([Nation, Sansom, 1994](#)). Nestes casos, EMA recomenda estudo na maior dosagem e, eventualmente, também na menor ([European Medicines Agency, 2010a](#));
- ⇒ fármacos cujas características de toxicidade impossibilitam a administração a voluntários sadios (por exemplo, citotóxicos) e para os quais a administração de dose única a pacientes é inviável por razões éticas ([Nation, Sansom, 1994](#); [Marzo, Balant, 1995](#); [European Medicines Agency, 2010a](#));
- ⇒ impossibilidade de definir com exatidão o valor da constante de velocidade de eliminação (por exemplo, fármacos com circulação entero-hepática), necessária para estimar o valor de ASC (área sob a curva de decaimento sanguíneo, plasmático ou sérico, parâmetro farmacocinético relacionado à extensão da absorção do fármaco) após administração de dose única ([Nation, Sansom, 1994](#); [Marzo, Balant, 1995](#)).

Conquanto a EMA ([European Medicines Agency, 1999a](#)) aceite a realização de ensaio em doses múltiplas para as formas farmacêuticas de liberação modificada adicionalmente ao ensaio com dose única, [Reppas e](#)

[colaboradores \(1995\)](#) sugerem que estudos em dose única seriam mais adequados, por permitir maior sensibilidade na comparação entre parâmetros indicativos da velocidade de absorção. Este é o entendimento de FDA e Anvisa, que não recomendam o emprego de doses múltiplas na avaliação de bioequivalência de formulações de liberação modificada ([Department of Health and Human Services, 2003](#); [Brasil, 2006](#)). A EMA está em processo de revisão das diretrizes para formas farmacêuticas de liberação modificada ([European Medicines Agency, 2010b](#)).

Em estudos com administração de doses múltiplas, a coleta de amostras biológicas deve ser realizada no estado de equilíbrio estacionário, situação em que os valores das concentrações mínimas (ou concentrações de vale) e máximas (ou concentrações de pico) se repetem após cada dose administrada. O tempo necessário para atingi-lo corresponde a cerca de cinco vezes a meia-vida de eliminação do fármaco. Para confirmar o estado de equilíbrio estacionário devem ser realizadas pelo menos duas coletas de amostras para determinar concentrações de vale (imediatamente antes da administração da dose do medicamento): duas concentrações de vale iguais indicam que o estado de equilíbrio estacionário foi alcançado ([Ritschel, Kearns, 2009](#)). A posologia adotada deve ser aquela indicada para uso clínico ([Nation, Sansom, 1994](#); [Yacobi *et al.*, 1999](#); [United States, 2012](#)). O fato de refletirem o uso recomendado do fármaco é considerado, por alguns pesquisadores, uma vantagem dos estudos com doses múltiplas ([Steinijans *et al.*, 1989](#)). Para estes estudos, a EMA permite que o intervalo de *washout* seja reduzido, desde que o tempo estabelecido para atingir o estado de equilíbrio estacionário do segundo período do estudo seja equivalente a pelo menos cinco vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ([European Medicines Agency, 2010a](#)). O FDA, no entanto, exige intervalo de *washout* de pelo menos cinco vezes a meia-vida de eliminação do fármaco, antes do início da administração dos produtos no segundo período do estudo ([United States, 2012](#)). Esta exigência do FDA pode impossibilitar estudos de doses múltiplas com planejamento cruzado em pacientes, pois nem sempre a interrupção do tratamento é possível. A alternativa neste caso seria a realização de estudo paralelo, formando-se dois grupos de pacientes: desta maneira, cada voluntário receberia apenas

o medicamento teste ou apenas o medicamento referência em um estudo de um período, sem necessidade de *washout*.

Os estudos paralelos podem ser aplicados também a fármacos de meia-vida muito alta, que exigiriam períodos extremamente longos, e nem sempre factíveis, de *washout* (Chow, Liu, 2000).

O tamanho da amostra, ou o número de voluntários incluídos no ensaio, deve ser suficiente para garantir a obtenção de resultados estatisticamente significativos, mas é importante considerar que a utilização de amostras excessivamente grandes não é eticamente justificável (Nation, Sansom, 1994). Tanto a Anvisa (Brasil, 2003a) quanto a EMA (European Medicines Agency, 2010a) e o FDA (U.S. Department of Health and Human Services, 2001) recomendam o uso de métodos apropriados para o cálculo da amostra, que devem levar em consideração parâmetros como o coeficiente de variação individual, calculado a partir da variância residual obtida pela aplicação de análise de variância (Anova) aos resultados do ensaio, o poder do teste e a relação entre as médias das biodisponibilidades dos produtos em estudo. Alguns autores propuseram métodos para calcular o tamanho da amostra baseados em gráficos ou tabelas (Diletti *et al.*, 1991; Diletti *et al.*, 1992; Hauschke *et al.*, 1992; Hauschke *et al.*, 1999). O próprio FDA (U.S. Department of Health and Human Services, 2001) apresenta tabelas que podem ser usadas para este fim. As agências reguladoras definem que os ensaios de bioequivalência incluam, no mínimo, 12 indivíduos (U.S. Department of Health and Human Services, 2001; Brasil, 2006; European Medicines Agency, 2010a). Para a maioria dos fármacos, a determinação da bioequivalência pode ser realizada com um pequeno número de voluntários, que varia de 18 a 24 (Barrett *et al.*, 2000). Os estudos paralelos, em comparação aos cruzados, fornecem, para o mesmo número de voluntários, inferências estatísticas menos precisas relativas à bioequivalência. Para superar este problema, o tamanho da amostra para estudos paralelos é geralmente maior que para estudos cruzados (Chow, Liu, 2000).

A seleção de voluntários para os ensaios de bioequivalência deve ser feita visando à diminuição da variabilidade que não está relacionada às diferenças entre os produtos em teste. Por este motivo, os ensaios de

bioequivalência são realizados em voluntários sadios, a menos que a toxicidade do fármaco inviabilize esta abordagem ([European Medicines Agency, 2010a](#)). [Saseen e colaboradores \(1997\)](#) recomendam estudos em pacientes também nos casos em que o fármaco apresente diferenças de comportamento entre indivíduos sadios e pacientes.

A inclusão de mulheres em ensaios de bioequivalência, que é uma tendência atual, já foi alvo de controvérsias. [Marzo e Balant \(1995\)](#) relacionam alguns problemas associados à sua participação:

- ⇒ o uso de medicamentos além dos que estão sendo avaliados é, em geral, proibido durante o ensaio, o que pode gerar dificuldades de seleção em função da disseminação do uso de anticoncepcionais;
- ⇒ a diferença de peso entre homens e mulheres é de cerca 35%, o que tende a aumentar a variabilidade do sistema quando voluntários de ambos os sexos compõem a amostra do estudo;
- ⇒ necessidade de realização de testes de gravidez durante a seleção das voluntárias e antes de cada administração dos produtos;
- ⇒ a segurança bioquímica de ensaios realizados com amostras de urina pode ser prejudicada pela inclusão de mulheres em período menstrual;
- ⇒ aumento de variabilidade em ensaios com fármacos que apresentam diferenças farmacocinéticas entre os sexos.

Esses autores argumentam que o objetivo do estudo é comparar a biodisponibilidade de dois produtos farmacêuticos, e não, verificar possíveis diferenças entre homens e mulheres. Consequentemente, não haveria problemas em selecionar somente voluntários do sexo masculino, exceto em ensaios que envolvam fármacos indicados apenas para mulheres (por exemplo, anticoncepcionais). O FDA recomenda a inclusão de homens e mulheres na mesma proporção em estudos de medicamentos que serão usados por indivíduos de ambos os sexos, seguindo a opinião de outros autores. A Anvisa aceita a realização de estudos apenas em homens, apenas em mulheres ou em ambos ([Nation, Sansom 1994](#); [U.S.](#)

[Department of Health and Human Services, 2001](#); [U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#); [Brasil, 2006](#)).

Os voluntários devem ter idade entre 18 e 55 anos, mas o FDA recomenda a inclusão de indivíduos com idade superior a 60 anos em estudos de medicamentos usados predominantemente por pacientes idosos ([U.S. Department of Health and Human Services, 2001](#); [U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#)). Analogamente, a Anvisa determina que, para medicamentos indicados a pacientes com características específicas de idade e sexo, o estudo seja integralmente realizado em voluntários com tais características. Os indivíduos devem apresentar peso normal, ou próximo do normal, para sua altura. A EMA ([European Medicines Agency, 2010a](#)) recomenda que os voluntários apresentem índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 e 30kg/m², enquanto que a Anvisa recomenda uma variação de 15% ao redor do peso normal. As condições clínicas dos voluntários devem ser avaliadas por meio de histórico médico e exames clínicos e laboratoriais ([Nation, Sansom, 1994](#); [U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#); [Marzo, Balant 1995](#); [European Medicines Agency, 2010a](#)). Critérios de exclusão citados por agências reguladoras ou pesquisadores incluem: histórico de abuso de álcool e drogas; fumo; resultados positivos para os vírus HIV e da hepatite (HBV, HCV); presença de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas; antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos; tratamento concomitante com medicamentos; e estado de gravidez ou período de amamentação ([Marzo, Balant, 1995](#); [Brasil, 2006](#); [European Medicines Agency, 2010a](#)).

O ensaio deve ser realizado em condições padronizadas de dieta, ingestão de líquidos e exercício, visando à minimização da variabilidade ([European Medicines Agency, 2010a](#)). Os medicamentos devem ser administrados a todos os voluntários no mesmo horário, em todos os períodos do estudo. Normalmente, a administração acontece após jejum de pelo menos oito horas, e a ingestão do medicamento é acompanhada por um volume fixo de água entre 150 e 250 mL. Todos os voluntários devem receber o mesmo volume. O jejum é geralmente mantido até quatro horas após a administração. Refeições e líquidos fornecidos aos voluntários durante o

ensaio devem ser padronizados em termos de tipo, composição, quantidade e horário de ingestão ([Nation, Sansom, 1994](#); [U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#); [European Medicines Agency, 2010a](#)). Durante o ensaio, os voluntários não devem ingerir quaisquer medicamentos além daqueles que estão sendo comparados e devem abster-se de bebidas e alimentos que possam exercer influência nas funções renal, hepática, gastrointestinal e circulatória (bebidas alcoólicas, alimentos e bebidas que contenham xantinas, e alguns tipos de sucos de frutas capazes de interferir no processo de absorção) ([U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#); [Brasil, 2006](#); [European Medicines Agency, 2010a](#)).

A absorção de fármacos administrados por via oral, e consequentemente sua biodisponibilidade, pode ser influenciada pelo tempo de trânsito no trato gastrointestinal e pelo fluxo sanguíneo nesta região. Assim, é recomendável que se padronizem também a postura e a prática de esforço físico durante o ensaio ([Nation, Sansom, 1994](#); [European Medicines Agency, 2010a](#)).

Alguns estudos devem ser realizados na presença de alimentos, como aqueles que envolvem formas farmacêuticas de liberação modificada ou com características específicas, tais como microemulsões ou dispersões sólidas (adicionalmente ao estudo em jejum), e fármacos cuja absorção é influenciada pela presença de alimentos e que apresentam indicação de administração do medicamento com alimento ([Department of Health and Human Services, 2003](#); [Brasil, 2006](#); [European Medicines Agency, 2010a](#)). Nestes casos, o horário da administração do medicamento em relação à refeição deve ser conforme recomendação na bula do produto de referência. Se não houver recomendação específica, a administração é feita imediatamente após a refeição ([European Medicines Agency, 2010a](#)).

As condições de coleta, processamento e armazenamento das amostras biológicas devem ser previamente validadas para garantir a estabilidade do fármaco até o momento de sua quantificação. Estas condições incluem tipo de anticoagulante usado (para amostras de sangue e plasma), velocidade e temperatura de centrifugação (para amostras de plasma e soro), temperatura de armazenamento, material de coleta e acondicionamento das

amostras e condições de transporte para o local do desenvolvimento da etapa analítica ([Nation, Sansom, 1994](#)).

Os parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção (principalmente concentração máxima do fármaco - $C_{\max}$ - e área sob a curva de concentração sistêmica em função do tempo - ASC), que serão utilizados para determinar a bioequivalência entres os produtos testados, são determinados a partir das curvas de concentração do fármaco ou metabólito ativo no líquido biológico apropriado (sangue, plasma ou soro) em função do tempo. Cronogramas de coleta inadequados podem ser responsáveis por resultados inconclusivos, em função de imprecisão na determinação destes parâmetros farmacocinéticos. Intervalos muito grandes entre as coletas podem impossibilitar a determinação da concentração máxima do fármaco ou metabólito ativo no líquido biológico de interesse (sangue, plasma ou soro), além de introduzir erros muito grandes no cálculo da área sob a curva de concentração em função do tempo. Por outro lado, intervalos muito pequenos expõem os sujeitos da pesquisa a maiores riscos e desconfortos, em função do aumento do número de coletas, além de resultarem em aumento de custos tanto na etapa clínica quanto na etapa analítica. O planejamento dos intervalos de coleta de amostras, portanto, exerce grande influência na qualidade dos resultados e no custo do ensaio. As coletas devem ser mais frequentes ao redor do tempo previsto para o pico de concentração plasmática ($C_{\max}$), que não deve ser o primeiro ponto da curva. O período de coleta de amostras deve prosseguir após $C_{\max}$ por tempo equivalente a, no mínimo, três vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou metabólito ativo, garantindo ASC_{0-t} (ASC do tempo 0 h ao tempo t, onde t corresponde ao último tempo de coleta de amostra) equivalente a pelo menos 80% de ASC_{0-inf} (ASC do tempo 0 h ao tempo infinito), o que permite boa estimativa da extensão da absorção ([Brasil, 2006](#)). O intervalo entre as coletas pode ser aumentado durante a fase pós-absorção, mas não deve ser superior à meia-vida de eliminação do fármaco. É importante incluir três a quatro amostras na fase terminal da curva de concentração em função do tempo, para que seja possível calcular a constante de velocidade de eliminação terminal do fármaco. O FDA recomenda a coleta de 12 a 18 amostras por voluntário

em cada um dos períodos do estudo ([European Medicines Agency, 2010a](#); [Nation, Sansom, 1994](#); [U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#)). As mesmas recomendações aplicam-se a ensaios realizados em urina, de forma que o cronograma de coleta de amostras permita as estimativas de velocidade e extensão de eliminação do fármaco ou metabólito ativo ([European Medicines Agency, 2010a](#)). No caso de fármacos de meia-vida de eliminação superior a 24 horas, a Anvisa ([Brasil, 2006](#)) e o FDA ([U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#)) facultam a utilização de cronograma alternativo de coletas até 72 horas após a administração. A EMA ([European Medicines Agency, 2010a](#)) também aceita este cronograma, independentemente do tempo de meia-vida de eliminação do fármaco, desde que a fase de absorção esteja incluída neste período. Nestes ensaios, a análise da bioequivalência será baseada no parâmetro de área sob a curva truncada (ASC_{0-72h}). O cronograma de coleta de amostras ideal, tanto do ponto de vista ético quanto do ponto de vista econômico, é aquele que apresenta o menor número possível de coletas (ou o maior intervalo possível entre as coletas) sem, no entanto, comprometer a determinação dos parâmetros farmacocinéticos e a conclusão final em relação à bioequivalência ou não entre os produtos.

Em estudos com doses múltiplas, o tempo de coleta de amostras corresponde ao intervalo de dose, e é geralmente inferior ao tempo de coleta em ensaios com dose única. [Steinijans e colaboradores \(1989\)](#) consideram que o menor tempo de coleta, juntamente com a obtenção de concentrações plasmáticas maiores, representam vantagens dos estudos com doses múltiplas, embora ensaios deste tipo apresentem dificuldades adicionais em termos de controle de cumprimento do tratamento e padronização de alimentação.

2.2.2 Etapa analítica

Esta etapa compreende a análise das amostras biológicas obtidas na etapa clínica, por meio de métodos bioanalíticos validados, com a finalidade de quantificar o analito mais indicado à determinação da bioequivalência. Na maioria dos casos, este analito é o próprio fármaco, uma vez que as

concentrações sistêmicas do fármaco são mais sensíveis a diferenças de desempenho entre as formulações do que as concentrações de metabólitos (U.S. Department of Health and Human Services, 2003; European Medicines Agency, 2010a). Porém, em algumas situações, a quantificação do metabólito ativo, ou do fármaco e do metabólito, pode ser mais adequada. Isto acontece, por exemplo, quando o fármaco é rápida e extensivamente metabolizado, impossibilitando sua quantificação; quando o metabólito apresenta melhor correlação com o efeito terapêutico do que o fármaco; ou quando tanto o fármaco quanto o metabólito são responsáveis pelo efeito terapêutico (Blanchard *et al.*, 1979; World Health Organization, 1997; U.S. Department of Health and Human Services, 2003; Brasil, 2006; Midha, McKay, 2009).

As amostras de plasma ou soro, pela facilidade de obtenção e armazenamento, são as mais comuns em ensaios de bioequivalência. Amostras de sangue podem ser empregadas em casos de fármacos que se distribuem no interior das células sanguíneas. Estudos em urina são mais raros, já que estes são considerados menos precisos e exatos que os estudos com quantificação do fármaco na circulação sistêmica (Blanchard *et al.*, 1979; Brasil, 2006; Brasil, 2007b, Brasil, 2007c).

A determinação das concentrações do fármaco ou metabólito ativo nas amostras biológicas possibilita a construção das curvas de concentração sistêmica em função do tempo, a partir das quais são determinados os parâmetros farmacocinéticos que, após análise estatística, definirão a bioequivalência entre os produtos avaliados (Blanchard *et al.*, 1979; World Health Organization, 1997; Brasil, 2006).

A principal técnica de quantificação empregada na etapa analítica dos estudos de bioequivalência de medicamentos é a cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (Brasil, 2003d). Em menor escala são empregadas a cromatografia gasosa (GC) e imunoensaios (radioimunoensaio, enzima-imunoensaio) (Blanchard *et al.*, 1979).

A cromatografia é um processo de separação em que os componentes de uma amostra se distribuem entre duas fases imiscíveis: a fase estacionária, fixa, e a fase móvel, que transita através da fase estacionária. Na

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, sigla em inglês) e na cromatografia gasosa (GC), a fase estacionária é contida por uma coluna cromatográfica.

A separação cromatográfica baseia-se na migração diferencial dos componentes de uma amostra, a qual ocorre em função das diferenças de afinidade destes componentes pelas fases móvel e estacionária, determinando velocidades diferentes de deslocamento ao longo da coluna cromatográfica. Assim, moléculas com maior afinidade pela fase estacionária tendem a se distribuir mais nesta fase do que na fase móvel e, portanto, apresentarão deslocamento mais lento através da coluna cromatográfica. Ao contrário, moléculas com maior afinidade pela fase móvel tendem a se distribuir mais nesta fase do que na fase estacionária, acarretando deslocamento mais rápido através da coluna cromatográfica. A migração diferencial determina diferentes tempos de retenção para os componentes da amostra na coluna cromatográfica. A migração e os tempos de retenção são influenciados pelas variáveis experimentais que afetam a distribuição das moléculas entre as fases móvel e estacionária: a composição da fase móvel, a composição da fase estacionária e a temperatura de separação. Para alterar a migração diferencial com o objetivo de melhorar o processo de separação é necessário modificar uma ou mais destas três variáveis analíticas (Cazes, Scott, 2002; Snyder, Kirkland, 1979; Snyder *et al.*, 1997).

Após a separação, os compostos são transportados pela fase móvel até o detector e registrados como picos. O detector monitora a saída dos componentes da amostra após sua separação na coluna cromatográfica, gerando sinal elétrico proporcional à concentração da substância. Características do detector ideal são alta sensibilidade, resposta rápida a todos os analitos, resposta independente de mudanças de temperatura, fluxo e composição da fase móvel, resposta linear em relação à concentração de analito, segurança e facilidade de uso, capacidade de fornecer informações qualitativas e baixo custo. Dificilmente todas estas características são encontradas em um único detector. Os detectores mais utilizados em CLAE são os detectores de absorvância em luz ultravioleta e visível (UV-VIS), os detectores de arranjo de diodos, os detectores de

fluorescência e os detectores por espectrometria de massas. Os detectores de UV-VIS e os detectores de arranjo de diodos funcionam com base no princípio de que a quantidade de radiação absorvida por um analito em um determinado comprimento de onda é proporcional à quantidade de analito presente na amostra. Os detectores de arranjo de diodos têm a capacidade de gerar espectros de absorvância dos analitos eluídos, enquanto que os detectores UV-VIS fornecem apenas dados quantitativos. Os detectores de fluorescência baseiam-se na capacidade que algumas moléculas apresentam de emitir radiação em um determinado comprimento de onda ($\lambda_{\text{emissão}}$) após sofrerem irradiação em comprimento de onda definido ($\lambda_{\text{excitação}}$), e são altamente específicos e sensíveis. Os detectores por espectrometria de massas apresentam especificidade e sensibilidade superiores aos demais, além de possibilitarem maior rapidez nas análises. Em função destas características são, atualmente, os mais utilizados na etapa analítica de ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência. O espectrômetro de massas funciona por meio da ionização e fragmentação de moléculas e identificação dos íons resultantes em função de sua relação massa/carga (Cazes, Scott, 2002; Snyder, Kirkland, 1979; Snyder *et al.*, 1997).

O conjunto de picos originado por uma amostra é denominado cromatograma. Os picos fornecem informações qualitativas (tempo de retenção) e quantitativas (área do pico) sobre os componentes da amostra. A área do pico cromatográfico é proporcional à concentração do fármaco na amostra, enquanto que o tempo de retenção é característico do fármaco nas variáveis analíticas empregadas (fase móvel, fase estacionária e temperatura) (Cazes, Scott, 2002; Snyder, Kirkland, 1979; Snyder *et al.*, 1997).

A grande maioria dos estudos de bioequivalência de medicamentos emprega a CLAE em sua etapa analítica, devido a sua alta seletividade e sensibilidade. A CLAE caracteriza-se por empregar fase móvel líquida e pode ser classificada em quatro tipos básicos de acordo com as características da fase estacionária: cromatografia líquido-líquido ou de partição (fase estacionária líquida dispersa sobre um suporte inerte); cromatografia líquido-sólido ou de adsorção (fase estacionária sólida composta por partículas de grande área superficial); cromatografia de troca

iônica (fase estacionária com grupos funcionais de carga positiva ou negativa capazes de interagir com íons presentes na amostra e na fase móvel); cromatografia de exclusão (fase estacionária porosa que promove a separação em função do tamanho das moléculas). Outros tipos de CLAE surgiram por modificações na técnica de cromatografia líquido-líquido, tais como a cromatografia de fases quimicamente ligadas, em que a fase estacionária orgânica encontra-se quimicamente ligada a um suporte sólido, o que confere maior estabilidade em relação às fases estacionárias líquidas apenas dispersas sobre o suporte inerte; e a cromatografia de par iônico, que é uma combinação entre a cromatografia de fases quimicamente ligadas e a cromatografia de troca iônica (Cazes, Scott, 2002; Snyder, Kirkland, 1979; Snyder *et al.*, 1997).

A cromatografia de fases quimicamente ligadas é atualmente a técnica de CLAE mais utilizada em aplicações analíticas. A existência de grande variedade de colunas, com diversos tipos de fases estacionárias, tamanhos de partícula e comprimentos, proporciona o desenvolvimento de métodos analíticos de forma simples e rápida.

A separação em cromatografia de fases quimicamente ligadas pode ocorrer em fase normal ou em fase reversa, conforme as características das fases móvel e estacionária. Na cromatografia em fase reversa, a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. Este tipo de separação é o mais utilizado, em função da possibilidade de empregar fase móvel aquosa (com ou sem a adição de sais) e de ser aplicável a grande número de substâncias. Os solventes orgânicos empregados na preparação de fase móvel para cromatografia em fase reversa devem ser miscíveis com água, o que restringe bastante a escolha, sendo os mais utilizados a acetonitrila e o metanol. Substâncias como o tetra-hidrofurano (THF) e soluções tampão fosfato ou acetato podem ser acrescentados à fase móvel em algumas situações para otimizar a separação cromatográfica. Na cromatografia em fase reversa, as moléculas mais polares são eluídas mais rapidamente, enquanto que as menos polares apresentam maior interação com a fase estacionária e são, portanto, mais retidas. Na cromatografia em fase normal, ao contrário do que ocorre na fase reversa, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel. Neste caso, a fase móvel é geralmente

constituída por mistura de solventes orgânicos, sem adição de água, e as moléculas menos polares são eluídas mais rapidamente, ao passo que as moléculas mais polares são mais retidas. A cromatografia em fase normal apresenta, muitas vezes, problemas de reprodutibilidade, em função da dificuldade de garantir ausência total de água na fase móvel. É empregada majoritariamente para moléculas neutras e hidrofóbicas, insolúveis em solventes polares, e que portanto apresentam dificuldades para análise por cromatografia em fase reversa (Cazes, Scott, 2002; Snyder, Kirkland, 1979; Snyder *et al.*, 1997).

Na técnica de cromatografia gasosa - GC, a fase móvel é constituída por um gás inerte, enquanto a fase estacionária, contida na coluna cromatográfica, pode ser líquida ou sólida. A amostra é volatilizada após sua introdução no sistema e arrastada pela fase móvel para a coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos componentes da amostra em função de sua afinidade pela fase estacionária. Esta técnica é restrita à análise de amostras voláteis e termorresistentes, a menos que reações de derivatização sejam empregadas. Com o desenvolvimento das técnicas de CLAE, especialmente a CLAE com detecção por espectrometria de massas, a cromatografia gasosa perdeu espaço nos laboratórios analíticos que realizam estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, sendo atualmente pouco utilizada para este fim (Dorman *et al.*, 2008; Sneddon *et al.*, 2007).

Testes imunológicos quantitativos são amplamente utilizados para monitoramento terapêutico e podem ser aplicados também a ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência. As técnicas mais usadas para quantificação de fármacos em amostras biológicas são EMIT (*enzyme-multiplied immunoassay technique*) e FPIA (*fluorescence polarization immunoassay*). Alguns fármacos para os quais existem testes imunológicos disponíveis comercialmente são fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, ácido valproico, teofilina, ciclosporina, metotrexato, digoxina e digitoxina. Embora os imunoensaios sejam testes de aplicação simples, resultados rápidos e alta sensibilidade, apresentam a desvantagem de baixa seletividade na presença de fármacos de estrutura semelhante à daquele que se deseja quantificar e na presença de seus metabólitos (Vaz *et al.*, 2007; Wu, 2006).

As amostras biológicas são, geralmente, submetidas a algum pré-tratamento antes da análise para quantificação do fármaco, com os objetivos de concentrar a amostra e de eliminar tanto substâncias interferentes na análise quanto impurezas que possam contaminar e danificar os equipamentos analíticos, especialmente no caso de análises cromatográficas (Blanchard *et al.*, 1979). O pré-tratamento origina extratos que serão reconstituídos para análise por cromatografia. Os principais tipos de pré-tratamento atualmente empregados são a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido e a extração por fase sólida (Hyötyläinen, Riekkola, 2005). A precipitação de proteínas propicia a eliminação das proteínas plasmáticas por precipitação com solvente orgânico ou ácido. Este procedimento é simples, rápido e econômico, embora não seja muito eficiente na eliminação de interferentes. Na extração líquido-líquido, empregam-se solventes orgânicos para extrair a forma não-ionizada do fármaco de interesse da matriz biológica. O pH da amostra deve ser ajustado conforme as características do fármaco, para garantir que este se encontre predominantemente na forma não-ionizada. Este método, embora trabalhoso, proporciona excelentes resultados em termos de purificação da amostra. A extração por fase sólida emprega os princípios da cromatografia para remover interferentes de amostras biológicas. Pequenas colunas descartáveis, ou cartuchos, contendo partículas revestidas de fase estacionária são usadas para eluir e separar o fármaco de outras substâncias presentes na amostra (Pyrzynska, Pobozy, 2002). A extração por fase sólida possibilita grande economia de tempo e trabalho por permitir a extração simultânea de grande número de amostras. Além disso, pode ser acoplada a sistemas cromatográficos, propiciando automação completa da análise de amostras biológicas. Outra vantagem da extração por fase sólida é a redução da utilização de solventes orgânicos, quando comparada à extração líquido-líquido. As duas técnicas são comparáveis em capacidade de purificação e de recuperação do analito (Hennion, 1999; Krishnan, Ibrahim, 1994).

O desenvolvimento de métodos bioanalíticos para aplicação em ensaios de bioequivalência deve considerar os parâmetros a seguir (Brasil, 2003d):

- ⇒ faixa de linearidade e limite de quantificação: estes parâmetros indicam as concentrações de fármaco que podem ser quantificadas pela aplicação do método em questão. Nos estudos de bioequivalência, é necessário quantificar com precisão e exatidão tanto concentrações de pico (C_{max}), que apresentam valores altos, quanto concentrações na fase terminal da curva de decaimento do fármaco, cujos valores são baixos. As amostras biológicas devem ser colhidas por um tempo correspondente a pelo menos três vezes a meia-vida de eliminação do fármaco, a partir da concentração de pico (Brasil, 2006). Assim, as concentrações finais apresentam valores equivalentes a 8,5%, ou menos, da concentração de pico. A faixa de linearidade deve abranger estes limites e ultrapassá-los, incluindo margens de segurança superior e inferior em função da variabilidade destas medidas entre os indivíduos incluídos no estudo;
- ⇒ complexidade do processo de pré-tratamento: os estudos de bioequivalência geram um grande número de amostras, que devem ser submetidas a processo de tratamento e analisadas paralelamente a amostras de plasma padrão da curva de calibração e a amostras de plasma de controle de qualidade para garantir a confiabilidade dos resultados. Em um estudo típico com dois medicamentos e 24 voluntários, são pré-tratadas e analisadas em torno de 1000 amostras. Assim, é sempre vantajoso desenvolver métodos com processos simples e rápidos de pré-tratamento da amostra;
- ⇒ tempo de análise: da mesma forma que a complexidade do processo de pré-tratamento, o tempo de análise é um parâmetro importante para avaliar a aplicabilidade do método, considerando-se o grande número de amostras;
- ⇒ disponibilidade de padrão interno: o padrão interno é um composto, geralmente com características estruturais similares ao fármaco que se pretende analisar, que é adicionado em quantidade constante às amostras de plasma padrão da curva de calibração, às amostras de plasma de controle de qualidade e às amostras de plasma de voluntários provenientes da etapa clínica com o objetivo de corrigir eventuais perdas de fármaco durante o processo de pré-tratamento.

Ao desenvolver um método, é importante verificar se o padrão interno empregado está disponível comercialmente e é de fácil aquisição, ou se deverá ser sintetizado;

- ⇒ toxicidade de solventes e demais reagentes: preferem-se métodos que empreguem solventes e reagentes de baixa ou nenhuma toxicidade.

Antes de sua aplicação na análise de amostras, os métodos desenvolvidos deverão ser validados. Os principais parâmetros da validação são ([Brasil, 2003d](#); [European Medicines Agency, 2010a](#)):

- ⇒ especificidade: definida como a capacidade do método em distinguir o analito de todas as outras substâncias presentes na amostra, é investigada pela análise de seis amostras de plasma branco para verificação da existência de interferência por parte de componentes endógenos ([Causon, 1997](#); [Brasil, 2003d](#));
- ⇒ recuperação: corresponde ao resultado obtido após análise de amostra de plasma branco acrescida de padrão do analito, submetida a pré-tratamento, expresso como porcentagem do resultado obtido após análise de padrão do analito puro, não submetido a pré-tratamento. É determinada comparando-se resultados de análises de amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao processo de pré-tratamento a resultados de análises de amostras do analito não submetidas a esse processo, em três diferentes concentrações e seis repetições ([Causon, 1997](#));
- ⇒ curva de calibração: indica a relação entre concentração de analito e resposta do método que, no caso dos métodos cromatográficos, é representada pela área do pico cromatográfico ([Bressolle et al., 1996](#); [Brasil, 2003d](#)). É construída utilizando-se seis amostras de plasma padrão com diferentes concentrações do analito. Estabelece-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x), e área do pico, considerada variável dependente (y). O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 ([Bressolle et al., 1996](#); [Causon, 1997](#); [Brasil, 2003d](#));

- ⇒ limite de quantificação: os limites de detecção e quantificação expressam a capacidade do método bioanalítico em determinar pequenas concentrações de analito. O limite de detecção representa a menor concentração que pode ser diferenciada do nível de ruído. O limite de quantificação deve apresentar resposta no mínimo duas vezes maior que a do limite de detecção, e representa a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis (Bressolle *et al.*, 1996; Causon, 1997). O limite de quantificação é determinado utilizando-se cinco amostras de plasma de controle de qualidade. A exatidão deve estar entre $\pm 20\%$ do valor nominal da concentração, com coeficiente de variação de, no máximo, 20 % (Bressolle *et al.*, 1996);
- ⇒ precisão: a precisão de métodos bioanalíticos é uma medida de erro aleatório e é definida como concordância entre várias medidas da mesma amostra, sendo expressa como coeficiente de variação (C.V. %) dessas medidas. A precisão intraensaio refere-se ao coeficiente de variação obtido por repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, em curto intervalo de tempo (por exemplo, no mesmo dia). A precisão interensaio é obtida por meio de alteração de condições, como mudança de analista, reagentes ou equipamento, ou utilização do método durante várias semanas ou meses (Causon, 1997). É determinada pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações e cinco repetições (Bressolle *et al.*, 1996; Brasil, 2003d).
- ⇒ exatidão: é uma medida de erro sistemático e é definida como concordância entre o valor determinado e o valor real (Causon, 1997). É determinada pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações e cinco repetições (Bressolle *et al.*, 1996; Brasil, 2003d);
- ⇒ estabilidade: dados sobre estabilidade são necessários para garantir que a concentração da substância não sofre alteração entre a coleta da amostra e o momento da análise (Causon, 1997). Determina-se a estabilidade de longa duração de amostras congeladas, a estabilidade

de curta duração de amostras mantidas à temperatura ambiente, a estabilidade de amostras submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento e a estabilidade pós-processamento de extratos reconstituídos. A estabilidade das soluções padrão do analito e do padrão interno também deve ser avaliada (Brasil, 2003d).

Os artigos elencados a seguir descrevem métodos bioanalíticos desenvolvidos e validados pelo nosso grupo de pesquisa para aplicação em ensaios de bioequivalência e estudos farmacocinéticos:

- ⇒ *Porta V; Ferraz HG. Souza TML, Kano E.K., Serra CHR. Método analítico para a determinação de meloxicam em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2005; 41:215-22. (<http://www.revistas.usp.br/rbcf/article/view/44046/47667>);*
- ⇒ *Kano EK, Serra CHR, Koono EEM, Andrade SS, Porta V. Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies. International Journal of Pharmaceutics. 2005; 297:73-9. (http://ac.els-cdn.com/S0378517305001559/1-s2.0-S0378517305001559-main.pdf?tid=e2be8146-c019-11e3-baf7-00000aabb0f02&acdnat=1397070496_c3ff2bc6343ace1d1367c1);*
- ⇒ *Romeu GA, Kano EK, Rolim CMB, Serra CHR, Ferraz HG, Porta V. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de doxiciclina em plasma humano. Revista Brasileira em Promoção da Saúde. 2007; 20:193-8. (http://hp.unifor.br/pdfs_notitia/1742.pdf);*
- ⇒ *Porta V, Schramm SG, Kano EK, Koono EE, Armando YP, Fukuda K, Serra CHR. HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008; 46:143-7. (http://ac.els-cdn.com/S0731708507005717/1-s2.0-S0731708507005717-main.pdf?tid=67718e1a-c01a-11e3-bc96-00000aachb361&acdnat=1397070719_ea3c7736d063bf223501c5f3befac703);*
- ⇒ *Kano EK, Serra CHR, Koono EEM, Fukuda K, Porta V. An efficient HPLC-UV method for the quantitative determination of cefadroxil in human plasma and its application in pharmacokinetic studies. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2012; 35:1871-81. (<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10826076.2011.627607>).*

2.2.3 Etapa estatística

Esta etapa do ensaio de bioequivalência compreende o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos a partir das curvas de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo e a análise estatística destes parâmetros para verificação da bioequivalência.

A escolha das medidas para determinação de bioequivalência evoluiu com a realização de estudos sobre o tema e com a implementação da legislação correspondente. Em 1977, o FDA estabeleceu o uso de valores médios de parâmetros farmacocinéticos relacionados à extensão e à velocidade de absorção (respectivamente, área sob a curva de concentração sistêmica em função do tempo - ASC - e concentração sistêmica máxima - C_{max}) (Sabatini *et al.*, 1999). Estes parâmetros e outros a eles relacionados ou deles derivados são empregados até hoje (U.S. Department of Health and Human Services, 2003; Shargel *et al.*, 2005; Brasil, 2006; European Medicines Agency, 2010a):

- ⇒ ASC_{0-t} : área sob a curva de concentração sistêmica (sanguínea, plasmática ou sérica) do fármaco ou metabólito ativo em função do tempo, do tempo 0 h ao tempo t, onde t corresponde ao último tempo de coleta de amostra, após administração de dose única do medicamento. É calculada pelo método dos trapezoides;
- ⇒ ASC_{0-inf} : área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco ou metabólito ativo em função do tempo, do tempo 0 h ao tempo infinito, após administração de dose única do medicamento. É calculada pela fórmula: $ASC_{0-inf} = ASC_{0-t} + C_t/k_{el}$, onde t corresponde ao último tempo de coleta de amostra, C_t é a concentração do fármaco na amostra coletada no tempo t e k_{el} é a constante de velocidade de eliminação do fármaco;
- ⇒ ASC_{τ} : área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco ou metabólito ativo em função do tempo, durante intervalo de dose no estado de equilíbrio estacionário, após administração de doses múltiplas do medicamento. É calculada pelo método dos trapezoides;

- ⇒ $C_{\max}$: concentração sistêmica máxima do fármaco ou metabólito ativo após a administração de dose única do medicamento, ou durante intervalo de dose no estado de equilíbrio estacionário após administração de doses múltiplas do medicamento. É obtida diretamente da curva de concentração sistêmica em função do tempo;
- ⇒ $C_{\min}$: concentração sistêmica mínima do fármaco ou metabólito ativo durante intervalo de dose no estado de equilíbrio estacionário após administração de doses múltiplas do medicamento. É obtida diretamente da curva de concentração sistêmica em função do tempo;
- ⇒ C_m : concentração sistêmica média do fármaco ou metabólito ativo durante intervalo de dose no estado de equilíbrio estacionário após administração de doses múltiplas do medicamento. É calculada pela fórmula $C_m = ASC_{\tau} / \tau$, onde τ é o tempo de intervalo de dose;
- ⇒ flutuação: relação entre diferença das concentrações sistêmicas máxima e mínima e concentração sistêmica média durante intervalo de dose no estado de equilíbrio estacionário, após administração de doses múltiplas do medicamento $((C_{\max} - C_{\min}) / C_m)$;
- ⇒ *swing*: relação entre diferença das concentrações sistêmicas máxima e mínima e concentração sistêmica mínima durante intervalo de dose no estado de equilíbrio estacionário, após administração de doses múltiplas do medicamento $((C_{\max} - C_{\min}) / C_{\min})$;
- ⇒ $t_{\max}$: tempo necessário para atingir concentração sistêmica máxima do fármaco ou metabólito ativo após administração de dose única do medicamento, ou durante intervalo de dose no estado de equilíbrio estacionário, após administração de doses múltiplas do medicamento ($C_{\max}$). É obtido diretamente da curva de concentração sistêmica em função do tempo;
- ⇒ k_{el} : constante de velocidade de eliminação do fármaco ou metabólito ativo, obtida a partir da equação que descreve a fase terminal da curva de concentração em função do tempo;

- ⇒ $t_{(1/2)el}$: meia-vida de eliminação do fármaco ou metabólito ativo, calculada pela fórmula $t_{(1/2)el}=0,693/k_{el}$;
- ⇒ TMR: tempo médio de residência do fármaco ou metabólito ativo, calculado pela fórmula $TMR=ASMC/ASC$, onde ASMC=área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco ou metabólito ativo em função do tempo de primeiro momento e ASC=área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco ou metabólito ativo em função do tempo.
- ⇒ Xu_t : excreção urinária acumulada do fármaco ou metabólito ativo do tempo 0 h ao tempo t, correspondente ao último tempo de coleta de amostra, obtida a partir da concentração do fármaco ou metabólito ativo nas amostras de urina e do volume de urina produzido a cada intervalo de coleta;
- ⇒ Xu_{inf} : excreção urinária acumulada do fármaco ou metabólito ativo extrapolada do tempo 0 h ao tempo infinito;
- ⇒ dXu_{max}/dt : velocidade máxima de excreção urinária do fármaco ou metabólito ativo, obtida diretamente da curva de velocidade de excreção urinária em função do tempo.

Esses parâmetros são obtidos a partir de análise farmacocinética não-compartimental. Segundo [Pentikis e colaboradores \(1996\)](#), a aplicação conjunta de análise compartimental permite a obtenção de resultados de maior valor informativo, já que este tipo de análise fornece equações matemáticas e parâmetros farmacocinéticos que descrevem detalhadamente a curva de concentração do fármaco em função do tempo, impossível na análise não-compartimental. No entanto, a análise não-compartimental apresenta maior robustez, pois não depende de suposições acerca do modelo aplicável a cada situação.

No caso de formas farmacêuticas de liberação convencional, os parâmetros C_{max} e t_{max} são considerados adequados para descrever a velocidade de absorção ([Schulz, Steinijans, 1991](#)). Este consenso não existe em relação à definição dos parâmetros que melhor caracterizam a velocidade de absorção para formas farmacêuticas de liberação modificada. Segundo [Reppas e colaboradores \(1995\)](#), C_{max} e t_{max} são parâmetros pouco sensíveis

e de difícil caracterização nestes casos, em função de múltiplos picos de absorção (Schulz, Steinijans, 1991; Bialer *et al.*, 1995). Outros parâmetros farmacocinéticos sugeridos para estes casos são a relação $C_{\max}/ASC$, ASC parcial (de 0 h a $t_{\max}$) e tempo de *plateau* (Schulz, Steinijans, 1991; Bialer *et al.*, 1995; Reppas *et al.*, 1995; Midha, McKay, 2009).

Embora a bioequivalência seja definida como a ausência de diferenças significativas em relação à biodisponibilidade entre equivalentes farmacêuticos ou entre alternativas farmacêuticas administrados na mesma dose molar e nas mesmas condições experimentais (Brasil, 2006; European Medicines Agency, 2010a, U.S. Department of Health and Human Services, 2012), diferenças de biodisponibilidade, na verdade, podem ser aceitas, desde que não apresentem significado clínico, ou seja, não determinem diferenças de eficácia e segurança (Nation, Sansom, 1994). Assim, atualmente, dois produtos farmacêuticos são considerados bioequivalentes se apresentarem biodisponibilidades (velocidade e extensão de absorção) suficientemente semelhantes a ponto de seus efeitos, em termos de eficácia e segurança, serem essencialmente os mesmos (Minghetti, 1996). Desta forma, a questão que deve ser respondida pela análise estatística dos resultados dos ensaios de bioequivalência não é se os produtos apresentam ou não diferença significativa entre os valores dos parâmetros farmacocinéticos relacionados à biodisponibilidade, mas sim se suas biodisponibilidades são suficientemente semelhantes para que teste e referência possam ser considerados terapeuticamente equivalentes. (Westlake, 1976). Por esta razão, já na década de 70, Metzler (1974) e Westlake (1976, 1979) demonstraram a inadequação do teste de hipóteses, sendo a hipótese nula a de igualdade entre as biodisponibilidades médias dos produtos em estudo, para a análise estatística dos resultados dos ensaios de bioequivalência, e sugeriram a adoção de procedimentos baseados em intervalos de confiança. Vários trabalhos posteriores foram desenvolvidos focalizando tais procedimentos, alguns dos quais avaliaram o desempenho de intervalos de confiança simétricos e assimétricos (Mandallaz, Mau, 1981) e a utilização de valores de dados na escala decimal ou logarítmica (Steinijans, Hauschke, 1990; Hauschke *et al.*, 1992; Liu, Weng, 1994). A possibilidade de utilização do teste de hipóteses, definindo-

se a hipótese nula com base em intervalo pré-estabelecido para a razão entre as biodisponibilidades dos produtos em estudo, também foi alvo do trabalho de alguns pesquisadores, como [Fluehler e colaboradores \(1981\)](#), [Munk \(1993\)](#) e [Wellek \(1996\)](#). Durante a década de 80 e até início dos anos 90, surgiram trabalhos relatando o uso da análise estatística bayesiana em ensaios de bioequivalência ([Selwyn *et al.*, 1981](#); [Fluehler *et al.*, 1983](#); [Hulting, Harville, 1991](#)). Entretanto, as possíveis vantagens oferecidas por este tipo de análise não foram consideradas suficientes para compensar suas dificuldades de aplicação. [Rescigno e colaboradores \(1996\)](#) propuseram um método baseado na determinação da semelhança entre as curvas de decaimento plasmático, obtidas após administração dos produtos teste e referência a voluntários sadios, por meio de índice de bioequivalência.

Acompanhando estas discussões, o FDA considerou diversas abordagens para a análise e tratamento dos dados de estudos de bioequivalência, incluindo a regra 80/20, a regra 75/75 e o cálculo de intervalo de confiança ([Mandallaz, Mau, 1981](#); [Chow, Liu, 2000](#); [Midha, McKay, 2009](#)).

Segundo a regra 80/20, a bioequivalência é comprovada quando a hipótese nula de igualdade para os valores médios de ASC e $C_{\max}$ não é rejeitada considerando-se um nível de significância de 95%. O poder do teste deve permitir a detecção de uma diferença de 20% entre as biodisponibilidades dos produtos avaliados com 80% de probabilidade ([Sabatini *et al.*, 1999](#); [Chow, Liu, 2000](#)).

Pela regra 75/75, duas formulações serão bioequivalentes se pelo menos 75% dos indivíduos incluídos no ensaio de bioequivalência apresentarem relações individuais entre biodisponibilidade do produto teste e biodisponibilidade do produto referência de 0,75 a 1,25. Esta regra é de fácil aplicação e apresenta as vantagens de excluir a variabilidade interindividual da comparação entre as formulações e de permitir a avaliação da biodisponibilidade relativa individual entre teste e referência. Por outro lado, esta análise é altamente influenciada pelo aumento da variabilidade intra e interindividual, e apresenta alta probabilidade de conclusão de bioinequivalência em ensaios com fármacos de alta variabilidade, mesmo que os produtos testados apresentem valores médios

iguais para os parâmetros avaliados (Sabatini *et al.*, 1999; Chow, Liu, 2000; Midha, McKay, 2009).

Atualmente, FDA (U.S. Department of Health and Human Services, 2001), EMA (European Medicines Agency, 2010a) e Anvisa (Brasil, 2006) exigem evidências de bioequivalência média, definida por meio dos parâmetros AUC, $C_{\max}$ e $t_{\max}$. A bioequivalência média pode ser expressa como razão ou como diferença entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos dos produtos teste e referência (Chow, Liu, 2000). Os órgãos reguladores consideram duas formulações bioequivalentes caso o intervalo de confiança 90% (IC90%) da razão entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos de teste e referência, determinado a partir das transformações logarítmicas dos valores dos referidos parâmetros por meio de dois testes *t* monocaudais, esteja compreendido entre 80 e 125%. O teste de análise de variância é empregado para identificação de efeitos de sujeito, período, sequência e formulação, e interações entre estes (Sabatini *et al.*, 1999; U.S. Department of Health and Human Services, 2001; Brasil, 2003a; European Medicines Agency, 2010a; Midha, McKay, 2009).

A adoção de uma única faixa de aceitação para todos os fármacos é bastante criticada, especialmente em relação a fármacos que exibem uma estreita janela terapêutica ou àqueles que apresentam alta variabilidade inter ou intraindividual nos parâmetros farmacocinéticos.

Para os fármacos de estreita faixa terapêutica, como a digoxina, carbamazepina, levotiroxina e varfarina, pequenas mudanças na concentração sistêmica levam a importantes alterações na resposta farmacodinâmica (Henderson, Esham 2001; Meredith, 2003). Neste contexto, a substituição de medicamentos inovadores por seus respectivos genéricos pode trazer riscos aos pacientes, especialmente se a variabilidade farmacocinética associada ao medicamento genérico for superior àquela associada ao inovador. Muitos autores sugerem a adoção de limites mais rígidos de aceitação de bioequivalência nestes casos (Minghetti, 1996; Barrett *et al.*, 2000; Midha, McKay, 2009). A EMA (European Medicines Agency, 2010a) adota os limites de 90 a 111% para o intervalo de confiança para ASC de medicamentos contendo fármacos de estreita faixa terapêutica e, em alguns casos, também para $C_{\max}$ destes produtos. Por outro lado

Anvisa ([Brasil, 2006](#)) e FDA ([U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#)) não estabelecem critérios diferentes de bioequivalência para estes fármacos. Por outro lado, quando a janela terapêutica é ampla, como é o caso de antibióticos orais, antiácidos, anti-histamínicos, vitaminas e certos analgésicos, limites mais flexíveis são sugeridos ([Barrett *et al.*, 2000](#)).

Em ensaios de bioequivalência de fármacos que apresentam alta variabilidade para um ou mais parâmetros de interesse para bioequivalência (geralmente C_{max} e ASC), o cálculo do tamanho de amostra indica a necessidade de inclusão de grande número de voluntários para garantir poder suficiente à análise estatística, sob pena de conclusão equivocada de bioinequivalência ([Tsang *et al.*, 1996](#); [Midha, McKay, 2009](#)). Este procedimento eleva os custos do ensaio e expõe um maior número de indivíduos aos riscos do estudo, sem diminuir o risco do consumidor relacionado à conclusão equivocada de bioequivalência ([Nation, Sansom, 1994](#); [Midha, McKay, 2009](#)). A maioria dos fármacos que apresenta alta variabilidade possui uma ampla faixa terapêutica, de forma que seu uso pela população se faz de forma bastante segura. Consequentemente, o risco para o consumidor é baixo, o que motivou propostas de alargamento da faixa de aceitação para medicamentos contendo estes fármacos possibilitando a abordagem tradicional no planejamento do ensaio de bioequivalência, com número reduzido de voluntários ([Boddy *et al.*, 1995](#); [Godbillon *et al.*, 1996](#); [Minghetti, 1996](#); [Sabatini *et al.*, 1999](#); [Midha, McKay, 2009](#)). O alargamento da faixa de aceitação foi adotado pela EMA ([European Medicines Agency, 2010a](#)) apenas para o intervalo de confiança de C_{max} , e pode ser de até 70-143%, dependendo da variabilidade intraindividual deste parâmetro ([Minghetti, 1996](#)).

Todavia, mesmo considerando a possibilidade de alteração dos limites de aceitação de bioequivalência, existem autores que consideram que a bioequivalência média não é um critério adequado para garantir a intercambialidade de medicamentos que contem fármacos de estreita faixa terapêutica ou de alta variabilidade ([Endrenyi, Midha, 1998](#); [Lam *et al.*, 2001](#); [Zariffa, Patterson, 2001](#); [Tothfalusi, Endrenyi, 2003](#); [Wijnand, 2003](#)). Segundo estes autores, um médico, ao prescrever um medicamento genérico a seu paciente, precisa de algumas garantias que não são oferecidas

pela bioequivalência média. Existem basicamente duas situações em que o clínico é instado a decidir entre prescrever um medicamento genérico ou prescrever um medicamento de referência: na primeira situação, o paciente vai iniciar um tratamento farmacológico e a questão que se coloca é se iniciá-lo com um medicamento genérico é tão seguro e eficaz quanto iniciá-lo com um medicamento de referência; na segunda situação, o paciente já está sendo tratado com o produto referência e a questão aqui é se a substituição do produto de referência por um genérico garante a continuidade do tratamento sem variações de eficácia e segurança (Barrett *et al.*, 2000; Chow, Liu, 2000; Henderson, Esham, 2001).

Para um paciente que está iniciando um tratamento farmacológico, a resposta terapêutica a qualquer um dos possíveis medicamentos de escolha é desconhecida. A decisão do médico, então, se baseia apenas em informações disponíveis sobre o uso destes medicamentos na população em geral. Neste contexto, o conhecimento da variabilidade das medidas relativas à biodisponibilidade para cada um dos medicamentos assume importância, pois a probabilidade de um novo paciente apresentar os mesmos resultados terapêuticos, independentemente do medicamento escolhido para seu tratamento (genérico ou referência), será maior para genéricos que apresentem não apenas semelhança entre os valores médios de biodisponibilidade, mas também semelhança entre as variabilidades da biodisponibilidade (Endrenyi, Midha, 1998). Enquanto a bioequivalência média considera apenas a semelhança entre os valores médios de biodisponibilidade de cada formulação, a bioequivalência populacional considera também a semelhança entre as variabilidades interindividuais. Por este motivo, a determinação de bioequivalência populacional oferece mais garantias de intercambialidade entre genéricos e referência para novos pacientes do que a bioequivalência média. O termo em inglês *prescribability* é usado para definir a intercambialidade entre medicamentos para novos pacientes.

No caso de pacientes que já estão em tratamento com o medicamento de referência, eventualmente com posologia individualizada, a preocupação na substituição do referência por um genérico é garantir a continuidade do tratamento com a mesma eficácia e segurança, o que diz respeito não

apenas à semelhança entre os valores médios de biodisponibilidade e de variabilidade interindividual, mas também à semelhança de variabilidade intraindividual e de interação sujeito-formulação (Endrenyi, Midha, 1998; Zariffa, Patterson, 2001; U.S. Department of Health and Human Services, 2001; Meredith, 2003). A bioequivalência individual inclui estas avaliações, garantindo intercambialidade para o paciente que já está em tratamento, ou *switchability*, em inglês (Endrenyi, Midha, 1998).

A bioequivalência média detém-se somente na comparação das médias populacionais das medidas farmacocinéticas de interesse e não nas variâncias destas medidas (variância interindividual). Adicionalmente, também não leva em consideração a variância associada à interação entre indivíduos e formulações e a variância intraindividual (Endrenyi, Midha, 1998, Chow, Liu, 2000; U.S. Department of Health and Human Services, 2001). Em conclusão, o critério de bioequivalência média não fornece respostas satisfatórias às questões de intercambialidade, tanto aquelas relacionadas à intercambialidade para um novo paciente ou *prescribability* quanto aquelas relacionadas à intercambialidade para um paciente em tratamento ou *switchability* (U.S. Department of Health and Human Services, 2001; Meredith, 2003; Chow, Liu, 2000).

A existência de bioequivalência populacional, por outro lado, não presume a bioequivalência individual entre dois produtos, ou seja, o fato da razão entre os valores médios das biodisponibilidades estar dentro dos limites estabelecidos não garante que a razão entre valores individuais também esteja (Wellek 1993). Consequentemente, dois medicamentos considerados bioequivalentes pelo critério populacional podem não o ser para todos, ou mesmo para a maioria, dos indivíduos (Patnaik *et al.*, 1996). Assim, Hauck e Anderson (1994) sugerem que, ao selecionar um produto para início de tratamento, dados sobre bioequivalência populacional são suficientes. Entretanto, para pacientes que já estejam em tratamento, a substituição de um produto por outro que se pretende terapeuticamente equivalente somente pode ser efetuada com segurança caso a bioequivalência individual seja conhecida.

Com relação à exatidão, os três critérios de bioequivalência podem ser assim ordenados: individual > populacional > média (Meredith, 2003). No

que se refere ao tipo de estudo, tanto a bioequivalência média quanto a populacional podem ser avaliadas com estudos cruzados de dois períodos não-replicados. Já a bioequivalência individual exige estudos replicados de três ou quatro períodos, que possibilitam a comparação entre as variabilidades intraindividuais dos produtos teste e referência e fornecem mais informações sobre os fatores que afetam o desempenho da formulação (Schall, Williams, 1996; U.S. Department of Health and Human Services, 2003; Wijnand, 2003). O emprego de planejamento replicado permite a redução do número de voluntários, mas esta vantagem perde relevância face ao prolongamento do tempo do ensaio e ao aumento de seus custos em função do maior número de períodos (U.S. Department of Health and Human Services, 2003). Estes constituem o principal obstáculo à aplicação do conceito da bioequivalência individual, além das dúvidas sobre os reais benefícios que isto traria aos pacientes (Endrenyi *et al.*, 1998). Senn (1998) chega a afirmar que a exigência de provas de bioequivalência individual aumentaria o custo de medicamentos genéricos sem trazer vantagens correspondentes aos pacientes.

A determinação de bioequivalência populacional e individual é recomendada pelo FDA em circunstâncias especiais, quando existe a necessidade de medidas mais precisas de biodisponibilidade do que as fornecidas pelo critério de bioequivalência média (U.S. Department of Health and Human Services, 2001).

No Brasil, a Anvisa recomenda o critério de bioequivalência média para a comparação entre as medidas farmacocinéticas de interesse na maioria dos estudos de bioequivalência. Quanto à bioequivalência populacional e individual, embora reconhecendo a sua utilidade em algumas circunstâncias, a agência brasileira ainda não define critérios para sua aplicação (Brasil, 2003a).

O artigo indicado a seguir representa uma contribuição do nosso grupo de pesquisa ao debate sobre os critérios de bioequivalência média, populacional e individual e seu papel na garantia da intercambialidade de medicamentos:

⇒ *Lopes N, Ruas K, Serra CHDR, Porta V. Average, population and individual bioequivalence: answering questions on drug*

interchangeability. SA Pharmaceutical Journal. 2010; 77:46-8.
(<http://www.sapj.co.za/index.php/SAPJ/article/view/539/766>)

Projetos desenvolvidos pelo grupo na área de bioequivalência de medicamentos propiciaram diversas publicações:

- ⇒ *Porta V, Chang KH, Storpirtis S. Evaluation of the bioequivalence of capsules containing 150 mg of fluconazole. International Journal of Pharmaceutics. 2005; 288:81-6.* (http://ac.els-cdn.com/S0378517304005496/1-s2.0-S0378517304005496-main.pdf?_tid=10dfd94c-c01c-11e3-b599-00000aacb362&acdnat=1397071432_f95a8bd054b2b4925500ce62b7d4601e);
- ⇒ *Andrade SS, Kano EK, Brioschi TMLS, Koono EEM, Serra CHR, Porta V. Bioavailability study of two oral formulations of didanosine in healthy volunteers. Arzneimittel-Forschung/Drug Research. 2006; 56:359-64.* (<https://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/10.1055/s-0031-1296734>);
- ⇒ *Koono EEM, Kano EK, Schramm SG, Serra CHR, Porta V. Bioequivalence evaluation of two different tablet formulations of tinidazole in healthy volunteers. Arzneimittel-Forschung/Drug Research. 2008; 58:598-601.* (<https://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/10.1055/s-0031-1296563>);
- ⇒ *Serra CHR, Koono EEM, Kano EK, Schramm SG, Armando YP, Porta, V. Bioequivalence and pharmacokinetics of two zidovudine formulations in healthy brazilian volunteers: an open-label, randomized, single-dose, two-way crossover study. Clinical Therapeutics. 2008; 30:902-8.* (http://ac.els-cdn.com/S0149291808001732/1-s2.0-S0149291808001732-main.pdf?_tid=d0f9a190-c01c-11e3-939d-00000aacb361&acdnat=1397071755_693094d32626073af525f882c0df1409).

2.2.4 Avaliação de diferentes cronogramas de coleta de amostras biológicas em estudos de bioequivalência e análise da influência do teor de fármaco sobre os resultados destes estudos

A pesquisa descrita neste item foi desenvolvida por Eunice Kazue Kano como parte de seu doutorado sob orientação da autora e co-orientação da Profa. Dra. Chang Chiann (IME-USP). O texto a seguir foi adaptado de:

- ⇒ *Kano EK. Avaliação de diferentes cronogramas de coleta de amostras biológicas em estudos de bioequivalência e análise da influência do teor de fármaco sobre os resultados destes estudos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2008. (<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-27052008-104740/pt-br.php>).*

A coleta de amostras biológicas em ensaios de bioequivalência que envolvem determinação das curvas de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo deve ser realizada em intervalos adequados para permitir estimativa da concentração sistêmica máxima e da área sob a curva de concentração sistêmica em função do tempo. O período de coleta deve se estender por, no mínimo, três vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou metabólito ativo, sendo que o intervalo entre as coletas pode ser aumentado durante a fase pós-absorção, mas não deve ser superior à meia-vida de eliminação do fármaco (Nation, Sansom, 1994; U.S. Department of Health and Human Services, 2003). Entretanto, não existe diretriz que descreva detalhadamente como devem ser estimados os intervalos entre as coletas de amostras biológicas. A redução da quantidade de amostras biológicas apresenta vantagens técnicas, financeiras e éticas, desde que não comprometa a conclusão final em relação à bioequivalência entre os produtos. Este estudo foi planejado para avaliar o impacto do cronograma de coleta de amostras biológicas no resultado final de estudos de bioequivalência. Adicionalmente, foi definido o objetivo de avaliar o impacto de diferenças de teor (representando diferenças de quantidade de fármaco liberado *in vivo*, ou diferenças de biodisponibilidades) na conclusão de bioequivalência.

O cefadroxil foi escolhido como fármaco modelo para este estudo por apresentar características farmacocinéticas favoráveis, tais como alta biodisponibilidade, meia-vida de absorção e eliminação curtas e baixa variabilidade intraindividual.

Simulações computacionais de estudos de bioequivalência entre formulações de cefadroxil com diferentes teores do fármaco foram conduzidas com a finalidade de fornecer dados importantes ao

planejamento do ensaio *in vivo*, tais como diferenças de teor entre as formulações a serem testadas e cronogramas de coleta a serem aplicados. A seguinte equação foi usada para o cálculo das concentrações plasmáticas simuladas de cefadroxil:

$$C_t = \frac{F \times Dose \times k_a}{Vd \times (k_a - k_{el})} \times \left[e^{-k_{el}t} - e^{-k_a t} \right]$$

onde:

C_t =concentração plasmática simulada de cefadroxil no tempo t ;

F =biodisponibilidade absoluta do cefadroxil, considerada 100%;

$Dose$ =dose administrada de cefadroxil;

k_{el} =constante de velocidade de eliminação do cefadroxil;

k_a =constante de velocidade de absorção do cefadroxil;

Vd =volume de distribuição do cefadroxil.

Dois diferentes modelos foram empregados para obtenção das curvas simuladas de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo. O primeiro deles foi baseado em valores máximos e mínimos de parâmetros farmacocinéticos do cefadroxil. Os valores máximos e mínimos de cada parâmetro foram identificados a partir de um estudo de bioequivalência entre formulações de cefadroxil previamente realizado e, dentro deste intervalo, foram gerados valores aleatórios usados na obtenção de curvas simuladas de concentração sistêmica de cefadroxil. No segundo modelo, os valores aleatórios dos parâmetros farmacocinéticos do cefadroxil foram gerados a partir dos coeficientes de variação intra e interindividuais destes parâmetros, também obtidos a partir do estudo de bioequivalência entre formulações de cefadroxil previamente realizado. As curvas simuladas de concentração sistêmica em função do tempo para os dois modelos foram obtidas considerando-se os tempos 0:00, 0:10, 0:20, 0:30, 0:40, 0:50, 1:00, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 2:00, 2:15, 2:30, 2:45, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 8:00, 10:00 horas e doses administradas variando entre -10% a +20% da dose

convencional de 500 mg, totalizando dez doses teste diferentes, além da dose referência de 500 mg. Em seguida, para cada modelo, foram simulados cerca de 50 ensaios de bioequivalência comparando cada dose teste à dose referência, por meio de seis cronogramas de coleta de amostras:

- ⇒ cronograma A: 0:00, 0:10, 0:20, 0:30, 0:40, 0:50, 1:00, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 2:00, 2:15, 2:30, 2:45, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 8:00 e 10:00 horas;
- ⇒ cronograma B: 0:00, 0:20, 0:40, 1:00, 1:20, 1:40, 2:00, 2:30, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 8:00 e 10:00 horas;
- ⇒ cronograma C: 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 8:00 e 10:00 horas;
- ⇒ cronograma D: 0:00, 0:40, 1:20, 2:00, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 8:00 e 10:00 horas;
- ⇒ cronograma E: 0:00, 0:50, 1:40, 2:30, 4:00, 5:00, 6:00, 8:00 e 10:00 horas;
- ⇒ cronograma F: 0:00, 1:00, 2:00, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 8:00 e 10:00 horas.

Os resultados obtidos a partir dos estudos simulados indicaram que cronogramas de coleta com menos amostras favorecem a obtenção de intervalos de confiança 90% (IC90%) fora dos limites preconizados pelos órgãos reguladores tanto para $C_{\max}$ (concentração plasmática máxima de cefadroxil) quanto para ASC (área sob a curva de concentração plasmática de cefadroxil em função do tempo). Além disso, estudos de bioequivalência comparando a dose referência a doses teste 8% menores ou 15% maiores apresentarão IC90% fora dos limites preconizados em mais de 50% dos casos.

O estudo *in vivo* teve delineamento aleatório, cruzado e aberto, foi realizado em quatro períodos e incluiu 24 voluntários sadios do sexo masculino, divididos em quatro grupos. O produto foi administrado aos voluntários em quatro doses com a finalidade de simular diferentes valores de extensão de absorção para avaliar a confiabilidade de vários cronogramas de coleta de amostras de sangue na detecção de diferenças entre formulações em

ensaios de bioequivalência. Empregou-se o medicamento Cefamox[®] suspensão oral contendo 100 mg de cefadroxil/mL, produzido por Laboratórios Bristol-Myers Squibb Brasil. As doses administradas foram obtidas pela variação de volume de suspensão oral administrado aos voluntários. Com base nos resultados das simulações computacionais, as doses selecionadas para o ensaio *in vivo* foram:

- ⇒ Dose D1: 450 mg de cefadroxil, correspondente a 4,50 mL de suspensão;
- ⇒ Dose D2: 480 mg de cefadroxil, correspondente a 4,80 mL de suspensão;
- ⇒ Dose D3: 500 mg de cefadroxil, correspondente a 5,00 mL de suspensão;
- ⇒ Dose D4: 520 mg de cefadroxil, correspondente a 5,20 mL de suspensão.

A comparação entre estas doses permitiu avaliar diferenças de teor de fármaco variando de -14% a +16%. Cada voluntário recebeu as quatro doses do estudo alternadamente. Entre os períodos do estudo houve um intervalo de *washout* de uma semana.

O cronograma de coleta de amostras escolhido foi equivalente ao cronograma A testado nos ensaios simulados, com inclusão de um tempo de coleta em 7:00 hs e exclusão do tempo de coleta de 10:00 hs. Assim, as amostras de sangue foram obtidas 0:00, 0:10, 0:20, 0:30, 0:40, 0:50, 1:00, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 2:00, 2:15, 2:30, 2:45, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00 e 8:00 horas após a administração do produto (cronograma A'). Outros cronogramas de coleta foram gerados pela exclusão de pontos do cronograma A':

- ⇒ cronograma B': 0:00, 0:20, 0:40, 1:00, 1:20, 1:40, 2:00, 2:30, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00 e 8:00 horas;
- ⇒ cronograma C': 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00 e 8:00 horas;
- ⇒ cronograma D': 0:00, 0:40, 1:20, 2:00, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00 e 8:00 horas;

- ⇒ cronograma E': 0:00, 0:50, 1:40, 2:30, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00 e 8:00 horas;
- ⇒ cronograma F': 0:00, 1:00, 2:00, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00 e 8:00 horas.

As amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do plasma, que foi mantido congelado a -20°C até a realização das análises de quantificação do fármaco.

A quantificação de cefadroxil nas amostras de plasma foi realizada por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (DAD) após pré-tratamento com acetonitrila para precipitação de proteínas. O método bioanalítico foi validado por meio da determinação dos parâmetros de especificidade, recuperação, curva de calibração, limite de quantificação, precisão, exatidão e estabilidade conforme a RE Anvisa 899/03 ([Brasil, 2003d](#)).

Os parâmetros farmacocinéticos relativos à absorção foram determinados a partir das curvas de concentração plasmática de cefadroxil em função do tempo ([Ritschel, Kearns, 2009](#); [Shargel *et al.*, 2005](#)) e os resultados obtidos foram avaliados através da análise da variância (Anova) para os parâmetros $C_{\max}$, $t_{\max}$ e ASC_{0-t} e da construção do intervalo de confiança 90% (IC90%) para os parâmetros $C_{\max}$ e ASC_{0-t} , conforme a RE Anvisa 1170/06 ([Brasil, 2006](#)). IC90% dentro da faixa de 80-125% para $C_{\max}$ e ASC_{0-t} levaram à conclusão de bioequivalência entre as doses comparadas.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os intervalos de confiança 90% (IC90%) para todas as possíveis comparações entre as quatro doses de cefadroxil administradas aos voluntários no ensaio *in vivo*, em todos os cronogramas de coleta.

Tabela 1: Intervalo de confiança 90% (IC90%) para $C_{\max}$ para as possíveis comparações entre as quatro doses de cefadroxil (D1=450 mg; D2=480 mg; D3=500 mg e D4=520 mg) administradas a 24 voluntários sadios considerando-se seis cronogramas de coleta (A', B', C', D', E', F'). T=teste, R=referência, Dif. teor (%)=100*(T-R)/R.

(T/R)	Dif. teor (%)	Intervalo de confiança 90% (%)					
		A'	B'	C'	D'	E'	F'
D1/D2	-6,25	88-99	88-99	86-96	78-112*	91-102	86-97
D1/D3	-10,00	86-95	85-95	84-93	73-105*	89-100	85-96
D1/D4	-13,46	84-93	84-94	82-91	74-105*	86-97	82-93
D2/D1	6,66	101-113	101-113	104-116	89-127*	98-110	103-117
D2/D3	-4,00	91-102	91-101	92-102	78-112*	92-104	94-106
D2/D4	-7,69	90-100	90-101	90-100	79-112*	89-101	90-102
D3/D1	11,11	105-117	106-118	108-120	96-136*	96-109	85-93
D3/D2	4,17	98-109	99-110	98-109	89-128*	96-109	95-107
D3/D4	-3,84	93-104	94-105	93-104	84-120	91-103	91-103
D4/D1	15,55	107-118	106-118	109-122	95-136*	103-116	107-121
D4/D2	8,33	100-111	99-111	100-111	89-127*	99-112	90-111
D4/D3	4,00	97-107	95-106	96-107	83-119	97-110	97-110

*ausência de bioequivalência

Tabela 2: Intervalo de confiança 90% (IC90%) para ASC_{0-t} para as possíveis comparações entre as quatro doses de cefadroxil (D1=450 mg; D2=480 mg; D3=500 mg e D4=520 mg) administradas a 24 voluntários sadios considerando-se seis cronogramas de coleta (A', B', C', D', E', F'). T=teste, R=referência, Dif. teor (%)=100*(T-R)/R.

T/R	Dif. teor (%)	Intervalo de confiança 90% (%)					
		A'	B'	C'	D'	E'	F'
D1/D2	-6,25	88-95	88-95	88-95	88-95	88-95	86-94
D1/D3	-10,00	84-90	83-90	83-90	82-90	84-91	82-89
D1/D4	-13,46	78-85*	78-85*	78-85*	78-84*	78-85*	77-83*
D2/D1	6,66	91-99	105-114	106-114	105-114	105-114	107-116
D2/D3	-4,00	91-99	91-99	91-99	90-98	92-99	91-99
D2/D4	-7,69	86-93	86-93	86-93	85-92	86-93	85-93
D3/D1	11,11	111-120	110-120	111-120	112-121	110-119	113-123
D3/D2	4,17	101-110	101-109	101-110	102-112	101-109	101-111
D3/D4	-3,84	90-98	90-98	91-98	90-98	90-97	90-98
D4/D1	15,55	118-127*	118-128*	118-128*	118-129*	118-128*	120-130*
D4/D2	8,33	108-117	107-116	108-116	108-118	108-117	108-117
D4/D3	4,00	102-111	102-111	102-110	102-111	103-112	102-111

*ausência de bioequivalência

Doses de cefadroxil que apresentam diferença percentual entre -10,00 e 11,11% foram consideradas bioequivalentes, enquanto que doses com diferenças de -13,46% e de 15,55% não apresentaram bioequivalência. A ausência de bioequivalência foi detectada pela determinação do IC90% para o parâmetro ASC_{0-t} , comprovando-se sua maior sensibilidade a diferenças entre os produtos em relação a C_{max} . As diferenças entre os cronogramas de coleta não exerceram influência na conclusão dos estudos, exceto no caso do cronograma D', cuja aplicação levou à conclusão de ausência de bioequivalência para todas as comparações com base nos IC90% de C_{max} . Este cronograma foi o único a não incluir um tempo de coleta de amostra correspondente ao t_{max} (tempo necessário para atingir concentração sistêmica máxima do fármaco após administração do medicamento) do cefadroxil em suspensões orais, que é de aproximadamente uma hora. Como consequência, o parâmetro C_{max} não pode ser determinado com exatidão quando este cronograma foi usado. Os resultados obtidos com o uso dos cronogramas A', B', C', E' e F' foram semelhantes, levando às mesmas conclusões em relação à presença ou não de bioequivalência entre as doses testadas. Assim, na prática, um cronograma de coleta com 9 pontos (cronograma F') é tão eficaz quanto um cronograma de coleta de 22 pontos (cronograma A') na determinação de bioequivalência de cefadroxil, indicando que o aumento do número de coletas de amostras não se reflete em aumento de exatidão na determinação das curvas de concentração sistêmica em função do tempo, desde que seja prevista coleta de amostra em tempo correspondente ao t_{max} .

2.2.5 Situações específicas

Existem fármacos e produtos farmacêuticos com características específicas para os quais a aplicação do conceito de bioequivalência na avaliação da equivalência terapêutica ainda não atingiu o consenso, ou para os quais o desenho padrão do ensaio de bioequivalência não é aplicável. Entre estes fármacos podemos citar os compostos por substâncias endógenas e os constituídos por misturas racêmicas (Marzo, 1999).

2.2.5.1 Substâncias endógenas

A princípio, o ensaio de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos que são substâncias endógenas deveria basear-se no aumento de concentração sistêmica do fármaco em função da dose administrada. Porém, as substâncias endógenas estão sujeitas a mecanismos de controle homeostático que mantêm suas concentrações dentro da faixa fisiológica normal, prevenindo alterações que podem ser prejudiciais ao organismo. Em muitos casos, a administração de grandes quantidades de análogos exógenos é rapidamente compensada, resultando em acréscimo insignificante e altamente variável na concentração sistêmica destas substâncias, e dificultando a determinação da bioequivalência ([Marzo, 1999](#); [Marzo *et al.*, 2000](#); [Blakesley *et al.*, 2004](#); [Dissanayake, 2010](#)).

Para superar este problema, algumas estratégias são propostas. Uma delas consiste em suprimir a secreção endógena da substância de interesse por meio da administração de altas doses do análogo exógeno. Esta técnica foi empregada em ensaios de bioequivalência de hormônio de crescimento, de hormônio folículo-estimulante e de hormônio luteinizante. Embora seja uma técnica interessante e que fornece bons resultados, sua aplicação é limitada na maioria dos casos ([Dissanayake, 2010](#)).

Outra possibilidade é a seleção de voluntários com deficiência na produção endógena da substância que está sendo testada. Este modelo está bem estabelecido na determinação de bioequivalência entre formulações de estradiol empregadas para terapia de reposição hormonal, que são avaliadas em mulheres pós-menopausa ou em mulheres submetidas a remoção bilateral de ovários. Entretanto, a heterogeneidade na extensão da deficiência e questões éticas dificultam sua aplicação em outras situações ([Dissanayake, 2010](#)).

A restrição da ingesta também pode ser usada para diminuir a influência de um alto aporte dietético sobre o estudo de bioequivalência ([Dissanayake, 2010](#)). Neste sentido, a padronização da dieta e das condições ambientais é de extrema importância em ensaios envolvendo fármacos para os quais a ingesta, a eliminação pelo organismo e os mecanismos de homeostase são relevantes. Este é o caso, por exemplo, do cloreto de potássio. O FDA

estabeleceu uma diretriz específica para formulações contendo este fármaco, definindo a necessidade de dieta contendo quantidades conhecidas de sódio, potássio e líquidos, além de controle climático do local do ensaio para prevenir perda de potássio por transpiração, entre outros fatores ([Dissanayake, 2010](#)).

A correção das concentrações obtidas após administração dos medicamentos no ensaio de bioequivalência pela subtração das concentrações basais é um método bastante usado, sendo recomendado pela Anvisa ([Brasil, 2006](#)) e pela EMA ([European Medicines Agency, 2010a](#)). A correção pode ser feita empregando-se um valor médio de concentração basal, obtido a partir de três ou mais medidas em amostras coletadas ao longo do período de 24 horas antes da administração das formulações teste e referência, ou pode ser feita a partir de uma curva de concentração basal em função do tempo, obtida a partir da medida de amostras coletadas no período de 24 horas anterior à administração, nos mesmos horários previstos para as coletas do ensaio. Uma das limitações desta técnica é a possibilidade de supercorreção, já que a administração exógena pode afetar a produção endógena, reduzindo os valores de concentração basal durante o estudo. Além disso, os valores corrigidos de concentração apresentam alta variabilidade, o que determina a necessidade de um grande número de voluntários acarretando dificuldades de ordem ética e financeira. Por outro lado, o uso de valores não corrigidos de concentração, com menor variabilidade, dificulta a detecção de diferenças entre as formulações ([Marzo, 1999](#); [Dissanayake, 2010](#)). A Anvisa determina a realização de análise estatística empregando tanto os valores de concentração corrigidos quanto os não corrigidos ([Brasil, 2006](#)).

A correção em função da concentração basal é mais robusta nas situações em que as concentrações endógenas representam uma pequena proporção das concentrações totais após a administração dos medicamentos. Desta forma, o uso de doses supratrapêuticas minimiza os problemas associados ao procedimento de correção e pode ser bastante útil desde que não implique em toxicidade para o voluntário ([Dissanayake, 2010](#)). Este método também é recomendado pela EMA ([European Medicines Agency, 2010a](#)).

O emprego de dados de excreção urinária pode ser bastante interessante na determinação de bioequivalência entre medicamentos compostos por substâncias endógenas, pois os mecanismo de controle homeostático atuarão no sentido de eliminar o excesso de substância proveniente da administração dos medicamentos, a qual pode então ser recuperada e quantificada na urina. Este procedimento só é aplicável a fármacos que são totalmente eliminados de forma inalterada por via renal ([Dissanayake, 2010](#)).

2.2.5.2 Misturas racêmicas

Muitos dos fármacos utilizados na prática clínica são encontrados na forma de misturas racêmicas ou racematos, ou seja, misturas contendo dois enantiômeros complementares na proporção de 50:50. Enantiômeros são isômeros que apresentam a mesma estrutura química e as mesmas propriedades físico-químicas, porém diferem em sua estrutura tridimensional, apresentando-se como imagens especulares não superponíveis. Uma vez que os sítios de ação dos fármacos são, em geral, de natureza tridimensional, enantiômeros podem apresentar comportamentos diferentes no organismo como consequência de farmacocinética e farmacodinâmica estereosseletivas ([Brocks, 2006](#)).

Assim, no caso de fármacos que se apresentam como misturas racêmicas, é possível que ocorram diferenças quantitativas e qualitativas de ação farmacológica entre os enantiômeros, bem como diferenças entre suas curvas de concentração sistêmica em função do tempo após a administração da mistura racêmica. Em função destas diferenças, a quantificação de fármaco total em líquidos biológicos pode ocasionar falhas na interpretação de dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos e de relação entre concentração e efeito farmacológico ([Nation, Sansom, 1994](#)). Consequentemente, o emprego de métodos estereosseletivos de quantificação de fármacos para avaliar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de enantiômeros presentes em uma mistura racêmica tornou-se prática comum em ensaios clínicos. Entretanto, o uso destes métodos em ensaios de bioequivalência ainda é controverso, e

diversos argumentos favoráveis e desfavoráveis são citados pelos cientistas envolvidos com essa questão ([Srinivas, 2004](#)).

Normalmente, considera-se que duas formulações bioequivalentes são terapeuticamente equivalentes, mas isto pode não ser verdade para medicamentos contendo fármacos racêmicos e, nestes casos, a quantificação de fármaco total, sem discriminação dos enantiômeros, pode não significar equivalência terapêutica ([Mehvar, Jamali, 1997](#)).

Embora exista consenso entre pesquisadores e entre agências reguladoras em relação ao planejamento, execução e interpretação de resultados de ensaios de bioequivalência em geral, o mesmo não acontece quando se trata de ensaios de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos na forma de misturas racêmicas, uma vez que existe grande discussão em relação a qual substância deve ser quantificada nos fluidos biológicos dos voluntários ([Nation, Sansom, 1994](#)):

- ⇒ todos os enantiômeros individualmente, por meio de método analítico estereosseletivo;
- ⇒ apenas o enantiômero ativo, por meio de método analítico estereosseletivo;
- ⇒ o fármaco total sem distinção entre os enantiômeros, por meio de método analítico não estereosseletivo.

Como reflexo desta situação, observa-se que as agências reguladoras apresentam visões distintas sobre a necessidade de se realizar ensaios de bioequivalência com quantificação de enantiômeros. A Anvisa não exige o emprego de métodos bioanalíticos estereosseletivos em nenhuma situação, mas o FDA recomenda a quantificação separada dos enantiômeros em estudos de bioequivalência que satisfaçam as seguintes condições ([U.S. Department of Health and Human Services, 2003](#)):

- ⇒ enantiômeros com características farmacodinâmicas diferentes;
- ⇒ enantiômeros com características farmacocinéticas diferentes;
- ⇒ absorção não-linear, caracterizada por alterações na razão entre os enantiômeros *in vivo* em decorrência de alterações na velocidade de absorção do fármaco;

⇒ enantiômero de menor concentração sistêmica é o principal responsável pela eficácia e segurança do medicamento.

A EMA ([European Medicines Agency, 2010a](#)) define os mesmos critérios do FDA, exceto o último, para requerer a quantificação separada dos enantiômeros em ensaios de bioequivalência.

[Midha e col. \(1998\)](#) propuseram um algoritmo de decisão (Figura 1) para avaliação da necessidade de emprego ou não de métodos estereosseletivos de quantificação de fármacos em ensaios de bioequivalência. De acordo com esse algoritmo, seria necessário usar tais métodos nas seguintes situações:

1. o enantiômero ativo apresenta alta taxa de biotransformação pré-sistêmica estereosseletiva e existe relação entre a velocidade de entrada do fármaco no organismo e a proporção entre as concentrações plasmáticas dos enantiômeros (quantificar fármaco total e enantiômero ativo);
2. o enantiômero ativo apresenta baixa taxa de biotransformação pré-sistêmica estereosseletiva e a proporção específica entre as concentrações plasmáticas dos enantiômeros é importante para atingir o efeito terapêutico ótimo (quantificar cada enantiômero separadamente).

Figura 1: Algoritmo de decisão para avaliação da necessidade de emprego ou não de métodos estereosseletivos de quantificação de fármacos em ensaios de bioequivalência (modificado de [Midha et al., 1998](#)).

De acordo com [Srinivas \(2004\)](#), outras informações são importantes no processo de decisão sobre a utilização ou não de métodos analíticos estereosseletivos:

- ⇒ saturabilidade do processo de biotransformação pré-sistêmica;
- ⇒ papel de outros mecanismos ativos ou passivos no processo de eliminação do fármaco (por exemplo, eliminação biliar ou renal) e sua saturabilidade;
- ⇒ efeitos da ligação a proteínas plasmáticas e de alterações no equilíbrio fármaco livre/fármaco ligado na distribuição e eliminação dos enantiômeros.

Por meio dessas informações é possível obter uma melhor compreensão da farmacocinética dos enantiômeros em diferentes dosagens (dentro da faixa terapêutica) e diferentes velocidades de entrada no organismo (comprimidos, cápsulas, soluções) (Srinivas, 2004).

Em outro trabalho, Mehvar e Jamali (1997) recomendam a utilização de métodos enantiosseletivos em estudos com racematos de farmacocinética não-linear ou cujos enantiômeros apresentam diferenças significativas de perfis farmacocinéticos, mesmo que a farmacocinética seja linear. Adicionalmente, os autores sugerem a mesma abordagem no caso de fármacos que sofrem inversão quiral (conversão de um enantiômero no outro) *in vivo*. Os métodos não estereosseletivos seriam empregados na avaliação de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos racêmicos de farmacocinética linear e pouco estereosseletiva.

As diferenças nas propriedades farmacodinâmicas dos enantiômeros tornam possível que a concentração total de fármaco, obtida por meio de método analítico não estereosseletivo, não apresente correlação com a intensidade do efeito farmacológico, ou com a eficácia do produto. Nestes casos, o ensaio de bioequivalência deveria ser conduzido utilizando-se métodos estereosseletivos. Entretanto, uma vez que os limites estabelecidos pelas agências reguladoras para fármacos bioequivalentes são bastante amplos, permitindo uma variação de 20% entre os medicamentos testados, questiona-se se as eventuais diferenças entre enantiômeros não estariam incluídas nesses limites e, portanto, seria possível prescindir da utilização de métodos enantiosseletivos em ensaios de bioequivalência. Diversos estudos descritos na literatura indicam que as diferenças entre enantiômeros podem extrapolar os limites estabelecidos para a bioequivalência.

Garcia-Arieta e colaboradores (2005) realizaram ensaio de bioequivalência de formulações contendo ibuprofeno racêmico com quantificação do fármaco total por método não estereosseletivo e dos dois enantiômeros (S-ibuprofeno e R-ibuprofeno) por método estereosseletivo. Os produtos testados foram bioequivalentes tanto para o fármaco total como para os enantiômeros, entretanto a proporção entre os dois enantiômeros (S/R) no plasma foi diferente para os dois produtos testados.

Formulações contendo clorfeniramina, outro fármaco disponível na forma de mistura racêmica, foram submetidas a ensaio de bioequivalência descrito por Hiep e colaboradores (2000). Neste estudo, os autores comprovaram bioequivalência entre as formulações com o emprego de método não estereosseletivo de quantificação de clorfeniramina no plasma, mas ausência de bioequivalência com o emprego de método estereosseletivo.

Esta diferença foi observada também por Srinivas e colaboradores (1996) em estudo de bioequivalência entre formulações contendo nadolol: o emprego de método não estereosseletivo levou à conclusão de bioequivalência entre as formulações, enquanto que o emprego de método estereosseletivo originou resultados que indicaram a ausência de bioequivalência entre as mesmas formulações.

2.2.5.2.1 Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros

A pesquisa descrita neste item foi desenvolvida por Francinalva Dantas de Medeiros como parte de seu doutorado sob orientação da autora. O texto a seguir foi adaptado de:

⇒ *Medeiros FD. Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2013. (<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-04042014-113927/pt-br.php>).*

O metoprolol é um fármaco betabloqueador utilizado na forma de mistura racêmica no tratamento de hipertensão e isquemia cardíaca. Apresenta diversas características que o credenciam como fármaco para o qual é recomendável o emprego de método enantiosseletivo em ensaios de bioequivalência (Sandberg *et al.*, 1993; Cerqueira *et al.*, 2003a; Cerqueira *et al.*, 2003b). Seus enantiômeros exibem diferenças farmacodinâmicas, uma vez que a afinidade do enantiômero S-metoprolol pelo receptor de subtipo

β 1-adrenérgico é significativamente maior (mais de 500 vezes) que a do R-metoprolol (Wahlund *et al.*, 1990). Além disso, apresenta metabolismo pré-sistêmico, de forma que a razão entre os valores de ASC (área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo) de cada enantiômero em relação ao fármaco total pode ser afetada pela velocidade de absorção do fármaco. Os fármacos racêmicos sujeitos a processos saturáveis, especialmente durante a fase de absorção (absorção por transporte ativo, inversão quiral *in vivo* mediada por enzimas, biotransformação pré-sistêmica) e cujos enantiômeros apresentam diferenças farmacocinéticas estão sujeitos a alterações na proporção entre os enantiômeros no plasma em função da velocidade de introdução do fármaco no organismo. Consequentemente, os resultados de estudos de bioequivalência com quantificação do fármaco total não podem ser extrapolados para os enantiômeros individuais, já que processos saturáveis podem ser enantiosseletivos (Mehvar, Jamali, 1997). Boni e colaboradores (2000) avaliaram se os valores de $C_{\max}$ de S- e R,S-etodolac são afetados pela taxa de absorção, observando que o decréscimo na taxa de absorção diminui significativamente a razão entre $C_{\max}$ do enantiômero (S) e do fármaco total (R,S), devido a diferenças na saturação enantiosseletiva da absorção e nas diferenças na ligação com as proteínas.

Estão disponíveis, no mercado brasileiro, medicamentos genéricos e similares contendo metoprolol na forma de mistura racêmica. Como não é exigida pela Anvisa a realização de ensaios com métodos enantiosseletivos de quantificação de fármacos para avaliar a bioequivalência entre essas formulações, existe a possibilidade de diferenças entre as concentrações plasmáticas de S-metoprolol e R-metoprolol serem maiores que as estabelecidas pelos limites de bioequivalência. Esta pode ser, inclusive, uma possível explicação para diferenças de ação entre medicamentos referência e genéricos relatadas por alguns pacientes e médicos. Desta forma, realizou-se investigação científica com o objetivo de avaliar a influência de diferenças farmacotécnicas, como a velocidade de liberação do fármaco da formulação, na farmacocinética do metoprolol total e de seus enantiômeros, S-metoprolol e R-metoprolol. Para atingir este objetivo foi necessário estabelecer método de administração oral de metoprolol capaz

de simular diferentes velocidades de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica. Optou-se, então, pelo emprego de formulações preparadas por adição de solução edulcorada a comprimidos triturados de metoprolol, obtendo-se:

- ⇒ suspensão oral I: contendo 100 mg de tartarato de metoprolol/dose (empregada no Esquema I de administração);
- ⇒ suspensão oral II: contendo 50 mg de tartarato de metoprolol/dose (empregada no Esquema II de administração);
- ⇒ suspensão oral III: contendo 20 mg de tartarato de metoprolol/dose (empregada no Esquema III de administração).

A simulação de diferentes velocidades de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica foi obtida por meio de três esquemas de administração:

- ⇒ esquema I: os voluntários receberam uma dose da suspensão oral I, totalizando o equivalente a 100 mg de tartarato de metoprolol em tomada única;
- ⇒ esquema II: os voluntários receberam duas doses da suspensão oral II administradas com intervalo de 30 minutos entre elas, totalizando o equivalente a 100 mg de tartarato de metoprolol em duas tomadas ao longo de 30 minutos;
- ⇒ esquema III: os voluntários receberam cinco doses da suspensão oral III administradas com intervalo de 30 minutos entre elas, totalizando o equivalente a 100 mg de tartarato de metoprolol em cinco tomadas ao longo de duas horas.

Foram selecionados para este estudo 20 voluntários sadios de ambos os sexos. O estudo foi do tipo aleatório, em três períodos. No primeiro período, os voluntários receberam as suspensões de metoprolol conforme o esquema I de administração. No segundo e terceiro períodos o metoprolol foi administrado conforme os esquemas II e III, respectivamente. Entre os períodos houve um intervalo de *washout* de sete ou oito dias, superior a dez vezes o valor da meia-vida de eliminação do metoprolol.

A administração das suspensões contendo metoprolol ocorreu em jejum de pelo menos 8 horas. O jejum foi mantido até quatro horas após a administração do medicamento, totalizando 12 horas. Durante o período de internação foram oferecidas aos voluntários duas refeições padronizadas (almoço e lanche). Os voluntários foram orientados a não ingerir bebidas alcoólicas, café e outras bebidas ou alimentos contendo xantinas a partir de 48 horas antes da administração do medicamento em cada uma das fases. Durante o período de internação estas bebidas e alimentos não foram oferecidos. Além disso, foram orientados a não tomar qualquer medicamento uma semana antes do estudo ou durante sua realização.

Foram coletadas amostras de 5 mL de sangue em tubos heparinizados nos tempos 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 5:00, 6:00 e 8:00 horas após o início da administração do medicamento.

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 min e o plasma obtido foi transferido a tubos de polipropileno e mantido congelado a -20°C até a quantificação do metoprolol e seus enantiômeros.

A quantificação de metoprolol total nas amostras de plasma foi realizada por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) com detecção por fluorescência, após pré-tratamento das amostras com acetonitrila para precipitação das proteínas. Também para a quantificação dos enantiômeros S-metoprolol e R-metoprolol empregou-se a técnica de CLAE após precipitação de proteínas com acetonitrila. Para a separação dos enantiômeros foi utilizada coluna cromatográfica quiral. O padrão interno usado nos dois métodos foi o ofloxacino. A validação dos métodos bioanalíticos foi conduzida de acordo com a Resolução Anvisa 899/03 (Brasil, 2003d). Os parâmetros determinados foram: especificidade, recuperação, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade para cada enantiômero.

Após a quantificação do metoprolol total e seus enantiômeros nas amostras de plasma provenientes da etapa clínica, foram construídas as curvas de concentração plasmática em função do tempo para cada analito (metoprolol total, S-metoprolol e R-metoprolol) e cada voluntário. A partir destas curvas determinaram-se os parâmetros farmacocinéticos C_{max}

(concentração plasmática máxima que o fármaco atinge após a administração), t_{max} (tempo necessário para C_{max}), ASC_{0-t} (área parcial sob a curva de concentração plasmática em função do tempo), ASC_{0-inf} (área total sob a curva de concentração plasmática em função do tempo; $t_{(1/2)el}$ (meia-vida de eliminação plasmática do fármaco) e k_{el} (constante de velocidade de eliminação do fármaco) para metoprolol total, S-metoprolol e R-metoprolol (Ritschel, Kearns, 2009; Shargel *et al.*, 2005).

As concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros e os parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração do fármaco conforme os três esquemas empregados foram comparados por meio de análise de variância (Anova) e construção de intervalo de confiança 95% (IC95%).

As curvas médias de concentração plasmática em função do tempo obtidas para o fármaco (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros, a partir dos três diferentes esquemas de administração do fármaco, são apresentadas nas Figuras 2, 3 e 4. Os parâmetros farmacocinéticos correspondentes encontram-se na Tabela 3.

Figura 2: Curvas médias de concentração plasmática em função do tempo de (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros no período 1 do estudo farmacocinético, após administração do esquema I a 20 voluntários sadios (uma dose da suspensão oral I, totalizando o equivalente a 100 mg de tartarato de metoprolol em tomada única).

Figura 3: Curvas médias de concentração plasmática em função do tempo de (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros no período 2 do estudo farmacocinético, após administração do esquema II a 20 voluntários sadios (duas doses da suspensão oral II, totalizando o equivalente a 100 mg de tartarato de metoprolol em duas tomadas ao longo de 30 minutos).

Figura 4: Curvas médias de concentração plasmática em função do tempo de (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros no período 3 do estudo farmacocinético, após administração do esquema III a 20 voluntários sadios (cinco doses da suspensão oral III, totalizando o equivalente a 100 mg de tartarato de metoprolol em cinco tomadas ao longo de duas horas).

Tabela 3: Parâmetros farmacocinéticos para (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros nos períodos 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético, após administração oral de dose equivalente a 100 mg de tartarato de metoprolol, em três diferentes esquemas, a 20 voluntários sadios. Valores expressos em média $\pm$ DP (desvio padrão).

Per.	Analito	$C_{\max}$ (ng/mL)	$t_{\max}$ (h)	$t_{(1/2)el}$ (h)	ASC_{0-t} (ng*h/mL)	ASC_{0-inf} (ng*h/mL)
1	(R,S)-met.	233 $\pm$ 26	1,2 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2	663 $\pm$ 68	676 $\pm$ 67
	R-met.	154 $\pm$ 13	1,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,1	470 $\pm$ 18	473 $\pm$ 19
	S- met.	125 $\pm$ 6	1,16 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	405 $\pm$ 15	412 $\pm$ 16
2	(R,S)-met.	248 $\pm$ 24	1,7 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	767 $\pm$ 59	787 $\pm$ 58
	R-met.	156 $\pm$ 17	1,6 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	519 $\pm$ 26	529 $\pm$ 30
	S-met.	147 $\pm$ 20	1,7 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3	467 $\pm$ 24	482 $\pm$ 26
3	(R,S)-met.	201 $\pm$ 15	2,4 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,4	702 $\pm$ 40	767 $\pm$ 57
	R- met.	114 $\pm$ 2	2,5 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,1	378 $\pm$ 13	398 $\pm$ 18
	S- met.	108 $\pm$ 7	2,5 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,3	385 $\pm$ 17	408 $\pm$ 22

As Tabela 4, 5 e 6 apresentam os resultados dos testes de Anova para comparação entre os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, $t_{\max}$ e ASC_{0-t} para (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros obtidos nos períodos 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético.

Tabela 4: Resultados do teste de análise de variância (Anova) para comparação entre os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, $t_{\max}$ e ASC_{0-t} para (R,S)-metoprolol nos períodos 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético, expressos em valores de p.

Comparação	$C_{\max}$	$t_{\max}$	ASC_{0-t}
Esquema I x Esquema II	0,111391	0,000000*	0,000002*
Esquema I x Esquema III	0,000158*	0,000000*	0,105012
Esquema II x Esquema III	0,000000*	0,000000*	0,002588*
Análise post hoc	I,II>III	III>II>I	II>I,III

*considerara-se diferença significativa para $p < 0,05$

Tabela 5: Resultados do teste de análise de variância (Anova) para comparação entre os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, $t_{\max}$ e ASC_{0-t} para R-metoprolol nas fases 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético, expressos em valores de p.

Comparação	$C_{\max}$	$t_{\max}$	ASC_{0-t}
Esquema I x Esquema II	0,849696	0,000000*	0,000000*
Esquema I x Esquema III	0,000000*	0,000000*	0,000000*
Esquema II x Esquema III	0,000000*	0,000000*	0,000000*
Análise post hoc	I,II>III	III>II>I	II>I>III

*considerara-se diferença significativa para $p < 0,05$

Tabela 6: Resultados do teste de análise de variância (Anova) para comparação entre os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$, $t_{\max}$ e ASC_{0-t} para S-metoprolol nas fases 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético, expressos em valores de p.

Comparação	$C_{\max}$	$t_{\max}$	ASC_{0-t}
Esquema I x Esquema II	0,000000*	0,000000*	0,000000*
Esquema I x Esquema III	0,003416*	0,003416*	0,003416*
Esquema II x Esquema III	0,000000*	0,000000*	0,000000*
Análise post hoc	II>I>III	II>I>III	II>I>III

*considerara-se diferença significativa para $p < 0,05$

As Tabela 7, 8 e 9 apresentam os valores dos intervalos de confiança 95% (IC 95%) para as diferenças entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ e ASC_{0-t} para (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros obtidos nos períodos 1, 2 e 3 do estudo.

Tabela 7: Intervalos de confiança 95% (IC95%) para as diferenças entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ e ASC_{0-t} para (R,S)-metoprolol obtidos nos períodos 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético.

Parâmetro	Comparação	IC95%
$C_{\max}$	Esquema I x Esquema II	-2,6349 a 32,4604
	Esquema I x Esquema III	-49,1464 a -14,0512*
	Esquema II x Esquema III	-64,0592 a -28,9639*
ASC_{0-t}	Esquema I x Esquema II	59,179 a 149,5363*
	Esquema I x Esquema III	-6,251 a 84,1065
	Esquema II x Esquema III	-110,609 a -20,2509*

*considerara-se diferença significativa quando o IC95% não incluiu o valor zero.

Tabela 8: Intervalos de confiança 95% (IC95%) para as diferenças entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ e ASC_{0-t} para R-metoprolol obtidos nos períodos 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético.

Parâmetro	Comparação	IC95%
$C_{\max}$	Esquema I x Esquema II	-7,5702 a 12,0264
	Esquema I x Esquema III	-49,1930 a -29,5964*
	Esquema II x Esquema III	-51,4211 a -31,8245*
ASC_{0-t}	Esquema I x Esquema II	32,841 a 64,079*
	Esquema I x Esquema III	-107,900 a -76,662*
	Esquema II x Esquema III	-156,360 a -125,122*

*considerara-se diferença significativa quando o IC95% não incluiu o valor zero.

Tabela 9: Intervalos de confiança 95% (IC95%) para as diferenças entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ e ASC_{0-t} para S-metoprolol obtidos nos períodos 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético.

Parâmetro	Comparação	IC95%
$C_{\max}$	Esquema I x Esquema II	11,1838 a 31,1194*
	Esquema I x Esquema III	-27,3875 a -7,4519*
	Esquema II x Esquema III	-48,5391 a -28,6035*
ASC_{0-t}	Esquema I x Esquema II	45,2841 a 76,1316*
	Esquema I x Esquema III	-37,1790 a -6,3316*
	Esquema II x Esquema III	-97,8868 a -67,0394*

*considerara-se diferença significativa quando o IC95% não incluiu o valor zero.

A Tabela 10 apresenta os resultados do teste de análise de variância (Anova) para a razão entre $C_{\max}$ e AUC_{0-t} de (R,S)-metoprolol e de R-metoprolol obtidos nos períodos 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético e a Tabela 11 apresenta os resultados do teste de análise de variância (Anova) para a razão entre $C_{\max}$ e AUC_{0-t} de (R,S)-metoprolol e de S-metoprolol obtidos nos períodos 1,2 e 3 do estudo farmacocinético.

Tabela 10: Resultados do teste de análise de variância (Anova) para a razão entre $C_{\max}$ e AUC_{0-t} de (R,S)-metoprolol e de R-metoprolol obtidos nos períodos 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético expressos em valores de p.

Comparação	$C_{\max}$ (R,S)-met./ $C_{\max}$ R-met.	AUC_{0-t} (R,S)-met./ AUC_{0-t} R-met.
Esquema I x Esquema II	0,444755	0,444755
Esquema I x Esquema III	0,003380*	0,003380*
Esquema II x Esquema III	0,085429	0,085429
Análise post hoc	III>II>I	III>II>I

*considerara-se diferença significativa para $p < 0,05$

Tabela 11: Resultados do teste de análise de variância (ANOVA) para a razão entre $C_{\max}$ e AUC_{0-t} de (R,S)-metoprolol e de S-metoprolol obtidos nos períodos 1, 2 e 3 do estudo farmacocinético expressos em valores de p.

Comparação	$C_{\max}$ (R,S)-met./ $C_{\max}$ R-met.	AUC_{0-t} (R,S)-met./ AUC_{0-t} R-met.
Esquema I x Esquema II	0,965952	0,965952
Esquema I x Esquema III	0,001193*	0,001193*
Esquema II x Esquema III	0,002639*	0,002639*
Análise post hoc	III>I,II	III>I,II

*considerara-se diferença significativa para $p < 0,05$

A comparação dos valores de $t_{\max}$ (tempo necessário para atingir a concentração plasmática máxima após administração do fármaco) obtidos para (R,S)-metoprolol (Tabela 3) indica que a estratégia empregada para

simular diferentes velocidades de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica foi eficaz, pois os três esquemas apresentaram diferentes valores para este parâmetro. O esquema I apresentou o menor valor de $t_{\max}$ e simulou uma rápida liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, enquanto que o esquema III apresentou o maior valor de $t_{\max}$ e simulou uma liberação mais lenta do fármaco a partir da forma farmacêutica.

A comparação entre os três esquemas utilizados por meio dos parâmetros $C_{\max}$ e ASC_{0-t} de (R,S)-metoprolol, (R)-metoprolol e (S)-metoprolol apontou a presença de diferenças significativas entre eles. Apenas não foram observadas diferenças significativas entre os esquemas I e II para o parâmetro $C_{\max}$ de (R,S)-metoprolol e $C_{\max}$ de (R)-metoprolol, e entre os esquemas I e III para o parâmetro ASC_{0-t} de (R,S)-metoprolol. O esquema III apresentou valores menores de $C_{\max}$ em relação aos esquemas I e II tanto para o metoprolol total quanto para os enantiômeros. Os esquemas I e II foram equivalentes em relação ao $C_{\max}$ de (R,S)-metoprolol e de (R)-metoprolol, mas diferentes em relação ao $C_{\max}$ de (S)-metoprolol (o esquema I apresentou $C_{\max}$ deste enantiômero menor que o esquema II). Na comparação dos esquemas pelo parâmetro de ASC_{0-t} , observou-se que o II apresentou os maiores valores de ASC_{0-t} tanto para o metoprolol total quanto para seus enantiômeros. Para os dois enantiômeros observou-se também que a ASC_{0-t} do esquema III foi inferior à do esquema I, enquanto que para o metoprolol total não houve diferença significativa para ASC_{0-t} entre os esquemas I e III.

Foram analisadas também as razões entre os valores de $C_{\max}$ e ASC_{0-t} de (R,S)-metoprolol e cada um de seus enantiômeros.

A análise da razão entre $C_{\max}$ de metoprolol total e $C_{\max}$ de R-metoprolol ($C_{\max} \text{ (R,S)-metoprolol} / C_{\max} \text{ R-metoprolol}$), indicou que os esquemas I e II, e II e III foram semelhantes, enquanto que os esquemas I e III foram estatisticamente diferentes, sendo que a relação entre os valores de $C_{\max}$ foi menor no esquema I e maior no esquema III ($\text{III} > \text{II} > \text{I}$). A análise da razão entre $C_{\max}$ de metoprolol total e $C_{\max}$ de S-metoprolol ($C_{\max} \text{ (R,S)-metoprolol} / C_{\max} \text{ S-metoprolol}$) indicou que os esquemas I e II foram semelhantes, e diferentes do esquema III. Estas diferenças podem ser visualizada pela aproximação

entre as curvas de decaimento plasmáticos dos enantiômeros (R)- e (S)-metoprolol observadas para o esquema III (Figuras 2, 3 e 4).

A análise da razão entre ASC_{0-t} de metoprolol total e seus enantiômeros indicou as mesmas diferenças observadas para C_{max} .

A avaliação dos resultados indica farmacocinética enantiosseletiva para o metoprolol, influenciada pela velocidade de entrada do fármaco no organismo.

2.3 Intercambialidade entre genéricos

Nos ensaios de bioequivalência, o medicamento genérico, ou similar, é comparado com o medicamento referência em um estudo cruzado, mas não é comparado com outros genéricos ou similares do mercado. Desta forma, podemos afirmar que todo medicamento genérico ou similar é intercambiável com o medicamento de referência, mas não temos informações sobre a intercambialidade de um genérico com outro genérico ou com um similar. Entretanto, é comum que os pacientes substituam não apenas medicamento de referência pelo genérico ou similar correspondente, mas também um genérico por outro genérico, ou um genérico por um similar. Adicionalmente, à medida que aumenta o número de medicamentos genéricos e similares disponíveis no mercado, a probabilidade destas substituições também aumenta. Consequentemente, tendo em vista que o medicamento referência e os vários medicamentos genéricos e similares disponíveis podem ser usados intercambiavelmente, surge o interesse e a necessidade de avaliar a segurança destas substituições.

A intercambialidade entre os vários genéricos e similares poderia ser garantida se cada novo genérico ou similar introduzido no mercado fosse submetido a ensaios de bioequivalência comparando-o não apenas ao referência, mas também a todos os genéricos e similares previamente registrados. Este procedimento, porém, é impraticável dos pontos de vista ético, técnico e financeiro. Desta maneira, adquire interesse a possibilidade de se determinar bioequivalência entre dois produtos que não tenham sido

testados entre si, mas tenham sido testados com um referência comum, embora em ensaios separados (Anderson, Hauck, 1996).

Técnicas de metanálise são amplamente empregadas em investigações clínicas, e combinam resultados de estudos realizados separadamente, mas que abordam questões de investigação semelhantes, possibilitando sua análise como se fossem resultados de um único grande estudo. Pode-se definir metanálise como um procedimento estatístico que integra os resultados de vários estudos independentes (Naylor, 1997).

Chow e Liu (1997) desenvolveram um método de metanálise baseado em bioequivalência média para realizar comparações entre medicamentos genéricos com base em dados experimentais de ensaios de bioequivalência independentes em que estes medicamentos foram comparados ao mesmo medicamento referência. A aplicação deste método possibilitaria não apenas obter uma visão geral da bioequivalência entre vários genéricos e similares, mas também monitorar seu desempenho enquanto estão no mercado.

2.3.1 Emprego de metanálise para avaliação da intercambialidade entre medicamentos

A pesquisa descrita neste item foi desenvolvida por Simone Grigoletto Schramm como parte de seu doutorado sob orientação da autora e colaboração da Profa. Chang Chiann (IME-USP). O texto a seguir foi adaptado de:

⇒ Schramm SG. *Emprego de meta-análise para avaliação da intercambialidade entre medicamentos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2008. (<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-01122014-114309/pt-br.php>).*

Em 2007, quando este estudo foi realizado, existiam, no mercado brasileiro, 17 medicamentos genéricos e similares de cápsulas contendo 500 mg de amoxicilina. A amoxicilina é um antibiótico bactericida de amplo espectro largamente empregado no tratamento de bronquite, doença gonocócica,

faringite bacteriana, otite média aguda, sinusite e infecções do trato biliar e do trato geniturinário, entre outras.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a aplicabilidade do método de metanálise proposto por [Chow & Liu \(1997\)](#) na determinação da intercambialidade entre três medicamentos similares contendo 500 mg de amoxicilina na forma de cápsulas. Foram realizados três ensaios de bioequivalência:

- ⇒ ensaio 1: comparou cápsulas contendo 500 mg de amoxicilina produzidas por Laboratório Indústria Química do Estado de Goiás - Iquego (produto teste 1 - T1) e por Glaxo SmithKline Beecham (produto referência 1 - R1);
- ⇒ ensaio 2: comparou cápsulas contendo 500 mg de amoxicilina produzidas por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica Ltda (produto teste 2 - T2) e por Glaxo SmithKline Beecham (produto referência 2 - R2);
- ⇒ ensaio 3: comparou cápsulas contendo 500 mg de amoxicilina produzidas por Fundação Ezequiel Dias - FUNED (produto teste 3 - T3) e por Glaxo SmithKline Beecham (produto referência 3 - R3).

Para os ensaios 1, 2 e 3 foram selecionados, respectivamente, 25 voluntários sadios do sexo masculino, 26 voluntários sadios de ambos os sexos, e 24 voluntários sadios de ambos os sexos. Os três ensaios foram abertos, cruzados e aleatórios, com administração dos medicamentos em jejum de pelo menos oito horas e manutenção do jejum por mais quatro horas após administração. Foram coletadas amostras de sangue em tubos contendo heparina 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00 e 8:00 horas após a administração dos produtos. As amostras de sangue foram centrifugadas, e o plasma obtido foi transferido a tubos de polipropileno, em duplicata, e mantido congelado a -80°C até a realização das análises para quantificação do fármaco.

A determinação das concentrações de amoxicilina nas amostras de plasma foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodos (DAD), após pré-preparo das amostras por extração em fase sólida. O cefadroxil foi escolhido como padrão interno. A validação do

método bioanalítico foi realizada por meio da determinação de especificidade, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade conforme estabelecido pela Anvisa ([Brasil, 2003d](#)).

Após a quantificação da amoxicilina nas amostras de plasma provenientes da etapa clínica, foram construídas as curvas de concentração plasmática em função do tempo para os produtos teste e referência de cada ensaio de bioequivalência, e calculados os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ (concentração plasmática máxima que o fármaco atinge após a administração), $t_{\max}$ (tempo necessário para $C_{\max}$), ASC_{0-t} (área parcial sob a curva de concentração plasmática em função do tempo), ASC_{0-inf} (área total sob a curva de concentração plasmática em função do tempo); $t_{(1/2)el}$ (meia-vida de eliminação plasmática do fármaco) e k_{el} (constante de velocidade de eliminação do fármaco) ([Ritschel, Kearns, 2009](#); [Shargel *et al.*, 2005](#)). Os valores de $C_{\max}$ e ASC_{0-t} , parâmetros empregados na avaliação da bioequivalência, são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores médios dos parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ e ASC_{0-t} obtidos após administração de produtos teste e referência a voluntários sadios em três estudos de bioequivalência de cápsulas contendo 500 mg de amoxicilina.

Ensaio	Produto	$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	ASC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	$\ln C_{\max}$	$\ln ASC_{0-t}$
1	R1	5,37	15,59	1,63	2,71
	T1	5,30	15,49	1,60	2,69
2	R2	6,54	21,04	1,80	3,00
	T2	6,55	20,71	1,81	2,98
3	R3	6,15	19,41	1,76	2,94
	T3	5,56	17,32	1,67	2,82

Os testes estatísticos de análise de variância (Anova) indicaram ausência de efeitos período, sequência e produto nos ensaios 1 e 2, e ausência de efeitos período e sequência no ensaio 3. Foi detectado efeito produto no ensaio 3 para o parâmetro ASC_{0-t} . Os intervalos de confiança 90% (IC90%) para C_{max} e ASC_{0-t} obtidos nos três ensaios são apresentados na Tabela 13. Todos estão dentro dos limites estabelecidos de 80 a 125%, confirmando a bioequivalência entre cada produto teste e o produto referência.

Tabela 13: Intervalos de confiança 90% (IC90 %) para as relações entre os parâmetros C_{max} e ASC_{0-t} obtidos após administração dos produtos teste e referência nos três ensaios de bioequivalência realizados.

	Intervalo de confiança 90% (%)	
	C_{max}	ASC_{0-t}
Ensaio 1	90-104	92-104
Ensaio 2	93-111	91-106
Ensaio 3	82-102	83-95

A metanálise foi executada conforme método estabelecido por [Chow & Liu \(1997\)](#), baseado nas seguintes suposições:

- ⇒ todos os ensaios incluídos na metanálise foram realizados segundo o mesmo delineamento cruzado, com duas sequências e dois períodos;
- ⇒ a variabilidade interindividual é a mesma em todos os ensaios;
- ⇒ a variabilidade intraindividual é a mesma em todos os ensaios.

Inicialmente, foi necessário testar a hipótese H_0 de homogeneidade entre os produtos de referência usados nos três ensaios, contra a hipótese alternativa H_1 de não homogeneidade entre os três produtos referência. A hipótese nula de homogeneidade entre os produtos referência não foi rejeitada. Como o teste estatístico indicou que os três produtos referência são homogêneos, foi possível combinar os dados de todos os ensaios para

aplicar a metanálise. Os resultados da metanálise são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Intervalos de confiança obtidos por meio de metanálise para as comparações entre os produtos teste 1,2 e 3.

	Intervalo de confiança 90% (%)	
	$C_{\max}$	ASC_{0-t}
T1 x T2	84-107	91-109
T1 x T3	83-107	83-100
T2 x T3	79-102*	83-100

*ausência de bioequivalência

Os resultados da metanálise confirmaram a bioequivalência entre os produtos teste 1 e teste 2 e entre os produtos teste 1 e teste 3. Entretanto, a comparação entre os produtos teste 2 e teste 3 gerou intervalo de confiança 90% (IC90%) fora dos limites estabelecidos de 80 a 125% para $C_{\max}$, caracterizando ausência de bioequivalência entre estas formulações. Pelo fato da amoxicilina ser um fármaco de ampla faixa terapêutica, e pela proximidade do limite inferior do IC90% calculado (79%) com o limite estabelecido (80%), é improvável que a substituição do produto teste 2 pelo produto teste 3, ou vice-versa, traga consequências para o paciente em termos de perda de eficácia. Entretanto, uma vez que o estudo confirmou que existe a possibilidade de dois genéricos (ou dois similares, ou um genérico e um similar) não serem bioequivalentes e intercambiáveis entre si devemos considerar que existe um risco para a população na substituição entre genéricos e/ou similares que contenham fármacos de estreita faixa terapêutica. A técnica de metanálise pode ser usada para avaliar a bioequivalência entre genéricos e/ou similares do mercado nacional, a partir dos dados dos ensaios de bioequivalência realizados pelos fabricantes destes medicamentos para obtenção de seu registro. Isto traria grande contribuição no sentido de garantir a eficácia e a segurança dos tratamentos, mesmo com substituição de medicamentos.

3

Correlação *in vitro-in vivo*

3.1 Aspectos gerais

O termo correlação é empregado frequentemente na área de ciências farmacêuticas e afins para descrever uma relação entre variáveis. Matematicamente, o termo correlação indica interdependência entre dados quantitativos ou qualitativos, ou relação entre variáveis mensuráveis ou classificáveis. Do ponto de vista biofarmacêutico, a correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) refere-se à relação entre uma característica de liberação *in vitro* e um parâmetro de biodisponibilidade *in vivo*, e pode ser definida como um modelo matemático preditivo que descreve uma relação racional entre uma propriedade *in vitro*, ou físico-química, de uma forma farmacêutica e uma propriedade *in vivo*, ou biológica, desta mesma forma farmacêutica. Em geral, a propriedade *in vitro* é a velocidade ou extensão da dissolução ou liberação do fármaco, enquanto que a resposta *in vivo* é a concentração plasmática do fármaco ou a quantidade absorvida (U.S. Department of Health and Human Services, 1997; Recio et al, 1999; Brasil, 2002; Emami, 2006; Cardot et al., 2007).

Já em 1902 surgiram relatos de tentativas de avaliação da desintegração de formas farmacêuticas sólidas orais por meio da observação de seu comportamento em água, pois a influência da forma farmacêutica sobre a absorção de fármacos era conhecida (Lowenthal, 1972; Ganderton, 1978). Em 1950, a Farmacopeia Americana incluiu, em algumas monografias, o teste de desintegração para comprimidos e, em 1970, o teste de dissolução. A dissolução do fármaco a partir de formas farmacêuticas sólidas é um processo muito importante para sua biodisponibilidade e, desta forma, os ensaios de dissolução devem ser entendidos como uma análise de controle de qualidade realizada na avaliação de um lote de produção. O ensaio de dissolução *in vitro* é realizado em equipamentos apropriados e as especificações farmacopeicas norteiam a aprovação ou rejeição de um lote (Elkoshi, 1999).

Os ensaios de dissolução constituem importante ferramenta no desenvolvimento de novas formulações (Williams et al., 1991; Dredán et al., 1996; Goracinova et al., 1996) e na garantia de qualidade dos medicamentos (Steinijans et al., 1988). A dissolução *in vitro* de um determinado

medicamento pode fornecer informações quanto ao comportamento *in vivo* do fármaco e também quanto à homogeneidade entre os lotes e entre as unidades farmacotécnicas de um mesmo lote. Pode ser utilizada para prever o impacto das mudanças de composição, processo ou local de produção no desempenho do produto. Estes testes adquirem maior relevância quando podem ser correlacionados com dados obtidos em testes *in vivo*, o que permite prever o comportamento de uma formulação específica no organismo humano a partir de dados obtidos *in vitro* (Uppoor, 2001; Emami, 2006; Cardot *et al.*, 2007).

A biodisponibilidade é dependente da velocidade com que ocorrem os processos da fase biofarmacêutica: liberação a partir de uma forma farmacêutica e dissolução do fármaco (Aulton, 2001). Desse modo, é possível relacionar, em algumas situações, o perfil de dissolução de um fármaco com o seu perfil de absorção. Particularmente, se os dados da dissolução *in vitro* são relacionados com os dados *in vivo*, os limites *in vitro* podem ser utilizados para o controle da biodisponibilidade de um produto teste quando comparado a um produto de referência com biodisponibilidade conhecida. Neste contexto, a bioequivalência de dois produtos pode ser assegurada *in vitro* (Elkoshi, 1999).

Neste sentido, diversos trabalhos tentaram estabelecer correlação entre parâmetros da dissolução *in vitro* e parâmetros relativos aos estudos de biodisponibilidade *in vivo* (correlações *in vitro* – *in vivo* ou CIVIV) (Bramanti, 1973; Avico *et al.*, 1976; Grdinic *et al.*, 1979; Aoyagi *et al.*, 1982; Yau, Meyer, 1983; Dey *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1990; Drewe, Guitard, 1993; Hayashi *et al.*, 1995; Elkoshi, 1999).

Nesta linha de pesquisa, nosso grupo publicou trabalhos que descrevem o emprego de métodos de dissolução na avaliação de medicamentos:

- ⇒ ***Porta V, Yamamichi É, Storpirtis S. Avaliação biofarmacêutica in vitro de cápsulas de fluconazol. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2002; 38:333-43. (<http://www.revistas.usp.br/rbcf/article/view/43800/47422>);***
- ⇒ ***Aguiar G, Faria LG, Ferraz HG, Serra CHR, Porta V. Avaliação biofarmacotécnica in vitro de formas farmacêuticas sólidas contendo***

doxiciclina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005; 41:451-8. (<http://www.revistas.usp.br/rbcf/article/view/44082/47703>);

- ⇒ Mourão SC, Silva C, Bresolin TMB, Serra CHR, Porta V. Dissolution parameters for sodium diclofenac-containing hypromellose matrix tablete. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010; 386:201-7. (http://ac.els-cdn.com/S0378517309008242/1-s2.0-S0378517309008242-main.pdf?_tid=d19a55e0-c021-11e3-99b7-00000aacb35e&acdnat=1397073903_bff10668bc973d6300a0d4c2bfc75f49)

3.2 Obtenção de correlações *in vitro-in vivo* (CIVIV)

Com base nos tipos de dados usados para estabelecer a relação, é possível definir quatro níveis de correlação (U.S. Department of Health and Human Services, 1997). O nível da correlação indica sua capacidade de prever a curva completa de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo resultante da administração de um determinado produto farmacêutico (U.S. Department of Health and Human Services, 1997; Emami, 2006; Cardot *et al.*, 2007):

- ⇒ Correlação nível A: é o nível mais alto de correlação e representa uma relação ponto a ponto entre a velocidade de dissolução *in vitro* e a velocidade de entrada *in vivo* do fármaco a partir da forma farmacêutica (U.S. Department of Health and Human Services, 1997). Em uma correlação linear, as curvas de dissolução *in vitro* e de entrada *in vivo* são sobreponíveis ou tornam-se sobreponíveis pelo uso de um fator de escala. Quando, no desenvolvimento da correlação, essas curvas não forem sobreponíveis, algumas estratégias podem ser adotadas, como a otimização do ensaio de dissolução pela variação das condições experimentais (Dunne *et al.*, 1999). Correlações não lineares, embora pouco comuns, podem ser apropriadas (U.S. Department of Health and Human Services, 1997; Cardot *et al.*, 2007). O objetivo da correlação de nível A é prever todo o desempenho *in vivo* de um medicamento a partir de dados *in vitro*. Neste contexto, a correlação se refere a uma relação entre a dissolução *in vitro* de uma forma farmacêutica e uma resposta *in vivo*,

como a concentração sistêmica, e a curva de dissolução pode ser usada como substituto para o desempenho *in vivo* (Cardot *et al.*, 2007). Assim, alterações pós-registro podem ser justificadas sem necessidade de estudos adicionais *in vivo* (Emami, 2006).

- ⇒ Correlação nível B: utiliza o princípio da análise estatística de momentos. Nesta correlação, o tempo médio de dissolução *in vitro* (MDT_{vitro}) do produto é comparado ao tempo médio de residência *in vivo* (MRT) ou ao tempo médio de dissolução *in vivo* (MDT_{vivo}). Embora a correlação de nível B use todos os dados *in vivo* e *in vitro*, ela não é considerada uma correlação ponto a ponto, uma vez que curvas diferentes podem produzir valores semelhantes de MRT (U.S. Department of Health and Human Services, 1997). Como a correlação de nível B não reflete as concentrações sistêmicas reais, não pode ser usada para justificar alterações pós-registro e não é aceita pelas agências reguladoras para avaliar modificações da formulação ou alterações de local de fabricação e de fornecedor de matéria-prima ou excipientes (Emami, 2006; Cardot *et al.*, 2007).
- ⇒ Correlação nível C: neste nível de correlação, um ponto de dissolução (por ex., $t_{50\%}$, tempo para dissolver 50% do fármaco presente na forma farmacêutica) é comparado a um parâmetro farmacocinético, como área sob a curva de concentração sistêmica em função do tempo (ASC), concentração plasmática máxima (C_{max}) ou tempo para alcançar C_{max} (t_{max}). Assim, ela representa uma relação de ponto único e não reflete toda a curva de decaimento plasmático (U.S. Department of Health and Human Services, 1997). É considerado o nível mais fraco de correlação e apresenta limitações na previsão do desempenho *in vivo*, não podendo ser usada para justificar alterações pós-registro. Pode ser útil no desenvolvimento de formulações (Emami, 2006; Cardot *et al.*, 2007).
- ⇒ Correlação nível C múltipla: relaciona um ou vários parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , AUC) à quantidade de fármaco dissolvido em vários pontos do perfil de dissolução. Segundo alguns autores, pode ser usada para justificar bioisenção, da mesma forma que a

correlação de nível A, mas não é aceita pelas agências reguladoras para este fim (Emami, 2006; Cardot *et al.*, 2007).

Correlações classificatórias qualitativas não são consideradas úteis para fins regulatórios. Este tipo de correlação é normalmente denominado correlação nível D (Emami, 2006).

Uma correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) é, portanto, baseada na obtenção de dados *in vitro* e *in vivo* relativos a um produto farmacêutico.

Para obtenção de uma adequada correlação *in vitro-in vivo*, alguns fatores devem ser considerados. Inicialmente, é importante que a etapa limitante da absorção do fármaco seja o processo de dissolução. Com o objetivo de correlacionar dissolução *in vitro* e biodisponibilidade *in vivo* de medicamentos administrados por via oral, Amidon e colaboradores (1995) propuseram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), segundo o qual os fármacos podem ser divididos em quatro classes, de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade:

- ⇒ Classe I: fármacos de alta permeabilidade e alta solubilidade;
- ⇒ Classe II: fármacos de alta permeabilidade e baixa solubilidade;
- ⇒ Classe III: fármacos de baixa permeabilidade e alta solubilidade;
- ⇒ Classe IV: fármacos de baixa permeabilidade e baixa solubilidade.

Com base no SCB, é possível esperar uma correlação *in vitro-in vivo* para fármacos pertencentes à classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), e para sistemas de liberação controlada de fármacos, uma vez que, nestes dois casos, a etapa limitante do processo de absorção do fármaco é a dissolução (Amidon *et al.*, 1995).

Os dados *in vitro* para desenvolvimento de CIVIV são obtidos por meio de ensaios de dissolução que avaliam a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica e refletem todos os fenômenos implícitos na formulação (tipo de formulação, fármaco, excipientes e processo de fabricação) (Azarmi *et al.*, 2007; Cardot *et al.*, 2007). Existem diversos ensaios de dissolução que podem ser usados para gerar os dados *in vitro*. As curvas de dissolução *in vitro* dependem das características da formulação, das características do fármaco, e do aparato e condições de dissolução empregados. São

expressas como porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo, e devem atingir 100% no tempo infinito. Vários parâmetros podem ser calculados a partir destas curvas, como tempo médio de dissolução, tempo para dissolver 10, 50 ou 90% do fármaco presente na forma farmacêutica, velocidade de dissolução e eficiência de dissolução (Cardot *et al.*, 2007).

Do ponto de vista da correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV), a dissolução funciona como substituto da biodisponibilidade. Para que os dados de dissolução possam ser usados na CIVIV, eles devem ser reprodutíveis e obtidos a partir de condições pré-definidas (Pillay, Fassihi, 1998). Geralmente, deve ser escolhido um método de dissolução capaz de diferenciar entre as formulações e que reproduza seu comportamento *in vivo* (Emami, 2006). Entretanto, fatores fisiológicos que influenciam a liberação do fármaco nem sempre podem ser reproduzidos *in vitro* (Cardot *et al.*, 2007). Quatro tipos de aparatos de dissolução são geralmente usados na obtenção de CIVIV, todos descritos pela farmacopeia americana - USP: cesta (Aparato 1), pá (Aparato 2), cilindros recíprocos (Aparato 3) e célula de fluxo (Aparato 4) (Emami, 2006). Diversos meios de dissolução podem ser empregados, desde o mais simples, como HCl 0,1 N, aos mais complexos, como fluidos intestinais simulados (FeSSIF, FaSSIF), adicionados ou não de enzimas e surfactantes (Emami, 2006; Cardot *et al.*, 2007). Parâmetros relacionados ao ensaio de dissolução, como aparato, meio e velocidade de agitação podem ser alterados para facilitar a obtenção da CIVIV (Banakar, 1992).

Uma vez que o método de dissolução esteja desenvolvido, as condições deverão ser mantidas para todas as formulações usadas no desenvolvimento da correlação (U.S. Department of Health and Human Services, 1997; Emami, 2006).

Os dados *in vivo* são obtidos a partir de estudos de biodisponibilidade em indivíduos sadios. Um ponto importante a considerar é a coleta de amostras na fase de absorção do fármaco, que deve ser bem caracterizada para a obtenção de CIVIV nível A. Outros fatores que influenciam na absorção devem ser controlados, tais como ingestão de alimentos, de álcool e de bebidas ou alimentos contendo xantinas, fumo, e uso de medicamentos (Emami, 2006; Cardot *et al.*, 2007).

A CIVIV deve ser submetida a validação interna e externa, para garantir sua aplicabilidade a diversas formulações (U.S. Department of Health and Human Services, 1997; Emami, 2006).

O desenvolvimento de uma correlação *in vitro-in vivo* compreende basicamente três passos (U.S. Department of Health and Human Services, 1997):

1. desenvolvimento de pelo menos três formulações de liberação controlada apresentando três diferentes velocidades de liberação do fármaco;
2. obtenção das curvas de dissolução do fármaco e das curvas de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo para as formulações desenvolvidas no primeiro passo;
3. estimativa da absorção ou dissolução *in vivo* usando técnica adequada de deconvolução (Wagner-Nelson, Loo-Riegelman ou deconvolução numérica).

A comparação entre os perfis de dissolução das formulações desenvolvidas pode ser feita pela aplicação dos fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2) (Moore, Flanner, 1996; Emami, 2006):

$$f_1 = \left\{ \left[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t| \right] / \left[\sum_{t=1}^n R_t \right] \right\} \times 100$$

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

onde:

n =número de pontos de coleta;

R_t =valor de dissolução do produto referência no tempo t ;

T_t =valor de dissolução do produto teste no tempo t .

Os perfis de dissolução são considerados diferentes para valores de f_1 maiores que 15 e de f_2 menores que 50 (Moore, Flanner, 1996; Emami, 2006).

Parâmetros relativos à cinética de dissolução são obtidos pela aplicação de modelos cinéticos aos dados de dissolução obtidos. Podem ser testados os modelos de ordem zero, de primeira ordem, de Higuchi, de Hixson–Crowell e de Korsmeyer–Peppas, entre outros, selecionando-se aquele que apresentar o mais alto valor de coeficiente de determinação (r^2) para explicar a cinética de dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica específica (Hixson & Crowell, 1931; Higuchi, 1963; Korsmeyer, Peppas, 1981; Costa, Lobo, 2001; Tanaka *et al.*, 2005). Outro parâmetro que pode ser útil na obtenção de CIVIV é a eficiência de dissolução (Khan, Rhodes, 1975).

O tempo médio de dissolução *in vitro* (MDT_{vitro}), empregado para obtenção de CIVIV de nível B, é calculado da seguinte forma (U.S. Department of Health and Human Services, 1997; Emami, 2006):

$$MDT_{vitro} = \int_0^{\infty} (M_{inf} - M(t)) dt / M_{inf}$$

onde:

M_{inf} = quantidade total de fármaco dissolvido a partir da forma farmacêutica no tempo infinito;

$M(t)$ = quantidade de fármaco dissolvido a partir da forma farmacêutica no tempo t .

A dissolução e a absorção *in vivo* podem ser caracterizadas a partir das curvas de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo após administração das formulações desenvolvidas a voluntários sadios em ensaios de biodisponibilidade.

As CIVIV nível A empregam dados de absorção expressos como porcentagem da dose absorvida em função do tempo, calculada por meio de técnicas de deconvolução como os métodos de Wagner-Nelson, Loo-

Riegelman ou a deconvolução numérica. Segundo o método de Wagner-Nelson, aplica-se a equação a seguir para obter a fração de fármaco absorvido no tempo t (F_t) (Emami, 2006):

$$F_t = \frac{C_t + k_{el} \int_0^t C dt}{k_{el} \int_0^\infty C dt}$$

onde:

C_t =concentração sistêmica do fármaco no tempo t ;

k_{el} =constante de velocidade de eliminação do fármaco.

O método de Loo-Riegelman exige dados de concentração plasmática após administração oral e intravascular do fármaco a um mesmo indivíduo, e F_t é dado por (Emami, 2006):

$$F_t = \frac{C_t + k_{10} \int_0^t C dt + (X_p)_t / V_c}{k_{10} \int_0^\infty C dt}$$

onde, adicionalmente aos símbolos previamente descritos:

$(X_p)_t$ =quantidade de fármaco no compartimento periférico em função do tempo após administração oral;

V_c =volume aparente do compartimento central;

k_{10} =constante de velocidade aparente de eliminação do fármaco a partir do compartimento central, estimada após administração intravascular do fármaco.

Os métodos de Wagner-Nelson e Loo-Riegelman são modelo-dependentes, ao contrário da deconvolução numérica, que é um método modelo-independente e que, da mesma forma que o de Loo-Riegelman,

também exige dados de concentração plasmática após administração oral e intravascular do fármaco a um mesmo indivíduo:

$$C_{VO_{in}} = \frac{1}{D_{IV}} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta A_i}{\Delta t_i} * \Delta ASC_{IV}^{(tn-ti-1)}_{(tn-ti)}$$

onde

$C_{VO_{in}}$ =concentração sistêmica do fármaco no tempo n após administração oral;

D_{IV} =dose administrada por via intravascular;

$\Delta A / \Delta t$ =velocidade de absorção do fármaco;

ΔASC_{IV} =fração de área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo após administração intravascular.

Diversos parâmetros farmacocinéticos podem ser obtidos a partir das curvas de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo para desenvolver correlações de nível B e C. Tempo médio de residência (MRT) e tempo médio de dissolução *in vivo* (MDT*vivo*) são usados em correlações de nível B ([Emami, 2006](#)):

$$MRT = \frac{ASMC}{ASC}$$

onde:

$ASMC$ =área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo de primeiro momento;

ASC =área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo.

$$MDT_{vivo} = MRT_{FFsólida} - MRT_{FFsolução}$$

onde:

$MRT_{FFsólida}$ = tempo médio de residência do fármaco após administração de forma farmacêutica sólida por via oral;

$MRT_{FFsolução}$ = tempo médio de residência do fármaco após administração de solução por via oral.

Concentração plasmática máxima (C_{max}), tempo para atingir C_{max} (t_{max}) e área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo (ASC) são usados em correlações *in vitro-in vivo* (CIVIV) de nível C.

As CIVIV devem ser validadas interna e externamente para garantir sua aplicabilidade. A validação compreende o emprego da correlação para prever o desempenho *in vivo* de uma formulação a partir de seus dados de dissolução *in vitro*. O desempenho *in vivo* previsto é então comparado ao desempenho *in vivo* real, observado após administração das formulações a voluntários em estudo de biodisponibilidade, e os desvios entre o desempenho *in vivo* real e o desempenho *in vivo* previsto são calculados. A validação interna emprega os dados de dissolução *in vitro* e concentração *in vivo* das próprias formulações usadas no desenvolvimento da correlação, enquanto que para a validação externa são usados conjuntos de dados adicionais obtidos, por exemplo, de formulações disponíveis comercialmente (Emami, 2006).

3.3 Desenvolvimento de correlação *in vitro-in vivo* para comprimidos de liberação modificada contendo fármaco de classe biofarmacêutica II

A pesquisa descrita neste item foi desenvolvida por Samanta Cardozo Mourão como parte de seu doutorado sob orientação da autora e co-orientação da Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra (FCF-USP), e por Rafael da Silva Melo como parte de seu mestrado, também sob orientação da autora. O texto a seguir foi adaptado de:

⇒ *Mourão SC. Correlação *in vitro-in vivo* para formas farmacêuticas sólidas de liberação modificada contendo diclofenaco de sódio [tese]. São Paulo:*

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2009.
(<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-06052010-095135/pt-br.php>).

e:

⇒ *Melo RS. Validação externa de correlação in vitro-in vivo para comprimidos comerciais de liberação controlada de diclofenaco de sódio [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2012.*
(<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-12092012-102937/pt-br.php>).

O diclofenaco de sódio é um fármaco pertencente à classe biofarmacêutica II, em função de sua baixa solubilidade em meio ácido. É um potente anti-inflamatório não esteroide com propriedades analgésica e antipirética. Em função das características farmacocinéticas favoráveis, como tempo de meia-vida curto e altos valores de concentração plasmática máxima, o diclofenaco de sódio foi escolhido como fármaco modelo de classe biofarmacêutica II no presente estudo, que teve por objetivo estabelecer e validar correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) para formulações de liberação controlada contendo diclofenaco de sódio, por meio da realização de ensaios de dissolução *in vitro* e de ensaios de biodisponibilidade *in vivo*.

Este projeto compreendeu o desenvolvimento de três formulações de comprimidos matriciais de liberação controlada contendo diclofenaco de sódio (F1, F2, F3), a realização de ensaios de dissolução para obtenção de curvas de dissolução *in vitro* do diclofenaco a partir de F1, F2, F3 e de duas formulações comercializadas no Brasil (T1, Voltaren® Retard 100 mg, comprimidos de liberação modificada, e T2, Diclofenaco sódico Ranbaxy 100 mg, comprimidos de liberação modificada), e a realização de estudos de biodisponibilidade para obtenção de curvas de concentração sistêmica de diclofenaco em função do tempo a partir de uma formulação referência (Voltaren® 50 mg, comprimidos de liberação convencional, R), de F1, F2 e F3 e de T1 e T2.

Os comprimidos matriciais de liberação controlada F1, F2 e F3, contendo 100 mg de diclofenaco de sódio, foram preparados por granulação via

úmida, utilizando diferentes concentrações de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como base do sistema matricial.

As formulações F1, F2, F3, T1 e T2 foram submetidas a ensaios de dissolução em diversas condições, empregando-se os aparatos USP 2, 3 e 4, meios de dissolução de pH entre 1,2 e 6,8 a 37°C, diferentes velocidades de agitação ou fluxo e presença ou ausência de âncoras (*sinkers*).

O estudo de biodisponibilidade foi realizado em 12 voluntários sadios, em seis períodos, de forma que seis voluntários receberam quatro formulações, sendo três formulações desenvolvidas (F1, F2 e F3) e a formulação referência (R, Voltaren® 50 mg), e outros seis voluntários receberam duas formulações de comprimidos de liberação controlada contendo 100 mg de diclofenaco de sódio disponíveis no mercado nacional (T1, Voltaren® Retard e T2, Diclofenaco sódico Ranbaxy). Entre os períodos houve um intervalo de *washout* de sete dias, superior a 10 vezes o valor da meia-vida de eliminação do diclofenaco. Os produtos foram administrados aos voluntários pela manhã, após jejum de 8 horas, e ingeridos com auxílio de 200 mL de água. Os voluntários receberam almoço, lanche e jantar padronizados respectivamente quatro, seis e dez horas após a administração dos medicamentos. As coletas de sangue aconteceram nos tempos 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00, 8:00, 9:00, 10:00 e 12:00 horas após a administração dos produtos. As amostras foram centrifugadas e o plasma, mantido congelado a -20°C até a realização do ensaio para quantificação do fármaco.

O diclofenaco presente nas amostras de plasma foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta após pré-tratamento das amostras com acetonitrila para precipitação de proteínas. O fármaco nimesulida foi usado como padrão interno (Su *et al.*, 2003). O método bioanalítico foi validado por meio da determinação dos parâmetros especificidade, recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão e estabilidade (Brasil, 2003d).

Para obtenção da correlação *in vitro-in vivo*, foram determinados os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}$ (concentração sistêmica máxima que o fármaco atinge após a administração), $t_{\max}$ (tempo necessário para $C_{\max}$),

ASC_{0-t} (área sob a curva de concentração sistêmica do fármaco em função do tempo), relativos à absorção do fármaco a partir das formulações administradas (Ritschel, Kearns, 2009; Shargel *et al.*, 2005). A fração absorvida do diclofenaco a partir das formulações F1, F2, F3, T1 e T2 foi obtida pela aplicação do método de deconvolução numérica às curvas de concentração sistêmica em função do tempo (Eddington *et al.*, 1998). As concentrações plasmáticas de diclofenaco obtidas após administração do produto referência Voltaren® 50 mg foram extrapoladas para administração IV, para aplicação no procedimento de deconvolução.

A condição de dissolução mais adequada ao estabelecimento da CIVIV foi obtida com emprego do aparato USP 2, 900 mL de meio de dissolução composto por tampão fosfato pH 6,8, velocidade de agitação de 25 rpm, temperatura de 37°C, e uso de âncoras. Os perfis de dissolução *in vitro* e de absorção *in vivo* dos comprimidos desenvolvidos F1, F2 e F3 são apresentados na Figuras 5 e 6.

Figura 5: Curvas médias de fração dissolvida (FRD) de diclofenaco em função do tempo para os comprimidos F1, F2 e F3 usando aparato 2 (pás), velocidade de agitação de 25 rpm, temperatura de 37°C, 900 mL de meio de dissolução composto por tampão fosfato pH 6,8 e âncoras.

Figura 6: Curvas médias de fração absorvida de diclofenaco em função do tempo após a administração dos comprimidos F1, F2 e F3 aos voluntários sadios.

A Figura 7 ilustra a correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) nível A obtida para os comprimidos matriciais de liberação controlada contendo diclofenaco de sódio, enquanto que as validações interna e externa da correlação são apresentadas nas Figuras 8 e 9.

Figura 7: Correlação *in vitro-in vivo* nível A entre fração absorvida (FAB) e inverso da fração dissolvida (1/FAD) de diclofenaco a partir das formulações F1, F2 e F3.

Figura 8: Comparação entre valores reais e valores previstos de fração absorvida (FAB) de diclofenaco em função do tempo a partir das formulações F1, F2 e F3 (validação interna da CIVIV).

Figura 9: Comparação entre valores reais e valores previstos de concentrações plasmáticas de diclofenaco em função do tempo a partir das formulações T1 (Voltaren® Retard) e T2 (Diclofenaco sódico Ranbaxy) (validação externa da CIVIV).

Foi também estabelecida uma correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) nível C entre fração de diclofenaco dissolvida em 8:00 horas (FRD_{8h}) e sua concentração sistêmica máxima (C_{max}). Esta CIVIV e suas validações interna e externa são apresentadas nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15: Correlação *in vitro-in vivo* nível C entre fração de diclofenaco dissolvida em 8:00 horas (FRD_{8h}) e sua concentração sistêmica máxima (C_{max}) a partir das formulações F1, F2 e F3 e comparação entre valores reais e valores previstos de concentração sistêmica máxima (C_{max}) a partir das formulações F1, F2 e F3 (validação interna da CIVIV).

$C_{\max} = 0,0169 \cdot \text{FRD}_{8h} - 0,6774, R^2 = 0,9473$			
	F1	F2	F3
FRD _{8h} (%)	100.7	88.0	63.1
C _{max} (µg/mL) observada	1.08	0.72	0.42
C _{max} (µg/mL) prevista	1.02	0.81	0.39
Erro de previsão (%)	-5	12	-7

Tabela 16: Comparação entre valores reais e valores previstos de concentração sistêmica máxima (C_{max}) a partir das formulações T1 (Voltaren® Retard) e T2 (Diclofenaco sódico Ranbaxy) (validação externa da CIVIV).

	T1	T2
FRD _{8h} (%)	71.1	95.4
C _{max} (µg/mL) observada	0.81	1.00
C _{max} (µg/mL) prevista	0.52	0.94
Erro de previsão (%)	-35.3	-6.5

Os testes de previsibilidade interna indicaram que a CIVIV de nível A não é capaz de definir com exatidão a absorção de diclofenaco *in vivo*, embora as curvas reais e previstas apresentem-se próximas. A CIVIV de nível C apresentou excelente previsibilidade interna, com desvios entre valores reais e previstos menores que 15%. A CIVIV nível A não apresentou boa previsibilidade externa, enquanto que a CIVIV nível C apresentou previsibilidade externa apenas para o produto Diclofenaco sódico Ranbaxy. É interessante notar que os comprimidos de Diclofenaco sódico Ranbaxy contêm hidroxipropilmetilcelulose em sua composição, podendo ser considerados comprimidos matriciais, como F1, F2 e F3. Assim, pode-se

concluir que a correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) de nível C obtida é válida para comprimidos matriciais de diclofenaco de sódio, podendo ser usada em substituição a ensaios de bioequivalência para este tipo de formulação.

Classificação biofarmacêutica

4.1 Aspectos gerais

Os estudos de bioequivalência, apesar de mais simples que os ensaios clínicos, são, em geral, onerosos e demorados, além de exporem os voluntários sadios a riscos advindos da utilização do medicamento e da retirada de amostras de sangue. Visando reduzir a necessidade deste tipo de estudo, diversas pesquisas vem sendo realizadas com a finalidade de definir testes *in vitro* capazes de prever o comportamento *in vivo* dos medicamentos, tal como ocorre quando existe correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV). Neste sentido, [Amidon e colaboradores \(1995\)](#) propuseram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), com o objetivo de correlacionar dissolução *in vitro* e biodisponibilidade *in vivo* de medicamentos administrados por via oral. Segundo o SCB, os fármacos podem ser divididos em quatro classes, de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade ([Amidon et al., 1995](#)):

- ⇒ classe I - fármacos de alta permeabilidade e alta solubilidade (AP-AS): estes fármacos são rápida e completamente absorvidos, com extensão de absorção maior que 90 %. Contudo, a biodisponibilidade sistêmica destes pode ser limitada devido a biotransformação pré-sistêmica, como nos casos de propranolol e diltiazem. O passo limitante para a absorção de fármacos desta classe é a velocidade de dissolução ou, caso esta seja muito alta, a velocidade de esvaziamento gástrico;
- ⇒ classe II - fármacos de alta permeabilidade e baixa solubilidade (AP-BS): para os fármacos desta classe, a dissolução no trato gastrointestinal é a etapa limitante para o processo de absorção. A variabilidade na absorção destes fármacos pode ser consequência de diferenças entre formulações ou de variáveis fisiológicas, que podem influenciar o processo de liberação dos mesmos a partir da forma farmacêutica;
- ⇒ classe III - fármacos de baixa permeabilidade e alta solubilidade (BP-AS): a permeação do fármaco através da membrana intestinal é a etapa limitante no processo de absorção de fármacos pertencentes a esta classe. A velocidade e extensão de absorção deste grupo de

fármacos podem ser altamente variáveis devido à influência de trânsito gastrointestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana, e não apenas em função de diferenças de formulação;

- ⇒ classe IV - fármacos de baixa permeabilidade e baixa solubilidade (BP-BS): são fármacos que possuem alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção, dificultando sua utilização oral.

As diferenças de biodisponibilidade entre dois equivalentes farmacêuticos podem ser decorrentes de diferenças de dissolução *in vivo*. Entretanto, é improvável que isto ocorra para formas farmacêuticas sólidas que apresentam rápida dissolução em relação à velocidade de esvaziamento gástrico e que contenham princípio ativo de alta permeabilidade, uma vez que, nestas circunstâncias, a dissolução ocorrerá no estômago e o fármaco já estará totalmente dissolvido quando atingir o intestino, onde se dá o processo de absorção. As principais agências regulatórias mundiais como *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA), além da Organização Mundial da Saúde (OMS), tem avaliado a possibilidade de isentar de ensaios de bioequivalência (BE) aqueles medicamentos que se apresentam em formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata, contendo fármaco Classe I do SCB, com rápida dissolução *in vitro*. Nestes casos, testes *in vitro* seriam suficientes para garantir a intercambialidade com o medicamento de referência ([U.S. Department of Health and Human Services, 2000](#)). A Organização Mundial da Saúde (OMS), além de prever a bioisenção para medicamentos contendo fármacos de Classe I, considera esta possibilidade também para medicamentos contendo fármacos Classe II, desde que sejam ácidos fracos com altas solubilidade e taxa de dissolução em pH 6,8 ([Gupta et al., 2006](#)). Também a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabeleceu a possibilidade de bioisenção para alguns medicamentos ([Brasil, 2011](#)). O registro por meio de processo de bioisenção possibilita a diminuição de custos e de tempo de desenvolvimento de genéricos, com evidentes benefícios para o paciente e para o SUS em termos de acesso ao tratamento farmacológico. Traz ainda benefícios do ponto de vista da ética em pesquisa, uma vez que prescinde da realização de ensaios *in vivo*.

Desta forma, o SCB vem sendo usado atualmente para justificar a isenção dos ensaios de bioequivalência (bioisenção) para um determinado medicamento, em função dos resultados dos testes de dissolução *in vitro* e da classe biofarmacêutica do fármaco.

É importante ressaltar que a determinação dos parâmetros de solubilidade e permeabilidade no âmbito do SCB baseia-se não apenas nas características físico-químicas dos fármacos, mas também nas propriedades fisiológicas que controlam a absorção de fármacos por via oral.

Assim, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, fármaco de alta solubilidade é definido como aquele cuja maior dose terapêutica pode ser dissolvida em 250 mL de meio aquoso na faixa de pH de 1 a 7,5, a 37°C. O volume de 250 mL foi estabelecido a partir do volume mínimo de líquido esperado no estômago de um voluntário, em jejum, submetido a um estudo de bioequivalência (BE), cujo protocolo recomenda a administração da forma farmacêutica com um copo de água ([U.S. Department of Health and Human Services, 2000](#)). A permeabilidade refere-se à capacidade de passagem do fármaco através da parede do jejuno humano e inclui a resistência aparente ao transporte de massa através da membrana intestinal. Fármacos de alta permeabilidade são, geralmente, aqueles estáveis nas condições do trato gastrointestinal e que apresentam biodisponibilidade absoluta maior que 90 %, ou aqueles para os quais a permeabilidade foi determinada experimentalmente ([Brasil, 2011](#)).

A determinação da permeabilidade dos fármacos através de membranas do trato gastrointestinal (TGI) contribui para a previsão de sua biodisponibilidade. Existem vários modelos *in vitro* que possibilitam determinação de permeabilidade ([Makhey *et al.*, 1998](#); [Luo *et al.*, 2002](#); [Mariappan *et al.*, 2004](#)). Os primeiros experimentos neste sentido utilizaram tecidos e segmentos de intestino de diferentes espécies animais. Atualmente, novos modelos experimentais vem sendo testados, tais como modelos matemáticos visando correlacionar os resultados de permeabilidade obtidos em animais com os originados em humanos e culturas de células como Caco-2, TC-7, 2/4/A1, MDCK e MDCK-MDR1 ([Balimane *et al.*, 2000](#); [Putnam *et al.*, 2002](#); [Neuhoff *et al.*, 2005](#)). Os modelos utilizando tecido animal para avaliar a permeabilidade intestinal são

empregados desde 1950 (Balimane *et al.*, 2000). Em geral, estes tecidos apresentam constituição semelhante à do epitélio intestinal humano saudável, embora algumas diferenças possam ser observadas de acordo com a espécie animal empregada (Atisook *et al.*, 1990; Karasov *et al.*, 1991; Laboissee *et al.*, 1994). Dentre os tecidos de intestino de animais utilizados, o de porco, além de ser de fácil aquisição e baixo custo, apresenta similaridades anatômicas e biológicas ao intestino humano e tem sido frequentemente utilizado para estudos de mecanismos de transporte e metabolismo de fármacos (Hossain *et al.*, 1990; Pietzonka *et al.*, 2002). Uma restrição para a utilização deste modelo é a dificuldade em obter tecidos viáveis, ou que se mantenham adequados durante os experimentos, uma vez que necessitam de sangue e oxigenação constantes (Pietzonka *et al.*, 2002). Os métodos que empregam porções invertidas de intestino são ideais para o estudo de mecanismos de transporte de fármacos por absorção passiva e transporte ativo, além de possibilitarem o estudo da influência de glicoproteínas-P na cinética de transporte (Balimane *et al.*, 2000). Esta técnica, comparativamente aos modelos com células Caco-2, mostrou-se mais adequada aos estudos de transporte paracelular de fármacos. Todas as técnicas citadas constituem-se atualmente em importantes ferramentas para o estudo de mecanismo e cinética de absorção de fármacos, devido ao baixo custo e à simplicidade de sua aplicação. (Rowland, Woodley, 1981; Barthe *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003).

A colaboração da autora junto à Anvisa, na discussão de aspectos relacionados à bioisenção para registro de medicamentos, resultou na publicação:

⇒ Redigueri CF, Porta V, Nunes DSG, Nunes TM, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: metronidazole. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 100:1618-27. (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.22409/pdf>).

4.2 Determinação de solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB)

A pesquisa descrita neste item foi desenvolvida por Rafael Leal Monteiro Paraíso como parte de seu mestrado sob orientação da autora. O texto a seguir foi adaptado de:

⇒ *Paraíso RLM. Determinação de solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2012. (<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-15072013-160559/pt-br.php>).*

Neste estudo, determinou-se a classe biofarmacêutica dos fármacos anlodipino, fluconazol e fluoxetina. Para atingir este objetivo, os fármacos foram submetidos a ensaios de solubilidade em diferentes meios aquosos, pelo método de *shake-flask*, e a ensaios de permeabilidade em segmento intestinal de rato usando câmara de difusão vertical (célula de Franz) como suporte.

Os ensaios de solubilidade pelo método de *shake-flask* foram conduzidos dispersando-se excesso de amostras dos fármacos em estudo em 20 mL de água deionizada (pH 5,5) e de tampões HCl (pH 1,2), acetato (pH 4,5) e fosfato (pHs 6,8 e 7,5), a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. As misturas foram submetidas a agitação por 72 horas e filtradas em membrana com poro de $0,45 \mu\text{m}$. Ao fim do experimento, o pH das soluções foi medido para identificação de indícios de degradação do fármaco. A concentração dos fármacos nas soluções finais foi determinada por métodos espectrofotométricos, previamente validados. A partir dos resultados obtidos, calcularam-se as relações dose:solubilidade para cada fármaco em cada meio aquoso, considerando-se as maiores dosagens disponíveis no mercado brasileiro (10 mg para anlodipino, 200 mg para fluconazol e 20 mg para fluoxetina). Os resultados são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Valores de solubilidade e de relação dose:solubilidade (D:S) para os fármacos anlodipino, fluconazol e fluoxetina em diferentes meios aquosos a 37°C.

Meio (pH)	anlodipino		fluconazol		fluoxetina	
	Sol. (mg/mL)	D:S (mL)	Sol. (mg/mL)	D:S (mL)	Sol. (mg/mL)	D:S (mL)
1,2	6,94	1,44	14,40	13,88	12,93	1,55
4,5	2,35	4,24	9,16	21,83	44,11	0,45
5,5	2,28	4,38	8,80	22,72	44,36	0,45
6,8	1,10	9,09	8,34	23,98	7,16	2,79
7,5	0,88	11,36	8,22	24,33	5,12	3,91

A permeabilidade dos fármacos em estudo e das substâncias empregadas como controles de alta e baixa permeabilidade (metoprolol e fluoresceína, respectivamente) foi avaliada com base no seu fluxo através de segmentos intestinais de ratos isolados e contidos em câmaras de difusão vertical (células de Franz). Os segmentos intestinais de jejuno foram obtidos de ratos machos e adultos da linhagem Wistar com peso entre 250 g e 300 g, mantidos em jejum por um período de 18 horas antes do experimento e sacrificados por anestesia seguida de decapitação com guilhotina (Levis *et al.*, 2003; Zakeri-Milani *et al.*, 2007; Dahan *et al.*, 2009). Estes segmentos foram abertos e inseridos em câmaras de difusão vertical (Células de Franz) para realização dos ensaios de permeabilidade (Hidalgo *et al.*, 1993; Hillgren, *et al.*, 1995; Legen, Kristl 2002; Legen *et al.*, 2005) (Figura 10).

Figura 10: Representação esquemática da célula de difusão vertical (célula de Franz).

O compartimento receptor foi preenchido com solução de Ringer tamponada mantida a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, sob constante agitação, enquanto que o compartimento doador foi preenchido com solução de um dos fármacos em estudo ou de um dos controles de alta e baixa permeabilidade. Foram usadas as concentrações de $100\ \mu\text{g/mL}$ para o anlodipino, $300\ \mu\text{g/mL}$ para o fluconazol, $100\ \mu\text{g/mL}$ para a fluoxetina, $60\ \mu\text{g/mL}$ para a fluoresceína e $100\ \mu\text{g/mL}$ para o metoprolol. Amostras de $1\ \text{mL}$ foram retiradas do compartimento receptor 30, 60, 90 e 120 min após início do ensaio. Após cada coleta houve reposição do meio receptor. As concentrações dos fármacos e das substâncias controle nas amostras de meio receptor foram determinadas por métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) previamente validados, e corrigidas em função da reposição do meio receptor, para originar os perfis de permeação dos fármacos e das substâncias controle em função do tempo. A permeabilidade aparente (P_{ap}) de cada fármaco e dos controles foi calculada conforme a fórmula (Barry, 1983; Shah, 1993; Trapani *et al.*, 2004):

$$P_{ap} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} * \frac{1}{A} * \frac{1}{C_0}$$

onde:

$\Delta Q/\Delta t$ =fluxo do fármaco ou controle em $\mu\text{mol}/\text{min}$, ou quantidade de fármaco ou controle permeada através da membrana no intervalo de tempo Δt ;

A =área de exposição da membrana ($0,22 \text{ cm}^2$);

C_0 =concentração inicial do fármaco ou controle na solução adicionada ao compartimento doador.

A viabilidade e integridade das membranas foram verificadas por medição da resistência elétrica transepitelial (RET) antes e durante o experimento, excluindo-se dos experimentos segmentos com valor de RET inferior a $20 \Omega/\text{cm}$ (Polentarutti *et al.*, 1999; Haslam *et al.*, 2011). O uso de substâncias controle de alta e baixa permeabilidade fornece avaliação adicional da qualidade da membrana.

Na Tabela 18, os valores de permeabilidade aparente (P_{ap}) obtidos para cada fármaco por meio dos ensaios de permeabilidade são comparados a dados da literatura de $\log P$ (empregado como medida da lipofilicidade da molécula, e, portanto, relacionado à permeabilidade) e de fração de fármaco absorvida após administração oral em humanos (F_a). A fluoresceína e o metoprolol foram empregados como padrões de baixa e de alta permeabilidade, visando à padronização da técnica de avaliação da permeabilidade de compostos por meio do método proposto e também à garantia da qualidade das membranas. (Koljonen *et al.*, 2006; Berginc *et al.*, 2007).

Tabela 18: Valores médios de permeabilidade aparente (P_{ap}), $\log P$ e fração absorvida (F_a) para anlodipino, fluconazol, fluoxetina, metoprolol e fluoresceína. Cada valor de P_{ap} representa a média de seis determinações.

Fármacos	P_{ap} ($\times 10^{-5}$ cm/s)	$\log P$	F_a (%)
metoprolol	4,39	1,72 ¹	95 ²
fluoresceína	0,17	-0,68 ³	NE
anlodipino	0,90	1,90 ⁴	64-90 ⁴
fluconazol	1,71	0,40 ⁵	90 ⁵
fluoxetina	3,29	1,98 ⁶	60-80 ⁷

¹Kasim, *et al.*, 2003; ²Merck & Company Incorporated, 2001; ³Ito *et al.*, 2012; ⁴Drug Bank, 2012a; ⁵Drug Bank, 2012b; ⁶Kristensen *et al.*, 1999; ⁷Drug Bank, 2012c; NE: não encontrado.

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) define como altamente solúveis aqueles fármacos cuja dosagem mais alta disponível comercialmente é solúvel em 250 mL ou menos de solução aquosa na faixa de pH 1,0 a 7,5 a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (U.S. Department of Health and Human Services, 2000). O volume de meio necessário para solubilizar a quantidade de fármaco correspondente à dosagem mais alta comercializada é dado pela relação dose:solubilidade (D:S). É possível verificar que a quantidade de meio necessária para solubilizar os fármacos é menor que 250 mL para todos eles em todos os meios e, portanto, anlodipino, fluconazol e fluoxetina são classificados como fármacos de alta solubilidade pelo sistema de classificação biofarmacêutica (SCB).

Kasim e colaboradores (2003) avaliaram as características de solubilidade e lipofilicidade de diversos fármacos presentes na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) com o objetivo de classificá-los de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB). Segundo os critérios adotados pelos autores neste estudo, os fármacos de alta solubilidade e $\log P$ superior ao do metoprolol foram considerados como fármacos de alta permeabilidade. Aplicando-se o mesmo critério aos fármacos avaliados no presente projeto, o anlodipino ($\log P=1,90$) e a fluoxetina ($\log P=1,98$) seriam classificados como fármacos

de classe I do SCB (alta solubilidade e alta permeabilidade), enquanto que o fluconazol ($\log P=0,40$) seria classificado como fármaco de classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade). O valor da biodisponibilidade do fluconazol, entretanto, é de 90%, indicando alta absorção deste fármaco *in vivo*, o que, aparentemente, contradiz sua inclusão entre os fármacos de classe III do SCB.

A análise dos resultados dos ensaios de permeabilidade indica que os três fármacos avaliados apresentam permeabilidade aparente (P_{ap}) inferior à do metoprolol e superior à da fluoresceína, sendo que a fluoxetina apresenta o maior valor de P_{ap} , seguida pelo fluconazol e pelo anlodipino, o qual apresentou o menor valor de P_{ap} .

Embora a fluoxetina tenha apresentado o maior valor de permeabilidade entre os fármacos do estudo, sua fração absorvida *in vivo* (60% - 80%) é menor que a do anlodipino (64% - 90%) e que a do fluconazol (90%). Este dado pode ser explicado pela biotransformação pré-sistêmica da fluoxetina, que ocasiona diminuição de sua biodisponibilidade apesar da alta permeação através da membrana intestinal. Esta característica é comum em fármacos lipofílicos, que tem facilidade em permear as membranas biológicas e, portanto, ao mesmo tempo em que atravessam a mucosa intestinal em grandes quantidades, também penetram nos hepatócitos e sofrem biotransformação antes de atingir a circulação sistêmica (Pan *et al.*, 2002). Atualmente, não existem métodos *in vitro* capazes de prever com exatidão a taxa de biotransformação pré-sistêmica dos fármacos (Cao *et al.*, 2006). O anlodipino apresenta valores do $\log P$ e de fração absorvida (F_a) característicos de fármacos de alta permeabilidade, embora o valor de permeabilidade aparente (P_{ap}) obtido no ensaio de permeabilidade tenha sido baixo em relação à fluoxetina e ao fluconazol. O fluconazol apresenta valor de $\log P$ inferior ao do metoprolol, mas é altamente absorvido *in vivo* ($F_a=90\%$), o que o caracteriza como fármaco de alta permeabilidade. No ensaio de permeabilidade, o fluconazol apresentou valor intermediário de P_{ap} .

Os valores de solubilidade e permeabilidade aparente (P_{ap}) obtidos no presente estudo indicam que a fluoxetina pode ser incluída entre os fármacos de classe I do SCB, enquanto que o fluconazol e o anlodipino

podem ser incluídos entre os fármacos de classe III do SCB. Porém, tanto o fluconazol quanto o anlodipino apresentam alta absorção *in vivo* ($F_a = 90\%$), o que permite incluí-los entre os fármacos de classe I do SCB. Esta ausência de correlação entre os valores de P_{ap} com a fração absorvida pode ser consequência da limitação do método empregado no ensaio de permeabilidade em prever condições capazes de influenciar a absorção *in vivo*, tais como o transporte ativo de fármacos mediado por carreadores (Cao *et al.*, 2006). Entretanto, observou-se que a permeabilidade aparente (P_{ap}) é um parâmetro mais preditivo da absorção *in vivo* do que o $\log P$. Estudos adicionais com outros fármacos são necessários para identificar com mais segurança a aplicabilidade da técnica empregada e para definir valores limites de P_{ap} que possibilitem classificar os fármacos em muito ou pouco permeáveis.

5

Considerações finais

O conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo de absorção de fármacos é fundamental tanto para o desenvolvimento de novos medicamentos e novos sistemas de liberação de fármacos quanto na área regulatória.

A administração oral de medicamentos é predominante na farmacoterapia contemporânea e deve continuar assim em função de sua segurança, eficiência e facilidade de administração, com mínimo desconforto para o paciente (Lennernäs, 2007). Entretanto, o processo de absorção de fármacos por esta via é extremamente complexo, e sofre influência de inúmeros fatores relacionados ao paciente, ao fármaco e à forma de farmacêutica, e que podem afetar a biodisponibilidade (Blanchard, Sawchuk, 1979). Segundo Amidon e colaboradores (1995) os processos fundamentais que controlam a absorção de fármacos são a dissolução do fármaco e sua permeação gastrintestinal, que podem ser traduzidos em dois parâmetros biofarmacêuticos fundamentais: a solubilidade e a permeabilidade do fármaco, pilares do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (Amidon *et al.*, 1995). É importante, entretanto, considerar que a dissolução do fármaco e sua permeação pelas membranas do trato gastrintestinal dependem não apenas do fármaco e da formulação, mas também da estabilidade do fármaco, do conteúdo do trato gastrintestinal e do tempo de residência do fármaco no intestino (Fleischer *et al.*, 1999; Singh, 1999; Egan, Lauri, 2002). No passado, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos foram frequentemente interrompidas ou encerradas em função da baixa absorção destas moléculas no trato gastrintestinal e consequente baixa biodisponibilidade. Atualmente, reconhece-se a importância de considerar as variáveis biofarmacêuticas de substâncias candidatas a fármacos no processo de desenvolvimento de novas moléculas (Lennernäs, 2007).

As características biofarmacêuticas de fármacos são utilizadas pelas agências reguladoras (U.S. Department of Health and Human Services, 2000; Brasil, 2011) para definir possibilidades de isenção de estudos de bioequivalência *in vivo* para formulações de liberação imediata, reduzindo custo e tempo de desenvolvimento de novos produtos, e diminuindo a exposição de voluntários sadios em ensaios de bioequivalência (Lennernäs,

2007). A divisão de fármacos em classes de acordo com o SCB também permite estabelecer expectativas relacionadas à correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) (Amidon *et al.*, 1995), cuja obtenção contribui para reduzir o número de estudos de bioequivalência exigidos para o registro de formulações de liberação modificada e para alterações pós- registro (Eddington *et al.*, 1998).

Considerando-se a forte relação existente entre a dissolução do fármaco e sua biodisponibilidade, o ensaio de dissolução tem se tornado cada vez mais relevante. Sob este aspecto, várias abordagens tem sido propostas para estimar a absorção oral a partir da dissolução (Dokoumetzidis, Macheras, 2006) e, desta forma, estabelecer bioisenções. A utilização de dados de dissolução em substituição a ensaios de bioequivalência e biodisponibilidade, ou em correlações *in vitro-in vivo*, só é possível se os resultados de dissolução obtidos forem reprodutíveis e confiáveis (Pillay, Fassihi, 1998).

Atualmente, a avaliação das características biofarmacêuticas é dificultada pela inexistência de métodos ou protocolos padronizados para avaliação da permeabilidade de fármacos. Enquanto os protocolos para determinação da solubilidade já estão bem estabelecidos e são incluídos em guias de agências regulatórias (U.S. Department of Health and Human Services, 2000; Brasil, 2011) e em documentos da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2012), não há concordância sobre quais métodos seriam apropriados para determinar a permeabilidade de fármacos. A permeabilidade é dependente de diferentes mecanismos como, por exemplo, a permeabilidade intestinal passiva, o metabolismo intestinal, o influxo ativo mediado por carreadores, e o efluxo ativo mediado por transportadores como a glicoproteína-P (P-gp) ou proteínas da família de proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MRP). Diversos modelos tem sido propostos para permitir a avaliação de todos estes mecanismos (Egan, Lauri, 2002). Estes métodos incluem o uso de membranas lipídicas artificiais (PAMPA); ensaios *in vitro* em cultura celular de células Caco-2 ou MDCK; ensaios *ex vivo* em tecidos em câmaras de Ussing ou células de Franz; métodos *in situ* como a perfusão intestinal; ensaios *in vivo* com o uso de animais para estudos de absorção ou de balanço de massas e ensaios de

biodisponibilidade absoluta em humanos (U.S. Department of Health and Human Services, 2000; Balimane *et al.*, 2006). Em geral, a permeabilidade intestinal de fármacos é avaliada por uma combinação destes métodos, mas deficiências associadas a cada um deles e a falta de padronização na execução e forma de obtenção dos resultados limitam seu uso, colocam em dúvida sua utilidade como fonte confiável de dados, e dificultam a aceitação dos dados obtidos pelas agências reguladoras (Balimane *et al.*, 2006). Uma vez que a absorção de fármacos é um critério de seleção fundamental a ser considerado na descoberta e desenvolvimento de novas moléculas, é evidente a necessidade de métodos de triagem adequados e confiáveis para avaliar a permeabilidade intestinal (Bohets *et al.*, 2001; Hidalgo, 2001; Matsson *et al.*, 2005, Volpe, 2010).

Além disso, é importante considerar que os recentes avanços nas áreas de biotecnologia, ciências farmacêuticas, biologia molecular, química de polímeros e nanotecnologia estão ampliando as possibilidades na área de novos sistemas de liberação de fármacos. Entretanto, existem diversos obstáculos a serem superados até que estas tecnologias se tornem disponíveis na terapêutica clínica, incluindo as dificuldades de absorção (Balmayor *et al.*, 2011). Neste contexto, a pesquisa dos mecanismos de absorção de fármacos torna-se particularmente importante.

O estudo dos processos de absorção e o desenvolvimento e validação de métodos, modelos e protocolos para avaliar as características biofarmacêuticas de fármacos e para prever a biodisponibilidade empregando ensaios *in vivo*, *in situ*, *ex vivo*, *in vitro* e *in silico* poderão originar ferramentas inovadora de apoio ao desenvolvimento de novos fármacos e de novos sistemas de liberação de fármacos, acelerando sua introdução no mercado a um menor custo e com redução de estudos *in vivo*, mas sempre garantindo sua eficácia e segurança.

Referências bibliográficas

- 1 Abdou HM. Dissolution, bioavailability and bioequivalence. Easton: Mack Printing; 1989. 554p.
- 2 Alván G. Bioavailability of phenytoin. Acta Pharm Suec. 1978; 15:294-295.
- 3 Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. Pharmaceut Res. 1995; 12: 413-20.
- 4 Anderson S, Hauck WW. The transitivity of bioequivalence testing: potential for drift. Int J Clin Pharmacol Ther. 1996; 34:369-74.
- 5 Ansbacher R. Interchangeability of low-dose oral contraceptives: are current bioequivalent testing measures adequate to ensure therapeutic equivalency? Contraception. 1991; 43: 139-47.
- 6 Aoyagi N, Ogata H, Kaniwa N, Koibuchi M, Shibasaki T, Ejima A. Bioavailability of griseofulvin from tablets in humans and the correlation with its dissolution rate. J Pharm Sci. 1982; 71:1165-9.
- 7 Atisook K, Carlson S, Madara JL. Effects of phlorizin and sodium on glucose-elicited alterations of cell junctions in intestinal epithelia. Am J Physiol. 1990; 258:C77-85.
- 8 Aulton ME, editor. Pharmaceutics: the science of dosage form design. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 2001. 704p.
- 9 Avico U, Ciranni ES, Zuccaro P, Cingolani E, Foschi F, Paciaroni E. Caratteristiche biofarmaceutiche delle compresse di digossina. Boll Chim Farm. 1976; 115:432-9.
- 10 Azarmi S, Roa W, Löbenberg R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. Int J Pharm. 2007; 328:12-27.
- 11 Balimane PV, Chong S, Morrison RA. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. J Pharmacol Toxicol Methods. 2000; 44:301-12.
- 12 Balimane PV, Han Y, Chong S. Current industrial practices of assessing permeability and p-glycoprotein interaction. AAPS J. 2006; 8:E1-13.
- 13 Balmayor ER, Azevedo HS, Reis RL. Controlled delivery systems: from pharmaceuticals to cells and genes. Pharm Res. 2011; 28:1241-58.
- 14 Banakar UV. Pharmaceutical dissolution testing. New York: Marcel Dekker; 1992. 438 p. (Drugs and the pharmaceutical sciences; vol. 49)
- 15 Barr WH, Gerbracht KM, Letchen K, Plaut M, Strahl N. Assessment of the biologic availability of tetracycline products in man. Clin Pharmacol Ther. 1972; 13:97-108.
- 16 Barrett JS, Batra V, Chow A, Cook J, Gould AL, Heller AH *et al.* PhRMA perspective on population and individual bioequivalence. J Clin Pharmacol. 2000; 40:561-570.

- 17 Barry BW. Dermatological formulations: percutaneous absorption. New York: Marcel Dekker; 1983. 482 p. (Drugs and the pharmaceutical sciences; vol. 18).
- 18 Barthe L, Woodley JF, Kenworthy S, Houin G. An improved everted gut sac as a simple and accurate technique measure paracellular transport across the small intestine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1998; 23:313-23.
- 19 Bearden WO, Mason JB. Physician and pharmacist perceptions of generic drugs. *Ind Market Manag.* 1979; 8:63-8.
- 20 Berginc K, Zakelj S, Levstik L, Ursic D, Kristl A. Fluorescein transport properties across artificial lipid membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 66:281-7.
- 21 Berlin-Wahlén A. Factors affecting the systemic availability of diazepam. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15:295-296.
- 22 Bialer M, Sussan S, Salach OA, Danenberg HD, Bem-David J, Gibor Y, Laor A. Criteria to assess *in vivo* performance of sustained-release products: application to diltiazem formulations. *J Pharm Sci.* 1995; 84:1160-3.
- 23 Blair DC, Barnes RW, Wildner EL, Murray WJ. Biological availability of oxytetracycline FCI capsules: a comparison of all manufacturing sources supplying the United States market. *J Am Med Assoc.* 1971; 215:251-4.
- 24 Blakesley V, Awni W, Locke C, Ludden T, Richard GG, Braverman LE. Are bioequivalence studies of levothyroxine sodium formulations in euthyroid volunteers reliable? *Thyroid.* 2004; 14:191-200.
- 25 Blanchard J, Sawchuk RJ, Brodie BB. Principles and perspectives in drug bioavailability. Basel, New York: Karger; 1979. 334p.
- 26 Blanchard J, Sawchuk RJ. Drug bioavailability: an overview. In: Blanchard J, Sawchuk RJ, Brodie BB. Principles and perspectives in drug bioavailability. Basel: S. Karger; 1979. p.1-19.
- 27 Boddy AW, Snikeris FC, Kringle RO, Wei GCG, Oppermann JA, Midha KK. An approach for widening the bioequivalence acceptance limits in the case of highly variable drugs. *Pharm Res.* 1995; 12:1865-68.
- 28 Bohets H, Annaert P, Mannens G, Van Beijsterveldt L, Anciaux K, Verboven P *et al.* Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1:367-83.
- 29 Boni JP, Korth-Bradley JM, Richards L, Chiang ST, Hicks DR, Benet LZ. Chiral bioequivalence: effect of absorption rate on racemic etodolac. *Clin Pharmacokinet.* 2000; 39:459-69.
- 30 Borchers AT, Hagie F, Keen CL, Gershwin ME. The history and contemporary challenges of the US Food and Drug Administration. *Clin Ther.* 2007; 29:1-16.

- 31 Bramanti G. Disponibilit della fenformina contenuta in una forma farmaceutica orale a cessione protratta. Boll Chim Farm. 1973; 112:472-8.
- 32 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Altera o item 2.3, VI, do Anexo I, da Resoluo RDC no 16, de 2 de maro de 2007 e o Anexo da resoluo RDC no 17, de 2 de maro de 2007. Resoluo RDC no 51, 15 agosto 2007a. Dirio Oficial da Unio, Braslia (2007 ago. 16); Sec. 1:34.
- 33 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Aprova regulamento tcnico para medicamentos genricos. Resoluo RDC n. 16, 2 maro 2007b. Dirio Oficial da Unio, Braslia (2007 mar. 05); Sec. 1:29-30.
- 34 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Determina a publicao do “Guia para Planejamento e Realizao da Etapa Estatstica de Estudos de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalncia”. Resoluo RE n. 898, 29 maio 2003a. Dirio Oficial da Unio, Braslia (2003 jun. 02); Sec. 1:54-6.
- 35 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Dispe sobre a adequao dos medicamentos j registrados. Resoluo RDC n. 134, 29 maio 2003b. Dirio Oficial da Unio, Braslia (2003 jun. 02); Sec. 1:26-8.
- 36 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Dispe sobre o registro de medicamento similar e d outras providncias. Resoluo RDC n. 17, 2 maro 2007c. Dirio Oficial da Unio, Braslia (2007 mar. 07); Sec. 1:30.
- 37 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Dispe sobre o registro de medicamento similar e d outras providncias. Resoluo RDC n. 133, 29 maio 2003c. Dirio Oficial da Unio, Braslia (2003 jun. 02); Sec. 1:25-26.
- 38 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Dispe sobre o Guia para iseno e substituio de estudos de biodisponibilidade relative/bioequivalncia e d outras providncias. Resoluo RDC no 37, 3 agosto 2011. Dirio Oficial da Unio, Braslia (2011 ago. 5); Sec. 1:117-9.
- 39 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Guia para estudos da correlao *in vitro-in vivo* (CIVIV). Resoluo RE n. 482, 19 maro 2002. Dirio Oficial da Unio, Braslia (2002 mar. 20); Sec.1:116.
- 40 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalncia de medicamentos. Resoluo RE n. 1170, 19 abril 2006. Dirio Oficial da Unio, Braslia (2006 abr. 24); Sec.1:101-2.
- 41 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Guia para validao de mtodos analticos e bioanalticos. Resoluo RE n. 899, 29 maio 2003d. Dirio Oficial da Unio, Braslia (2003 jun. 02); Sec.1:56-8.
- 42 Brasil. Agncia Nacional de Vigilncia Sanitria. Resoluo n. 391, 9 agosto 1999a. Dirio Oficial da Unio, Braslia (1999 ago. 10); Sec. 1:62-9.
- 43 Brasil. Conselho Nacional de Sade. Cmara Tcnica de Medicamentos. Resoluo Normativa CTM/CNS n. 4, 20 setemebro 1978. Em: Mello AL, Mussoi AS,

Gomes C, Paz, EP, Lima, LFM, Moura ML. Vigilância Sanitária de Medicamentos e Correlatos. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1993. p. 333.

- 44 Brasil. Decreto n. 19.606 de 19 de janeiro de 1931a. Dispões sobre a profissão farmacêutica e seu exercício no Brasil. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro (1931 jan. 19); Sec. 1:1331.
- 45 Brasil. Decreto n. 20.377 de 8 de setembro de 1931b. Aprova a regulamentação do exercício da profissão farmacêutica no Brasil. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro (1931 set. 14); Sec. 1:14529.
- 46 Brasil. Decreto n. 20.397 de 14 de janeiro de 1946. Aprova o regulamento da indústria farmacêutica no Brasil. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro (1946 jan. 19); Sec. 1:938.
- 47 Brasil. Decreto n. 43.702 de 9 de maio de 1958. Altera o Decreto nº 20.397, de 14 de janeiro de 1946, que regula o funcionamento da indústria farmacêutica no Brasil. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro (1958 mai. 14); Sec. 1:11079.
- 48 Brasil. Decreto n. 79.094 de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneamento e outros. Diário Oficial da União, Brasília (1977 jan. 7); Sec. 1 (supl.):11.
- 49 Brasil. Decreto n. 793 de 5 de abril de 1993. Altera os Decretos nºs 74.170, de 10 de junho de 1974 e 79.094, de 5 de janeiro de 1977, que regulamentam, respectivamente, as Leis nºs 5.991, de 17 de janeiro de 1973, e 6.360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília (1993 abr. 6); Sec. 1:4397-8.
- 50 Brasil. Lei n. 6.360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília (1976 set. 24); Sec. 1:12647.
- 51 Brasil. Lei n. 9.279 de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Diário Oficial da União, Brasília (1996 mai. 15); Sec. 1:8353-66.
- 52 Brasil. Lei n. 9.787 de 10 de fevereiro de 1999b. Altera a Lei n. 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. Diário Oficial da União, Brasília (1999 fev. 11); Sec. 1:1-2.
- 53 Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 3.916, 30 outubro 1998. Diário Oficial da União, Brasília (1998 nov. 10); Sec. e1:18-22.
- 54 Breckenridge A. Influence of disease on bioavailability in man. Acta Pharm Suec. 1978; 15:298-299.

-
- 55 Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B: Biomed. Appl.* 1996; 686:3-10.
- 56 Brocks DR. Drug disposition in three dimensions: an update on stereoselectivity in pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos.* 2006; 27:387-406.
- 57 Cao X, Gibbs ST, Fang L, Miller HA, Landowski CP, Shin HC *et al.* Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharmaceut Res.* 2006; 23:1675-86.
- 58 Cardot JM, Beyssac E, Alric M. *In vitro-in vivo* correlation: importance of dissolution in IVIVC. *Dissolut Technol.* 2007; 14:15-9.
- 59 Carpenter D, Tobbell DA. Bioequivalence: the regulatory career of a pharmaceutical concept. *B Hist Med.* 2011; 85:93-131.
- 60 Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J Chromatogr B: Biomed. Appl.* 1997; 175-80.
- 61 Cazes J, Scott RPW. *Chromatography theory.* New York: Marcel Dekker; 2002. 476p.
- 62 Cerqueira PM, Boralli VB, Coelho EB, Lopes NP, Guimarães LFL, Bonato OS *et al.* Enantioselective determination of metoprolol acidic metabolite in plasma and urine using liquid chromatography chiral columns: applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B.* 2003a; 783:433-441.
- 63 Cerqueira PM, Cesarino EJ, Bertucci C, Bonato PS, Lanchote VL. Stereoselective metabolism of metoprolol: enantioselectivity of α -hydroxymetoprolol in plasma and urine. *Chirality.* 2003b; 15:542-9.
- 64 Chen ML, Shah V, Patnaik R, Adams W, Hussain A, Conner D *et al.* 2001 Bioavailability and bioequivalence: an FDA regulatory overview. *Pharmaceut Res.* 2001; 18:1645-50.
- 65 Chen Y, Ping Q, Guo J, Lv W, Gao J. The absorption behavior of cyclosporin A lecithin vesicles in rat intestinal tissue. *Int J Pharm.* 2003; 261:21-6.
- 66 Chiou WL. Determination of physiological availability of commercial phenylbutazone preparations. *J Clin Pharmacol.* 1972; 12:296-9.
- 67 Chow SC, Liu JP. *Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies.* 2 ed. New York: Marcel Dekker; 2000. 548 p.
- 68 Chow SC, Liu JP. Meta-analysis for bioequivalence review. *J. Biopharm. Stat.* 1997; 7:97-111.
- 69 Congress of the United States. Office of Technology Assessment. Drug Bioequivalence study panel report. Washington; 1974. 78 p.
- 70 Cook D. Bioequivalence and clinical significance. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15:291-2.

- 71 Costa P, Lobo JMS. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 13:123-33.
- 72 Dahan A, West BT, Amidon GL. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. *Eur J Pharm Sci.* 2009; 36:320-9.
- 73 De Blaeij CJ, Rutten-Kingma JJ. Absorption from suspension-suppositories in the rat. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15:303-304.
- 74 Delaney TP. Efficacy and generic drugs (letter). *Lancet.* 1987; 330:218-9.
- 75 Della Paschoa OE, Luckow V, Trenk D, Jähnchen E, Santos SRCJ. Prolongation of the PQ interval as a measure of therapeutic inequivalence between two formulations of diltiazem. *Eur J Clin Pharmacol.* 1995; 48:45-9.
- 76 Demortain D. European Agencies. The European Medicines Agency (EMA) and the European Food Safety Authority (EFSA). In: Benamouzig D and Borraz O, editors. Food and Pharmaceutical Agencies in Europe, between bureaucracy and democracy. Cross-national perspectives. A Commented Bibliography. Grenoble: MSH Alpes; 2007.
- 77 Dey M, Enever R, Marino M, Michelucci J, Smith D, Warner R. *et al.* Sustained-release etodolac bioavailability and dose proportionality: correlation between *in vivo* and *in vitro* performance. *Int J Pharm.* 1989; 49:121-128.
- 78 Dighe SV. A review of the safety of generic drugs. *Transplant P.* 1999; 31 Suppl 3A: 23S-4S.
- 79 Diletti E, Hauschke D, Steinijans VW. Sample size determination for bioequivalence assessment by means of confidence intervals. *Int J Clin Pharmacol, Ther Toxicol.* 1991; 29:1-8.
- 80 Diletti E, Hauschke D, Steinijans VW. Sample size determination: extended tables for the multiplicative model and bioequivalence ranges of 0.9 to 1.11 and 0.7 to 1.43. *Int Clin Pharmacol, Ther Toxicol.* 1992; 30:S59-S62.
- 81 Dissanayake S. Assessing the bioequivalence of analogues of endogenous substances ('endogenous drugs'): considerations to optimize study design. *Br J Clin Pharmacol.* 2010; 69:238-44.
- 82 Dokoumetzidis A, Macheras, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *Int J Pharm.* 2006; 321:1-11.
- 83 Dorman FL, Overton EB, Whiting JJ, Cochran JW, Gardea-Torresdey J. Gas chromatography. *Anal Chem.* 2008; 80:4487-97.
- 84 Dredán J, Antal I, Rácz I. Evaluation of mathematical models describing drug release from lipophilic matrices. *Int J Pharm.* 1996; 145:61-4.

- 85 Drewe J, Guitard P. *In vitro-in vivo* correlation for modified-release formulations. J Pharm Sci. 1993; 82:132-7.
- 86 Drug Bank: Open Data Drug & Drug Target Database. Drug card for amlodipine 2012a [citado 20 jan. 2012]. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00381>.
- 87 Drug Bank: Open Data Drug & Drug Target Database. Drug card for fluconazole 2012b [citado 20 jan. 2012]. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00196>.
- 88 Drug Bank: Open Data Drug & Drug Target Database. Drug card for fluoxetine 2012c [citado 20 jan. 2012]. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00472>.
- 89 Dunne A, O'Hara T, Devane JA. New aproach to modelling the relationship between *in vitro* and *in vivo* drug dissolution/absorption. Stat Med. 1999; 18:1865-76.
- 90 Eddington ND, Marroum P, Uppor R, Hussain A, Augsburger L. Development and internal validation of an *in vitro-in vivo* correlation for a hydrophilic metoprolol tartrate extended release tablet formulation. Pharm. Res. 1998; 15:466-73.
- 91 Egan WJ, Lauri G. Prediction of intestinal permeability. Adv Drug Deliver Rev. 2002; 54:273-89.
- 92 Ehrnebo M, Ekstrand J, Boréus LO. Day-to-day variations in renal clearance: an important factor whwn calculating sodium fluoride bioavailability. Acta Pharm Suec. 1978; 15:296-297.
- 93 Elkoshi Z. Dissolution specifications based on release rates. J Pharm Sci. 1999; 88: 434-44.
- 94 Emami J. *In vitro-in vivo* correlation: from theory to applications. J Pharm Pharmaceut Sci. 2006; 9:169-89.
- 95 Endrenyi L, Amidon GL, Midha KK, Skelly JP. Individual bioequivalence: attractive in principle, difficult in practice. Pharm Res. 1998; 15:1321-25.
- 96 Endrenyi L, Midha KK. Individual bioequivalence: has it time come? Eur J Pharm Sci 1998; 6:271-277.
- 97 European Medicines Agency [homepage]. London: European Medicines Agency; 2013a [citado 12 fev. 2013]. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000091.jsp&mid=WC0b01ac0580028a42. 2013a
- 98 European Medicines Agency [homepage]. London: European Medicines Agency; 2013b [citado em 12 fev. 2013]. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Ffinding%2Fepar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&searchTab=searchByAuthType&alreadyLoaded=true&isNewQuery=true&status=Authorised&status=Wit hdrawn&status=Suspended&status=Refused&keyword=Enter+keywords&sear

chType=name&taxonomyPath=&treeNumber=&searchGenericType=generics
&genericsKeywordSearch=Submit. 2013b

- 99 European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the investigation of bioequivalence. London: European Medicines Agency; 2010a. 27 p.
- 100 European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Concept paper on the need for revision of the note for guidance on modified release oral and transdermal dosage forms: section II (pharmacokinetic and clinical evaluation). London: European Medicines Agency; 2010b. 3 p. 2010b
- 101 European Medicines Agency. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on modified release oral and transdermal dosage forms: section II (pharmacokinetic and clinical evaluation). London: European Medicines Agency; 1999a. 11 p.
- 102 European Medicines Agency. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on quality of modified release products: A: oral dosage forms. B: transdermal dosage forms: section I (quality). London: European Medicines Agency; 1999b. 15 p.
- 103 FDA position on product selection for 'narrow therapeutic index' drugs. *Am J Health-Syst Pharm.* 1997; 54:1630-2.
- 104 Fleder JR. The history, provision and implementation of the generic drug enforcement act of 1992. *Food Drug Law J.* 1994; 49:89-107.
- 105 Fleischer D, Li C, Zhou Y, Pao L, Karim A. Drug, meal, and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 36:233-54.
- 106 Fluehler H, Grieve AP, Mandallaz D, Mau J, Moser HA. Bayesian-approach to bioequivalence assessment: an example. *J Pharm Sci.* 1983; 72:1178-81.
- 107 Fluehler H, Hirtz J, Moser HA. An aid to decision-making in bioequivalence assessment. *J Pharm Biopharm.* 1981; 9:235-43.
- 108 Formenti L. Anvisa vê falhas em análise de remédios. *O Estado de S. Paulo.* 18 nov 2005; Vida &:A24.
- 109 Führer C. Crystallographic state and bioavailability. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15:319.
- 110 Ganderton D. Effect of production variables on the properties of tablets and capsules related to bioavailability. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15:314-5.
- 111 Garcia-Arieta A, Abad-Santos F, Rodriguez-Martinez MA, Varas-Polo Y, Novalbos J, Laparidis N, Gallego-Sandin S, Orfanidis K, Torrado J. An eutomer/distomer ratio near unity does not justify non-enantiospecific assay methods in bioequivalence studies. *Chirality.* 2005; 17:470-5.

-
- 112 Gleiter CH, Klotz U, Kuhlmann J, Blume H, Stanislaus F, Harder S, Paulus H, Poethko-Müller C, Holz-Slomczyk M. When are bioavailability studies required? A German proposal. *J Clin Pharm*. 1998; 38:904-911.
- 113 Godbillon J, Cardot JM, Lecaillon JB, Lefevre G, Sioufi A. Bioequivalence assessment: a pharmaceutical industry perspective. *Eur. J. Drug Metab Pharmacokinet*. 1996; 21:153-8.
- 114 Goracinova K, Klisarova L, Simov A, Fredro-Kumbaradzi E, Petrusevska-Tozi L. Preparation, physical characterization, mechanisms of drug/polymer interactions, and stability studies of controlled-release solid dispersion granules containing weak base as active substance. *Drug Dev Ind Pharm*. 1996; 22:255-62.
- 115 Grdinic S, Gjurić V, Bican-Fister T. Comparison of *in vitro* release and renal elimination of 1-butylbiguanide from timed-release oral antidiabetic preparations. *Acta Pharm Jugosl*. 1979; 29:215-21.
- 116 Gupta E, Barends DM, Yamashita E, Lentz KA, Harmsze AM, Shah VP *et al*. Review of global regulations concerning biowaivers for immediate release solid oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci*. 2006; 29:315-24.
- 117 Haas JS, Phillips KA, Gerstenberger EP, Seger AC. Potential savings from substituting generic drugs for brand-name drugs: medical expenditure panel survey, 1997–2000. *Ann Intern Med*. 2005; 142:891–7
- 118 Haslam IS, O'Reilly DA, Sherlock DJ, Kauser A, Womack C, Coleman T. Pancreatoduodenectomy as a source of human small intestine for Ussing chamber investigations and comparative studies with rat tissue. *Biopharm Drug Dispos*. 2011; 32:210-21.
- 119 Hauck WW, Anderson S. Measuring switchability and prescribability: when is average bioequivalence sufficient? *J Pharmacokinet Biopharm*. 1994; 22:551-564.
- 120 Hauschke D, Kieser M, Diletti E, Burke M. Sample size determination for proving equivalence based on the ratio of two means for normally distributed data. *Stat Med*. 1999; 18:93-105.
- 121 Hauschke D, Steinijans VW, Diletti E, Burke M. Sample size determination for bioequivalence assessment using a multiplicative model. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1992; 20:557-61.
- 122 Hayashi T, Ogura T, Takagishi Y. New evaluation method for *in vitro/in vivo* correlation of enteric-coated multiple unit dosage forms. *Pharm Res*. 1995; 12:1333-7.
- 123 Health Canada. Access to therapeutic products: the regulatory process in Canada. Ottawa: Health Canada; 2006. 30 p. [citado 9 fev 2013]. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/pubs/access-therapeutic_acces-therapeutique-eng.pdf.
- 124 Henderson JD, Esham RH. Generic substitution: issues for problematic drugs. *South Med J*. 2001; 94:16-21.

- 125 Hennion M. Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1999; 856:3-54.
- 126 Herchuelz A. Bioequivalence assessment and the conduct of bioequivalence trials: a european point of view. *Eur J Drug Metab and Pharmacokinet*. 1996; 21:1333-7.
- 127 Hidalgo IJ. Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Curr Top Med Chem*. 2001; 1:385-401.
- 128 Hidalgo IJ; Ryan FM, Marks GJ, Smith PL. pH-dependent transepithelial transport of cephalexin in rabbit intestinal mucosa. *Int Pharm*. 1993; 98:83-92.
- 129 Hiep BT, Fernandez C, Khanh V, Hung NK, Thuillier A, Farinotti R, Arnaud P, Gimenez F. Stereospecific versus nonstereospecific assessments for the bioequivalence of two formulations of racemic chlorpheniramine. *Chirality*. 2000; 12:599-605.
- 130 Higuchi T. Mechanism of sustained action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci*. 1963; 52:1145-9.
- 131 Hillgren KM, Kato A, Borchardt RT. *In vitro* systems for studying intestinal drug absorption. *Med Res Rev*. 1995; 15:83-109.
- 132 Hixson AW, Crowell JH. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Ind Eng Chem*. 1931; 23:923-31.
- 133 Hossain M, Abramowitz W, Watrous BJ, Szpunar GJ, Ayres JW. Gastrointestinal transit of nondisintegrating, nonerodible oral dosage forms in pigs. *Pharm Res*. 1990; 7:1163-6.
- 134 Hulting F, Harville DA. Some bayesian and non-bayesian procedures for the analysis of comparative experiments and for small-area estimation: computational aspects, frequentist properties, and relationships. *J Am Stat Assoc*. 1991; 86:557-68.
- 135 Hyötyläinen T, Riekkola M. Solid- phase extraction or liquid chromatography coupled on-line with gas chromatography in the analysis of biological samples. *J Chromatogr B*. 2005; 817: 13-21.
- 136 Ito Y, Yoshimura M, Tanaka T, Takada K. Effect of lipophilicity on the bioavailability of drugs after percutaneous administration by dissolving microneedles. *J Pharm Sci*. 2012; 101:1145-56.
- 137 Japan Pharmaceutical Manufacturers Association. International Affairs Committee. English Regulatory Information Task Force. Information in english on japanese regulatory affairs. Tokyo: Japan Pharmaceutical Manufacturers Association; 2011. 209 p. [citado 9 fev. 2013]. Disponível em: http://www.nihs.go.jp/mhlw/yakuji/yakuji-e_20110502-02.pdf.
- 138 Karasov WH, Darken BW, Bottum MC. Dietary regulation of intestinal ascorbate uptake in guinea pigs. *Am J Physiol*. 1991; 260:108-118.

-
- 139 Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernäs H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky AS, Midha KK, Shah VP, Amidon, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm.* 2003; 1:85-96.
- 140 Khan KA, Rhodes CT The concept of dissolution efficiency. *J Pharm Pharmacol.* 1975; 27:48-49.
- 141 Koljonen M, Hakala KS, Ahtola-Satilla T, Laitinen LA, Kostinen R, Kotiaho T, Kaukonen AM, Hirvonen J. Evaluation of cocktail approach to standardize Caco-2 permeability experiments. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006; 64:379-87.
- 142 Korsmeyer RW, Peppas NA. Macromolecular and modeling aspects of swelling controlled systems. In: Roseman TJ, Mansdorf SZ. *Controlled Release Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker; 1981. p. 77-90.
- 143 Krishnan TR, Ibrahim I. Solid-phase extraction technique for the analysis of biological samples. *J Pharmaceut Biomed.* 1994; 12:287-94.
- 144 Kristensen JH, Ilett KF, Hackett LP, Yapp P, Paech M, Begg, EJ. Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine in human milk. *Br J Clin Pharmacol.* 1999; 48:521-27.
- 145 Laboisse CL, Jarry A, Bou-Hanna C, Merlin D, Vallette G. Intestinal cell culture models. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1994; 2:36-8.
- 146 Lam YWF, Ereshefsky L, Toney GB, Gonzáles C. Branded versus generic clozapine: bioavailability comparisons and interchangeability issues. *J Clin Psychiat.* 2001; 62(Suppl. 5):18-22.
- 147 Langenbucher F. *In vitro* tests for bioavailability: disintegration, dissolution, permeation. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15:315.
- 148 Lasagna L. Efficacy and generic drugs (letter). *Lancet.* 1987; 330:218.
- 149 Legen I, Kristl A. Ketoprofen-induced intestinal permeability changes studied in side-by-side diffusion cells. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54:1419-22.
- 150 Legen I, Salobir M, Kerc J. Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. *Int J Pharm.* 2005; 291: 183-8.
- 151 Lennernäs H. Animal data: the contributions of the Ussing chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery *in vivo*. *Adv Drug Deliver Rev.* 2007; 59:1103-20.
- 152 Levis KA, Lane ME, Corrigan OI. Effect of buffer media composition on the solubility and effective permeability coefficient of ibuprofen. *Int J Pharm.* 2003; 253: 49-59.
- 153 Lin SY, Kao YH, Chang HN. Preliminary evaluation of the correlation between *in vitro* release and *in vivo* bioavailability of two aminophylline slow-release tablets. *J Pharm Sci.* 1990; 79:326-30.

- 154 Lindahl A, Ungell AL, Knutson L, Lennernäs H. Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharm Res.* 1997; 14:497-502.
- 155 Liu JP, Weng CS. Evaluation of log-transformation in assessing bioequivalence. *Commun Stat-Theory Meth.* 1994; 23:421-34.
- 156 Lowenthal W. Disintegration of tablets. *J Pharm Sci.* 1972; 61:1695-711.
- 157 Luo FR, Paranjpe PV, Guo A, Rubin E, Sinko P. Intestinal transport of irinotecan in Caco-2 cells and MDCK II cells overexpressing efflux transporters Pgp, cMOAT, and MRP1. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30:763-70.
- 158 Makhey VD, Guo A, Norris DA, Hu P, Yan J, Sinko PJ. Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells. *Pharm Res.* 1998; 15:1160-1167.
- 159 Mandallaz D, Mau J. Comparison of different methods for decision-making in bioequivalence assessment. *Biometrics.* 1981; 37:213-22.
- 160 Mariappan TT, Singh S. Evidence of efflux-mediated and saturable absorption of rifampicin in rat intestine using the ligated loop and everted gut sac techniques. *Mol Pharm.* 2004; 1: 363-7.
- 161 Marzo A, Balant LP. Bioequivalence: an updated reappraisal addressed to applications of interchangeable multi-source pharmaceutical products. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 1995; 45:109-115.
- 162 Marzo A. Open questions in bioequivalence. *Pharmacol Res.* 1999; 40:357-68.
- 163 Marzo A; Vuksi D; Crivelli F. Bioequivalence of endogenous substances facing homeostatic equilibria: an example with potassium. *Pharmacol Res.* 2000; 42:523-5.
- 164 Mastoraki E, Michalopoulos A, Kriaras I, Mouchtouri E, Falagas M, Karatza D, Geroulanos S. Incidence of postoperative infections in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery receiving antimicrobial prophylaxis with original and generic cefuroxime. *Journal of Infection.* 2008; 56:35-9.
- 165 Matsson P, Bergström CAS, Nagahara N, Tavelin S, Norinder U, Artursson P. Exploring the role of different drug transport routes in permeability screening. *J Med Chem.* 2005; 48:604-13.
- 166 Medicamentos genéricos - sumário geral. Brasília. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013 [citado 12 fev. 2013]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9b4a16004e5c1e5891d1ddd762e8a5ec/8+N%C3%BAmoros+registros+de+medicamentos+gen%C3%A9ricos+sum%C3%A1rio+geral.xls?MOD=AJPERES>.
- 167 Mehvar R, Jamali F. Bioequivalence of chiral drugs: stereospecific versus non-stereospecific methods. *Clin Pharmacokinet.* 1997; 33:122-41.

-
- 168 Mercado farmacêutico - Brasil. Vendas de genéricos em dólares. São Paulo: Sindusfarma; 2013a [citado 09 fev. 2013]. Disponível em: <http://www.sindusfarmacomunica.org.br/indicadores-economicos>.
- 169 Mercado farmacêutico - Brasil. Vendas de genéricos em unidades. São Paulo: Sindusfarma; 2013b [citado 09 fev. 2013]. Disponível em: <http://www.sindusfarmacomunica.org.br/indicadores-economicos>.
- 170 Mercado farmacêutico - Brasil. Vendas do mercado total em dólares. São Paulo: Sindusfarma; 2013c [citado 09 fev. 2013]. Disponível em: <http://www.sindusfarmacomunica.org.br/indicadores-economicos>.
- 171 Mercado farmacêutico - Brasil. Vendas do mercado total em unidades. São Paulo: Sindusfarma; 2013d [citado 09 fev. 2013]. Disponível em: <http://www.sindusfarmacomunica.org.br/indicadores-economicos>.
- 172 Merck & Company Incorporated. The Merck Index. 13th. ed. New Jersey: Merck & Company Incorporated, 2001.
- 173 Meredith P. Bioequivalence and other unresolved issues in generic drug substitution. *Clin Ther*. 2003; 25:2875-90.
- 174 Meredith PA. Generic drugs: therapeutic equivalence. *Drug Safety*. 1996; 15:233-42.
- 175 Metzler CM. Bioavailability - a problem in equivalence. *Biometrics*. 1974; 30: 309-17.
- 176 Meyer GF. History and regulatory issues of generic drugs. *Transplant P*. 1999; 31 Suppl 3A: 10S-2S.
- 177 Midha KK, McKay G, Rawson MJ, Hubbard JW. The impact of stereoisomerism in bioequivalence studies. *J Pharm Sci*. 1998; 87:797-802.
- 178 Midha KK, McKay G. Bioequivalence; its history, practice, and future. *AAPS J*. 2009; 11:664-70.
- 179 Minghetti P. Regulatory status of medicinal products for human beings in the European Union. The role of generic products. *Pharmacological Research*. 1996; 34:3-7.
- 180 Mizen LW. Comparative bioavailability of penicillins in laboratory animals and man after oral administration. *Acta Pharm Suec*. 1978; 15:308-309.
- 181 Moore JW, Flanner HH. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharm Tech*. 1996; 20:64-74.
- 182 Munk A. An improvement on commonly used tests in bioequivalence assessment. *Biometrics*. 1993; 49:1225-30.
- 183 Nation RL, Sansom LN. Bioequivalence requirements for generic products. *Pharmac Ther*. 1994; 62:41-55.

- 184 Naylor CD. Meta-analysis and the meta-epidemiology of clinical research. *BMJ*. 1997; 315:617-619 [citado 24 mar. 2013]. Disponível em: <http://www.bmj.com/cgi/content/full/315/7109/617>.
- 185 Neuhoﬀ S, Ungell AL, Zamora I, Artursson P. pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci*. 2005; 25:211-20.
- 186 Nyberg L. Inequivalent digoxin tablets: a harsh but useful alarm. *Acta Pharm Suec*. 1978; 15:293.
- 187 Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. The impact of generic drugs on the cost of transplantation medical care. *Transplant P*. 1999; 31 Suppl 3A: 31S-4S.
- 188 Organisation for Economic Co-operation and Development. Country statistical profile: Brazil. 2011. (Country statistical profiles: Key tables from OECD) [citado 5 fev. 2013]. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/economics/country-statistical-profile-brazil_csp-bra-table-en.
- 189 Organisation for Economic Co-operation and Development. Out-of-pocket expenditure on health. 2012a. (Health: Key Tables from OECD, No. 5) [citado 5 fev. 2013]. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/out-of-pocket-expenditure-on-health_oopexphtl-table-en.
- 190 Organisation for Economic Co-operation and Development. Pharmaceutical expenditure. 2012b. (Health: Key Tables from OECD, No. 7) [citado 5 fev. 2013]. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/pharmaceutical-expenditure_pharmexp-table-en.
- 191 Organisation for Economic Co-operation and Development. Total expenditure on health. 2012c. (Health: Key Tables from OECD, No. 1) [citado 5 fev. 2013]. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/total-expenditure-on-health_20758480-table1.
- 192 Organização Pan-Americana da Saúde. Perspectivas para o fortalecimento dos mercados de medicamentos similares e genéricos em países em vias de desenvolvimento: relatório final. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; 2005. 438 p.
- 193 Original abbreviated new drug application (ANDA) approvals january 2012 - december 2012. Silver Spring: Food and Drug Administration; 2012 [citado 12 fev. 2013]. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Reports.NewOriginal_ANDA#navigation.
- 194 Pan RN, Chen TS, Huang CSH, Hsiong CH. Pharmacokinetics and bioequivalent study of generic fluoxetine capsules preparation. *J Food Drug Anal*. 2002; 10:13-7.

-
- 195 Patnaik R, Lesko LJ, Chan K, Williams RL. Bioequivalence assessment of generic drugs: an American point of view. *Eur J Drug Met Pharmacokin.* 1996; 21:159-64.
- 196 Pentikis HS, Henderson JD, Tran NL, Ludden TM. Bioequivalence: individual and population compartmental modeling compared to the noncompartmental approach. *Pharm Res.* 1996; 13:1116-21.
- 197 Pietzonka P, Walter E, Duda-Johner S, Langguth P, Merkle HP. Compromised integrity of excised porcine intestinal epithelium obtained from the abattoir affects the outcome of *in vitro* particle uptake studies. *Eur J Pharm Sci.* 2002; 15:39-47.
- 198 Pillay V, Fassihi R. Evaluation and comparison of dissolution data derived from different modified release dosage forms: an alternative method. *J Control Release.* 1998; 55:45-55.
- 199 Polentarutti BI, Peterson AL, Sjöberg AK, Anderberg EKI, Utter LM, Ungell ALB. Evaluation of viability of excised rat intestinal segments in the Ussing chamber: Investigation of morphology, electrical parameters and permeability characteristics. *Pharmaceut Res.* 1999; 16:446-54.
- 200 Putnam WS, Pan L, Tsutsui K, Takahashi L, Benet LZ. Comparison of bidirectional cephalixin transport across MDCK and Caco-2 cell monolayers: Interactions with peptide transporters. *Pharm Res.* 2002; 19:27-33.
- 201 Pyrzynska K, Pobozy E. On-line coupling of solid phase extraction sample processing with high-performance liquid chromatography. *Crit Rev in Anal Chem.* 2002; 32:227-43.
- 202 Razdan B, Verma PK. Evaluation of dosage forms. III: studies on commercial acetaminophen tablet dosage forms. *Int J Pharm.* 1992, 79:83-88.
- 203 Recio DC, Delgado CAG, Ruano O, Fernandez AC. Bioequivalencia: introducción a la correlación *in vivo-in vitro*, parte I. *Rev Cubana Farm.* 1999; 33: 137-142.
- 204 Rendimento médio mensal domiciliar, por classes de salário mínimo. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2008 [citado 12 fev 2013]. Disponível em: <http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=PD248>.
- 205 Reppas C, Lacey LF, Keene ON, Macheras P, Bye A. Evaluation of different metrics as indirect measures of rate of drug absorption from extended release dosage forms at steady-state. *Pharm Res.* 1995; 12:103-107.
- 206 Rescigno A, Marzo A, Thyroff-Friesinger U. Mefenamic acid bioequivalence assessment with a new statistical procedure. *Pharmacol Res.* 1996; 34:149-52.
- 207 Ritschel WA, Kearns, GL. Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications. 7th. ed. Washington: American Pharmacists Association; 2009. 490 p.

- 208 Rowland M. Factors influencing bioavailability - an introduction with particular emphasis on metabolism. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15:299-300.
- 209 Rowland RN, Woodley JF. The uptake of distearoylphosphatidylcholine/cholesterol liposomes by rat intestinal sacs *in vitro*. *Biochim Biophys Acta.* 1981; 673:217-23.
- 210 Rumel D, Nishioka AS, Santos AAM. Drug interchangeability: clinical approach and consumer's point of view. *Rev Saúde Pública.* 2006; 40(5):1-7.
- 211 Sabatini S, Ferguson RM, Helderman JH, Hull AR, Kirkpatrick BS, Barr WH. Drug substitution in transplantation: a National Kidney Foundation white paper. *Am J Kidney Dis.* 1999; 33:389-97.
- 212 Said DMP. Registro sanitário de medicamentos: uma experiência de revisão [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Controle de Qualidade em Saúde; 2004.
- 213 Sandberg A, Abrahamsson B, Regardh CG. Pharmacokinetics of metoprolol enantiomers after administration of the racemate and the s-enantiomer as oral solutions and extended-release tablets. *Drug Invest.* 1993; 6:320-9.
- 214 Santos CA, Jacob JS, Hertzog BA, Freedman BD, Press DL, Harnpicharnchai P *et al.* Correlation of two bioadhesion assays: the everted sac technique and the CAHN microbalance. *J Control Rel.* 1999; 61:113-122.
- 215 Saseen JJ, Porter JA, Barnette DJ, Bauman JL, Zajac EJ, Carter BL. Postabsorption concentration peaks with brand-name and generic verapamil: a double-blind, crossover study in elderly hypertensive patients. *J Clin Pharmacol.* 1997; 37:526-34.
- 216 Schall R, Williams RL. Towards a practical strategy for assessing individual bioequivalence. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1996; 24:133-49.
- 217 Schulz HU, Steinijans VW. Striving for standards in bioequivalence assessment: a review. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1991; 29:293-8.
- 218 Selwyn MR, Dempster AP, Hall NR. A bayesian approach to bioequivalence for the 2 x 2 changeover design. *Biometrics.* 1981; 37:11-21.
- 219 Senn S. In the blood: proposed new requirements for registering generic drugs. *Lancet.* 1998; 352: 85-86.
- 220 Shah JC. Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method. *Int J Pharm.* 1993; 90:161-9.
- 221 Shargel L, Wu-Pong S, Yu ABC. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics.* 5th.ed. New York: The McGraw-Hill Companies; 2005. 892 p.
- 222 Shirkey HG. Therapeutic reliability of variously manufactured drugs: generic-therapeutic equivalence. *J Pediatr.* 1970; 76:774-6.

-
- 223 Shrank WH, Cox ER, Fisher MA, Mehta J, Choudhry NK. Patients' perceptions of generic medications. *Health Aff.* 2009; 28:546–56.
- 224 Sibbison JB. Corruption at the FDA. *Lancet.* 1989a; 334:554.
- 225 Sibbison JB. Misrepresentation by manufacturers of generic drugs. *Lancet.* 1989b; 334:733.
- 226 Singh, B. Effects of food on clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 37:213-55, 1999.
- 227 Sjögren J. Formulation factors influencing the bioequivalence of drug. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15:297-8.
- 228 Sneddon J, Masuram S, Richert JC. Gás chromatography – mass spectrometry: basic principles, instrumentation and selected applications for detection of organic compounds. *Anal Lett.* 2007; 40:1003-12.
- 229 Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC method development.* 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1997. 766p.
- 230 Snyder LR, Kirkland JJ. *Introduction to modern liquid chromatography.* 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1979. 864p.
- 231 Srinivas NR, Barr WH, Shyu WC, Mohandoss E, Chow S, Staggers J, Balan G, Belas FJ, Blair IA, Barbhuiya RH. Bioequivalence of two tablet formulations of nadolol using single and multiple dose data: assessment using stereospecific and nonstereospecific assays. *J Pharm Sci.* 1996; 85:299-303.
- 232 Srinivas NR. Role of stereoselective assays in bioequivalence studies of racemic drugs: have we reached a consensus? *J Clin Pharmacol.* 2004; 44:115-9.
- 233 Steinijans VW, Dietrich R, Trautmann H, Sauter R, Benedikt G. A novel approach to the specification of in-vitro dissolution boundaries based on regulatory requirements for bioequivalence. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 1988; v.38-II:1238-40.
- 234 Steinijans VW, Hauschke D. Update on the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1990; 28:105-110.
- 235 Steinijans VW, Sauter R, Jonkman JHG, Schulz HU, Stricker H, Blume H. Bioequivalence studies: single vs multiple dose. *Int. J. Clin. Pharmacol., Ther. Toxicol.* 1989; 27:261-6.
- 236 Su SF, Chou CH, Kung CF, Huang JD. *In vitro* and *in vivo* comparison of two diclofenac sodium sustained release oral formulations. *Int J Pharm.* 2003; 260:39-46.
- 237 Tanaka N, Imai K, Okimoto K, Ueda S, Tokunaga Y, Ohike A *et al.* Development of novel sustained release system, disintegration controlled matrix tablet (DMCT) with solid dispersion granules of nilvadipine. *J Control Release.* 2005; 108:386-96.

- 238 Tothfalusi L, Endrenyi L. Limits for the scaled average bioequivalence of highly variable drugs and drug products. *Pharm Res.* 2003; 20:382-389.
- 239 Trapani G, Franco M, Trapani A, Lopodota A, Gallucci E, Micelli S *et al.* Frog intestinal sac: a new *in vitro* method for the assessment of intestinal permeability. *J Pharm Sci.* 2004; 93:2909-19.
- 240 Tsang YC, Pop R, Gordon P, Hems J., Spino M. High variability in drug pharmacokinetics complicates determination of bioequivalence: experience with verapamil. *Pharm Res.* 1996; 13:846-50.
- 241 U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Office of Pharmaceutical Science. Office of generic Drugs. Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations. 32a. ed. 2012. 1297 p.
- 242 U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: statistical approaches to establishing bioequivalence. 2001. 45 p.
- 243 U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products – general considerations. 2003. 23 p.
- 244 U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of *in vitro/in vivo* correlations. 1997. 24 p.
- 245 U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. 2000. 13 p.
- 246 United States. Code of Federal Regulations. Title 21: Food and Drug Administration. Part 320: Bioavailability and bioequivalence requirements. 2012; 190-205 [citado 04 Mar 2013]. Disponível em: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2012-title21-vol5/pdf/CFR-2012-title21-vol5-part320.pdf>
- 247 Uppoor VRS. Regulatory perspectives on *in vitro* (dissolution)/*in vivo* (bioavailability) correlations. *J Control Release*; 2001; 72:127-32.
- 248 Van Petten GR, Feng H, Withey RJ, Lettau F. The physiological availability of solid dosage forms of phenylbutazone. *J Clin Pharmacol.* 1971; 11:177-96.
- 249 Vaz AJ, Takei K, Bueno EC. Imunoensaios: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. 372p.
- 250 Volpe DA. Application of method suitability for drug permeability classification. *AAPS J.* 2010 ;12:670-8.

-
- 251 Wahlund G, Nerme V, Abrahamsson T, Sjoquist PO. The β 1- and β 2-adrenoceptor affinity and β 1-blocking potency of S- and R-metoprolol. *Br J Pharmacol*. 1990; 99:592-6.
- 252 Wellek S. A new approach to equivalence assessment in standard comparative bioavailability trials by means of the Mann-Whitney statistic. *Biom. J.* 1996; 38:695-710.
- 253 Wellek S. Basing the analysis of comparative bioavailability trials on an individualized statistical definition of equivalence. *Biom J.* 1993; 35:47-55.
- 254 Westlake WJ. Statistical aspects of comparative bioavailability trials. *Biometrics*. 1979; 35:273-80.
- 255 Westlake WJ. Symmetrical confidence intervals for bioequivalence trials. *Biometrics*. 1976; 32: 741-4.
- 256 Wijnand HP. Assessment of average, population and individual bioequivalence in two- and four-period crossover studies. *Comp Meth Prog Biomed*. 2003; 70:21-35.
- 257 Williams RL, Upton RA, Ball L, Braun RL, Lin ET, Liang-Gee W *et al.* Development of a new controlled release formulation of chlorpheniramine maleate using *in vitro* *in vivo* correlations. *J Pharm Sci*. 1991; 80:p.22-5.
- 258 Wilner AN. Therapeutic equivalency of generic antiepileptic drugs: results of a survey. *Epilepsy Behav*. 2004; 5:995-8.
- 259 World Health Organization. Forty-sixth report of the WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations. Geneva: World Health Organization; 2012. 235 p. (WHO technical report series n. 970)
- 260 World Health Organization. Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials. Vol. 1. Geneva: World Health Organization; 1997. 238 p.
- 261 Wu AHB. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*. 2006; 369:119-24.
- 262 Yacobi A, Zlotnick S, Colaizzi JL, Moros D, Masson E, Abolfathi Z, Lebel M, Mehta R, Golander Y, Levitt B. A multiple-dose safety and bioequivalence study of a narrow therapeutic index drug: a case for carbamazepine. *Clin Pharmacol Ther*. 1999; 65:389-94.
- 263 Yau MKT, Meyer MC. *In vivo-in vitro* correlation with a commercial dissolution simulator. II: papaverine, phenytoin and sulfisoxazole. *J Pharm Sci*. 1983; 72:681-6, 1983.
- 264 Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Tajerzadeh H, Azarmi Y, Islambolchilar Z, Barzegar S *et al.* Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2007; 10:368-79.

- 265 Zariffa NMD, Patterson SD. Population and individual bioequivalence: lessons from real data and simulation studies. *J Clin Pharmacol* 2001; 41:811-822.