

Universidade Estadual de Campinas

LIGIA RODRIGUES PIOTO

**“ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA ENTRE DUAS
FORMULAÇÕES DE METOTREXATO EM PLASMA HUMANO
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE”**

Orientador: José Luiz Donato

**Campinas
2006**

Universidade Estadual de Campinas

LIGIA RODRIGUES PIOTO

**“ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA ENTRE DUAS
FORMULAÇÕES DE METOTREXATO EM PLASMA HUMANO
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE”**

**Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Mestre em Farmacologia**

Orientador: José Luiz Donato

**Campinas
2006**

UNIDADE BC
Nº CHAMADA: T/UNICAMP P659e
V. _____ EX. _____
TOMBO BCCL 73431
PROC 16-145-07
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA 24/07/07
BIB-ID 416591

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8º / 6044

P659e

Pioto, Ligia Rodrigues

Estudo de biodisponibilidade relativa entre duas formulações de metotrexato em plasma humano utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em série / Ligia Rodrigues Pioto. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: José Luiz Donato

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bioequivalência. 2. Cromatografia líquida. 3. Espectrometria de massa. I. Donato, José Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Liquid chromatography-mass spectrometry method for determination of methotrexate in human plasma

Keywords: • Bioequivalence
• Chromatography, liquid
• Tandem mass spectrometry

Titulação: Mestrado em Farmacologia

**Banca examinadora: Prof^o. Dr^o. José Luiz Donato
Prof^o. Dr^o. Ronilson Agnaldo Moreno
Prof^o. Dr^o. Sisi Marcondes Paschoal**

Data da defesa: 15-01-2007



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Donato

Membros:

Prof. Dr. José Luiz Donato

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal



Sisi Marcondes Paschoal

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/01/2007

00731797

Sumário

1.Introdução.....	15
1.1 Propriedades.....	16
1.1.1 Mecanismo de Ação.....	18
1.2 Propriedades Farmacocinéticas.....	20
1.2.1 Absorção.....	20
1.2.2 Eliminação.....	20
1.2.3 Distribuição.....	21
1.2.4 Metabolismo.....	22
1.3 Indicações.....	22
1.3.1 Indicações em Oncologia.....	22
1.3.2 Indicações não-oncológicas.....	23
1.4 Reações Adversas.....	23
1.4.1 Efeitos Gastrointestinais.....	24
1.4.2 Hipersensibilidade e Efeitos Dermatológicos.....	24
1.4.3 Efeitos Pulmonares.....	25
1.4.4 Efeitos sobre o Sistema Nervoso Central.....	25
1.4.5 Gonadotóxico Esterilizante.....	25
1.4.6 Carcinogenicidade.....	26
1.4.7 Nefrotoxicidade.....	26
1.4.8 Hepatotoxicidade.....	26
1.5 Contra Indicações.....	27
1.6 Interações Medicamentosas.....	27
1.7 Considerações Gerais.....	28

1.8 Biodisponibilidade e Biodisponibilidade Relativa.....	29
1.8.1 Etapa Clínica.....	31
1.8.2 Etapa Analítica.....	32
1.8.3 Etapa Estatística.....	33
1.9 Quais as Vantagens dos Medicamentos Genéricos.....	33
1.10 Metodologias Analíticas Utilizadas para Quantificar Metotrexato.....	34
2. Objetivos.....	35
3. Materiais e Métodos.....	37
3.1 Etapa Clínica.....	38
3.1.1 Desenho do Estudo.....	38
3.1.2 População do Estudo.....	38
3.1.3 Critérios para Inclusão do Voluntário.....	39
3.1.4 Critérios para Exclusão do Voluntário.....	39
3.1.5 Restrições e Proibições.....	40
3.1.6 Critérios de Retirada do Voluntário.....	41
3.1.7 Exames Clínicos Laboratoriais.....	42
3.1.8 Condutas Permitidas e Não Permitidas Antes e Durante o Estudo Clínico.....	44
3.1.9 Administração da Medicação.....	44
3.1.10 Cronograma das Coletas das Amostras.....	45
3.1.11 Coleta, Manipulação, Armazenagem e Transporte das Amostras.....	46
3.1.12 Avaliação de Segurança.....	46
3.1.13 Registro e Análise dos Parâmetros de Segurança.....	47
3.2 Ética.....	48
3.2.1 Comitê de Ética em Pesquisa.....	48

3.2.2 Conduta do Estudo.....	48
3.3 Etapa Analítica.....	49
3.3.1 Método Bioanalítico.....	49
3.3.2 Condições Analíticas.....	49
3.3.3 Procedimento para o Tratamento Biológico.....	50
3.3.4 Padrões de Referência.....	51
3.3.5 Codificação das Amostras.....	51
3.3.6 Cálculos de Concentração das Amostras.....	51
3.3.7 Validação do Método Analítico.....	51
3.4 Etapa Estatística.....	56
3.4.1 Parâmetros Farmacocinéticos.....	56
4. Resultados e Discussões.....	58
4.1 Etapa Analítica.....	59
4.1.2 Parâmetros da Validação.....	61
4.1.2.1 Especificidade.....	61
4.1.2.2 Limite de Quantificação.....	61
4.1.2.3 Precisão e Exatidão.....	62
4.1.2.4 Linearidade.....	63
4.1.2.5 Recuperação.....	64
4.1.2.6 Estabilidades.....	65
4.1.3 Análise dos Voluntários.....	67
4.2 Etapa Estatística.....	68
4.2.1 Análise das Concentrações Plasmáticas Individuais.....	68
5. Discussão.....	71

6. Conclusão.....	76
7. Referências Bibliográficas.....	78
8. Anexos.....	86

Tabelas

Tabela 1 – Interações Medicamentosas do Metotrexato.....	27
Tabela 2 – Tabela Estatística Descritiva dos Dados dos Voluntários.....	39
Tabela 3 – Exames Laboratoriais Pré/Pós-Estudo.....	43
Tabela 4 – Administração dos Medicamentos.....	44
Tabela 5 – Cronograma das Coletas das Amostras.....	45
Tabela 6 – Condições Cromatográficas utilizadas para o estudo de validação.....	49
Tabela 7 – Condições do Espectrômetro de Massas.....	50
Tabela 8 – Parâmetros Individuais dos íons monitorados (MRM).....	50
Tabela 9 – Padrões de Referência.....	51
Tabela 10 – Resultados do Limite de Quantificação.....	62
Tabela 11 – Resultados dos testes de Precisão e Exatidão.....	63
Tabela 12 – Dados das curvas de calibração das validações.....	64
Tabela 13 – Recuperação do Metotrexato.....	65
Tabela 14 – Recuperação do Folinato de Cálcio.....	65
Tabela 15 – Valores dos desvios das estabilidades.....	66
Tabela 16 – Estabilidades das soluções padrão.....	67
Tabela 17 – Médias e IC (90%) dos parâmetros farmacocinéticos.....	69
Tabela 18 – Valores das médias geométricas e do IC 90% para C _{max} , ASC 0-t (h) e ASC 0-∞.....	70

Figuras

Figura 1 – Espectros de massas dos “íons-filhos” obtidos das moléculas protonadas [M +H] ⁺ do (1) metotrexato (455® 308) e (2) folinato de cálcio (PI) (474®326).....	59
Figura 2 – Possíveis fragmentações das moléculas protonadas de Metotrexato (1) e Folinato de Cálcio (2).....	60
Figura 3 – Cromatogramas de (1) limite de quantificação 10 ng mL ⁻¹ e do (2) plasma branco.....	62
Figura 4 – Dados das curvas de calibração.....	64
Figura 5 – Curva Média da concentração dos dois medicamentos Reutrexato® (referência) e Metotrexato (teste), baseada em 24 voluntários.....	69

Abreviações e Siglas

a-GST – Enzima alfa glutationa-S-transferase.

AINES – Antiinflamatórios não esteróides

AIRCAR – Enzima aminoimidazolecarboxiamido ribonucleotídeo transformilase.

ALP – Enzima fosfatase alcalina.

ALT - Enzima alanina aminotransferase.

ANOVA – Análise da Variância.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ASC - Área sob a curva.

AST - Enzima aspartato aminotransferase.

°C – Graus Celsius.

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa.

CG/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência.

Cmax - Pico de concentração máxima.

CMD – Concentração média determinada.

CQ – Controle de qualidade.

CV – Coeficiente de variação.

CONEP – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa.

d.i. – Diâmetro interno.

DPR – Desvio padrão relativo.

ES+ - Electrospray no modo positivo.

eV - Elétron Volt.

FDA – Food and Drug Administration

Gama GT - Enzima gama-glutamyltransferase.

GGT - Enzima gama glutamil transpeptidase

GT - Enzima gama glutamil transferase

HIV - Human Immunodeficiency Vírus.

IC – Índice de confiança.

IMC – Índice de massa corpórea.

Kg - Kilograma

LC/MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série.

LD – Limite de detecção.

LDH – Enzima lactato-desidrogenase.

LIQ – Limite inferior de quantificação.

m – Metro.

m² – Metro quadrado.

mL – Mililitros.

mmHg – Milímetros de mercúrio.

MRM – Monitoramento de múltipla reação.

MS – Ministério da Saúde.

MTX – Metotrexato.

m/z - Relação massa carga.

PA – Pressão arterial.

PI – Padrão Interno.

rpm – Rotações por minuto.

RX – Raio X.

SNC – Sistema Nervoso Central.

SCPCM – Sistema de Controle de Pesquisas Clínicas de Medicamentos.

TGO - Enzima transaminase glutâmica oxalacética.

TGP – Enzima transaminase glutâmica pirúvica.

T_{max} - Tempo para ocorrer o pico de concentração máxima.

t_{1/2} - Tempo de meia vida do fármaco.

UV – Ultravioleta.

V – Volt.

Resumo

Foi desenvolvido um método rápido, sensível e específico para determinação de metotrexato em plasma sanguíneo humano por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série usando folinato de cálcio como padrão interno. O metotrexato foi extraído do plasma humano, utilizando-se precipitação de proteínas plasmáticas com acetonitrila como eluente. O método tem uma corrida cromatográfica de 3,5 minutos usando uma coluna analítica C₁₈ (4,6 mm x 75 mm d.i, 3.5 µm tamanho das partículas) e a curva de calibração foi linear de 10 a 300 ng.mL⁻¹. A recuperação do método de extração foi, em média, de 76,5% e o limite de quantificação para o metotrexato foi de 10 ng.mL⁻¹.

Abstract

A rapid, sensitive and specific method was developed for the determination and quantitation of methotrexate, in human blood plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry using calcium folinate as internal standard. Methotrexate was extracted from 0,2 mL human plasma by protein precipitation procedure using acetonitrile as eluent. The method included a chromatographic run of 3,5 minutes using a C₁₈ analytical column (4,6 mm x 75 mm i.d., 3.5 µm particle size) and the linear calibration curve over the range from 10 to 300 ng mL⁻¹. Recoveries were greater than 76.5% and the limit of quantitation of methotrexate was 10 ng mL⁻¹.

1. Introdução

1.1 Propriedades do MTX

O metotrexato (MTX) (ácido 4-amino-10 metil fólico) é um antimetabólito e análogo do ácido fólico (BLEYER, 1978). Desde 1953 o MTX é utilizado no tratamento oncológico e a partir de 1958 foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) como agente antipsoriásico (MARTINS e ARRUDA, 2004).

O que diferencia a indicação é a dose administrada. Altas doses (30 a 120 mg/m²/semana) são indicadas para o uso oncológico (ZUOXIANG et al., 1997), enquanto a terapia com baixas doses (5-15 mg/semana) é indicada no tratamento de doenças não malignas como psoríase (ROENICK et al., 1988 E TERNOWITZ et al., 1987) e artrite reumatóide (SANTOS et al., 1995).

A dose do MTX para indicações oncológicas é habitualmente baseada na área de superfície corpórea (m²) do paciente ou no peso corpóreo (kg). Entretanto, se o paciente for obeso ou tiver retenção hídrica grave, a dosagem deve ser baseada no peso corpóreo ideal estimado.

A faixa de dose terapêutica do MTX para indicações oncológicas é muito ampla. A dose, as vias intravenosa, intramuscular, intratecal e esquemas de administração variam de acordo com a doença que está sendo tratada, os tratamentos citotóxicos concomitantes que estão sendo empregados (fármacos e radioterapia), a condição do paciente e a disponibilidade de adequadas medidas quimioprotetoras/ de suporte (DOLLERY C., 1999).

No tratamento da psoríase, o MTX é indicado para a forma eritrodérmica, pustulosa generalizada ou palmoplantar e nos pacientes não responsivos a tratamentos tópicos e à fototerapia. A seleção do paciente deverá ser cuidadosa, levando-se em consideração a relação risco/benefício, uma vez que, há relatos de mortes relacionadas ao uso de MTX no tratamento da psoríase. Por isso, no tratamento dessa patologia, a droga deve ser reservada aos casos graves,

rebeldes ou incapacitantes que não tenham respondido adequadamente às formas usuais de terapia. Uma vez definida a opção pelo MTX, o paciente fará exames laboratoriais, que deverão ser repetidos regularmente (MARTINS e ARRUDA, 2004).

A avaliação pré-MTX compreende: hemograma completo com contagem de plaquetas, bioquímica do sangue e enzimas (uréia, glicose, creatinina, transaminase glutâmico-oxalacética – AST, transaminase glutâmico-pirúvica – ALT, gama glutamil transferase-gama GT, fosfatase alcalina, bilirrubinas, proteinograma), sumário de urina, sorologias para hepatite B e C e RX de tórax (MARTINS e ARRUDA, 2004).

No primeiro mês, quando possível, o hemograma deverá ser repetido semanalmente, pois a mielotoxicidade é o efeito colateral mais grave em curto prazo. A seguir, os exames de controle passam a ser mensais e, depois, trimestrais, na dependência dos sinais e sintomas apresentados por cada paciente. Como os valores das enzimas hepáticas costumam estar alterados nos dois primeiros dias após a administração do MTX, a coleta de sangue deverá ser feita seis ou sete dias após a última dose (ROENIGK et al., 1988). Eventualmente, há aumento temporário das dosagens de AST e ALT, se o aumento for significativo (mais do que o dobro das taxas normais), deve-se suspender o tratamento durante o período de uma ou duas semanas e repetir a bateria de testes que, geralmente, reverterem ao normal; se os valores persistirem por duas ou mais coletas, o tratamento deve ser descontinuado, e a biópsia hepática, considerada (ROENIGK et al., 1988, ROENIGK et al., 1998 e LEBWOHL e ALI, 2001).

Em caso de toxicidade hematológica aguda ou superdosagem acidental de MTX, é preciso prescrever imediatamente, por via parenteral, seu antídoto, o ácido folínico ou fator citrovorum ou leucovorina em dose semelhante à do MTX (BOURNERIAS e CHOSIDOW, 1994, ROENIGK et al., 1988 e OLSEN, 1991). Doses menores que 50mg/m^2 são geralmente

administradas sem o uso de folinato de cálcio, porém doses maiores requerem o uso do folinato de cálcio (DOLLERY C., 1999).

O MTX mostrou efeitos favoráveis no tratamento de doença reumatóide relatados primeiramente por GUBNER et al., 1951 e, desde então, outros testes terapêuticos abertos têm sugerido que esta droga é eficaz no tratamento da doença reumatóide (WEINBLAT et al., 1985, WILLIAMS et al., 1985 e WEINBLAT et al., 1998).

WEINBLAT et al., 1985, utilizando MTX em doses baixas, relataram diminuição da dor e do edema das articulações em grande parte dos pacientes tratados anteriormente sem remissão da doença, eficácia esta que persiste de forma prolongada durante anos (WEINBLAT et al., 1998).

Comparado com outras drogas de base ou de controle da doença reumatóide, MTX mostra resposta mais rápida, ou seja, início mais rápido de ação, e se presta mais ao uso prolongado em determinados pacientes, sendo sua toxicidade o maior fator limitante do seu uso (NOVAES e MELLO, 2000).

1.1.1 Mecanismo de ação

O fármaco entra nas células através de um sistema de transporte ativo para folatos reduzidos e, devido à ligação relativamente irreversível, inibe a enzima diidrofolato redutase, que catalisa o processo de redução do ácido fólico a ácido tetraidrofólico (RANG et al., 2001).

A formação inibida de tetraidrofolatos resulta na interferência da síntese e reparo do DNA e replicação celular. A afinidade da diidrofolato redutase pelo metotrexato é muito maior que a sua afinidade pelo ácido fólico ou diidrofólico, de forma que mesmo administrando-se simultaneamente grandes quantidades de ácido fólico, os efeitos do metotrexato não serão totalmente revertidos. Esta é a base para o seu uso antineoplásico (RANG et al., 2001 e WILSON et al., 1991).

O fármaco parece também causar um aumento no trifosfato de desoxiadenosina intracelular. Acredita-se que essa substância iniba a redução de ribonucleotídeos e polinucleotídeo ligase (enzima relacionada com a síntese e reparo do DNA) (CRONSTEIN et al., 1993 e MORABITO et al., 1998).

Sendo considerado quimioterápico específico da fase S (de síntese) do ciclo celular (BOURNERIAS e CHOSIDOW, 1994 e OLSEN, 1991), sua ação é mais marcante sobre populações celulares em fase de crescimento exponencial, o que explica o efeito seletivo sobre células tumorais e ação sobre tecidos em proliferação.

Embora os efeitos específicos do MTX no metabolismo dos folatos tenham sido extensivamente delineados, seu mecanismo de ação nas doenças reumatóides e psoríase permanece desconhecido (BLEYER, 1978 e CRONSTEIN, 1997).

Alguns investigadores sugerem que o MTX exerça seus efeitos terapêuticos através de mecanismo antiinflamatório (JOHNSON et al., 1986).

Uma explicação alternativa para o mecanismo de ação do MTX baseia-se na capacidade de seus derivados poliglutamados inibirem enzimas envolvidas no metabolismo e síntese de purinas e piridiminas, em especial a aminoimidazolecarboxiamido ribonucleotídeo (AIRCAR) transformilase (CHABNER et al., 1985 e BAGGOTT et al., 1986).

NESHER et al., (1991), propõem ainda que o MTX tem a capacidade de inibir reações de transmetilação, inibindo a formação de s-adenosilmetionina, o doador de grupamentos metil em muitas reações enzimáticas desse tipo.

Ainda não foi estabelecida relação definitiva entre a ação antifolato e seus efeitos anti-reumáticos (NESHER et al., 1991).

1.2 Propriedades Farmacocinéticas

1.2.1 Absorção

Doses orais baixas (até 25-30 mg/m²) são rapidamente absorvidas no trato gastrintestinal, mas a absorção de doses maiores é irregular, possivelmente devido ao efeito de saturação. Entretanto, foi detectada uma variabilidade na absorção do metotrexato em pacientes recebendo tratamento oral devido à desnudação epitelial, mudanças na motilidade e alterações da flora intestinal induzidas pelo fármaco (DOLLERY C., 1999). Consegue-se uma absorção rápida e completa do MTX após administração intramuscular e os níveis séricos máximos são obtidos dentro de 0,5-2 horas (MARTINS e ARRUDA, 2004).

Foi demonstrado que alimentos leitosos e alguns antibióticos como Neomicina podem diminuir a biodisponibilidade do fármaco (MARTINS e ARRUDA, 2004).

O MTX difunde-se e se acumula nos glóbulos vermelhos e no soro. Cerca de 50% do medicamento é ligado de maneira reversível à albumina, o que faz com que o uso concomitante de outros medicamentos que também se ligam às proteínas possa aumentar sua toxicidade hematológica (MARTINS e ARRUDA, 2004).

1.2.2 Eliminação

Uma vez absorvido, os níveis de MTX no plasma têm redução trifásica – a rápida fase de distribuição é seguida de uma segunda fase de duas a quatro horas que reflete a excreção renal; a terceira fase representa a meia-vida terminal de 10 a 27 horas e é secundária à circulação entero-hepática. Se essa meia-vida terminal for devidamente prolongada em consequência de insuficiência renal, pode ser responsável pelos principais efeitos tóxicos da droga sobre a medula óssea e sobre o trato gastrintestinal (MARTINS e ARRUDA, 2004).

Entre 50 e 90% do MTX é eliminado por via renal, por filtração glomerular e, em menor grau, por secreção tubular, que fica diminuída na presença de antiinflamatórios não esteróides (AINES) ou sulfamidas. Sendo um ácido orgânico fraco, que é predominantemente excretado pelos rins, deve ser evitado o uso concomitante com outros ácidos orgânicos fracos, como salicilatos, que diminuem o transporte tubular renal e podem prolongar a excreção do MTX (MARTINS e ARRUDA, 2004).

Além disso, existe uma farmacocinética idade-dependente do MTX, com maior distribuição e maior eliminação da droga em jovens; e devem ser tomados os devidos cuidados nos pacientes geriátricos, devido a uma possível diminuição da função renal (ROENIGK et al., 1998, ROENIGK et al., 1988 e OLSEN, 1991).

1.2.3 Distribuição

Aproximadamente 50% do metotrexato absorvido está ligado reversivelmente às proteínas séricas, mas se difunde facilmente para as células dos tecidos corpóreos, onde o fármaco é transportado ativamente através das membranas celulares. O metotrexato é amplamente distribuído para os tecidos corpóreos, sendo que as maiores concentrações são encontradas nos rins, vesícula biliar, baço, fígado e pele (FLOMBAUM e MEYERS, 1999).

Quantidades pequenas ou insignificantes atravessam a barreira hematoencefálica e atingem o líquidocefalorraquidiano, após a administração oral ou parenteral, que podem ser aumentadas quando são administradas doses maiores. Foram detectadas pequenas quantidades na saliva e no leite. O fármaco atravessa a barreira placentária (DOLLERY C., 1999 e ACKLAN e SCHILSKY, 1987).

O MTX pode ficar retido por várias semanas nos rins e, por meses, no fígado, mesmo após uma única dose terapêutica. As concentrações séricas podem se manter e o MTX pode se acumular nos tecidos após doses diárias repetidas (DOLLERY C., 1999).

1.2.4 Metabolismo

O fármaco não parece sofrer metabolização significativa em doses baixas, porém após tratamento com doses elevadas, o MTX sofre metabolização hepática e intracelular para formas poliglutamadas que podem ser reconvertidas a MTX por enzimas do tipo hidrolase. Pode ocorrer pequena metabolização para derivados 7-hidroxi. Antes da absorção, o metotrexato pode ser parcialmente metabolizado pela flora intestinal para o ácido 2,4-diamino-N10-metilpteróico, um metabólito farmacologicamente inativo (DONEYHOWER et al., 1979).

1.3 Indicações

1.3.1 Indicações em Oncologia

MTX é indicado para o tratamento dos seguintes tumores sólidos e neoplasias malignas hematológicas:

- Neoplasias trofoblásticas gestacionais (coriocarcinoma uterino, corioadenoma destruens e mola hidatiforme);
- Leucemias linfocíticas agudas;
- Câncer pulmonar de células pequenas;
- Câncer de cabeça e pescoço (carcinoma de células escamosas);
- Câncer de mama;
- Osteossarcoma;

- Tratamento e profilaxia de linfoma ou leucemia meníngea;
- Terapia paliativa de tumores sólidos inoperáveis;
- Linfomas não-Hodgkin e linfoma de Burkitt.

1.3.2 Indicações não-oncológicas

- Psoríase grave
- Artrite Reumatóide

(HESTON et al; 2004, RANG et al., 2001 e WILSON et al., 1991)

1.4 Reações Adversas

Muitos dos efeitos colaterais da terapia com MTX não podem ser evitadas, tendo em vista as ações farmacológicas. Entretanto, os efeitos adversos são geralmente reversíveis se detectados precocemente.

Os principais efeitos tóxicos do MTX ocorrem em tecidos normais de proliferação rápida, particularmente da medula óssea e do trato gastrintestinal.

Ulcerações da mucosa oral são, habitualmente, os sinais mais precoces de toxicidade. As reações adversas mais comuns incluem estomatite, leucopenia, trombocitopenia, anemia megaloblástica, náusea, desconforto abdominal e fotossensibilidade; entretanto, como ocorre com outros fármacos, podem ocorrer outras toxicidades com frequências e intensidades diferentes de acordo com as várias doses/vias de administração (BOURNERIAS e CHOSIDOW, 1994).

As reações adversas relatadas são as seguintes:

1.4.1 Efeitos Gastrointestinais

Podem ocorrer mucosite (estomatite, gengivite, glossite, enterite), bem como náuseas, vômitos e diarreia. As conseqüências clínicas dessa toxicidade podem ser ulceração e sangramento das membranas mucosas da boca e/ou outras porções do trato gastrointestinal, perfuração intestinal, desconforto abdominal, anorexia. A administração de metotrexato tem sido associada com hepatotoxicidade aguda e crônica. É comumente relatada a alteração dos testes de função hepática (aumentos nos níveis de transaminases e LDH), mas isso geralmente se resolve dentro de um mês da cessação da terapia. (SPECKMAIER, 1989, TRUCKENBRODT e HAFNER, 1986, DANÃO et al., 1989 e GRAHAM et al., 1992).

O risco de desenvolver hepatotoxicidade crônica em pacientes com psoríase parece estar correlacionado, não somente com as doses cumulativas do fármaco, mas também com a presença de condições concomitantes como alcoolismo, obesidade, diabetes, idade avançada e uso de compostos arsenicais (BOURNERIAS e CHOSIDOW, 1994, SASAKI et al; 1991, OSTENSEN e FUHRER, 2004 e KOREN e LISHNER, 2004).

1.4.2 Hipersensibilidade e Efeitos Dermatológicos

Foram relatadas erupções cutâneas eritematosas, urticária, prurido, reações anafiláticas, ulceração/necrose da pele compatíveis com necrólise epidérmica tóxica, dermatites, acne/furunculose/foliculite, vasculite, petéquias, equimoses, teleangiectasias, fotossensibilidade, despigmentação/hiperpigmentação da pele e alopecia após a administração de metotrexato. Podem aparecer queimaduras e eritema em áreas psoriáticas por 1-2 dias após cada dose, agravadas por exposição concomitante à radiação ultravioleta (GOERTTLER et al., 1999 e WILSON et al., 1991).

1.4.3 Efeitos Pulmonares

Podem ocorrer pneumonite intersticial, fibrose intersticial, infiltrados pulmonares e eosinofílicos reversíveis. Foi ocasionalmente relatada patologia pulmonar intersticial crônica.

As manifestações de toxicidade pulmonar induzidas pelo metotrexato incluem febre, tosse (principalmente seca e não produtiva), dispnéia, dor torácica, hipoxemia e/ou evidência radiológica de infiltrados pulmonares (geralmente difusos e/ou alveolares) (MARTINS e ARRUDA, 2004, TRUCKENBRODT e HAFNER, 1986 e GRAHAM et al., 1992).

1.4.4 Efeitos sobre o SNC

Relatou-se neurotoxicidade em pacientes recebendo metotrexato intratecal ou em altas doses. A aracnoidite química manifesta-se através de cefaléia, dor nas costas e rigidez de nuca. Uma forma subaguda de toxicidade pode caracterizar-se por vários graus de paresia. (SASAKI et al; 1991, OSTENSEN e FUHRER, 2004, SAYGILI e GOL, 2005 e KOREN e LISHNER, 2004).

1.4.5 Gonadotóxico e Esterilizante

Foi demonstrado que MTX é capaz de provocar a destruição de folículos ovários e exercer efeitos gonadotóxicos nos homens mesmo nas doses usadas para o tratamento crônico de doenças reumáticas; estes fatores devem ser levados em conta quando o MTX é administrado a pacientes jovens e que ainda desejam constituir família. Por vezes, os homens são mesmo aconselhados a guardar esperma em um “banco de esperma” quando não há outra opção terapêutica possível (KOREN e LISHNER., 2004, OSTENSEN e FUHRER, 2004, SAYGILI e GOL, 2005).

1.4.6 Carcinogenicidade

Relatou-se que fármacos citotóxicos estão associados com risco aumentado de desenvolvimento de tumores secundários em seres humanos. Foi relatada evidência de danos cromossômicos em células somáticas de animais e em células de medula óssea de seres humanos com metotrexato (BOURNERIAS e CHOSIDOW, 1994 e LEBWOHL e ALI, 2001).

1.4.7 Nefrotoxicidade

Falência renal aguda, quando se usam doses elevadas; deve-se à precipitação do fármaco ou seu metabolito nos túbulos renais. A dose a usar de metotrexato deve ser reduzida na insuficiência renal ligeira e a administração deve ser evitada em casos de insuficiência renal moderada ou grave (WILSON et al., 1991).

1.4.8 Hepatotoxicidade

Hepatopatia irreversível (cirrose) quando usado em longo prazo em doses baixas; nos casos mais graves pode levar à necessidade de um transplante hepático. As funções hepáticas devem ser monitoradas em doentes que recebem doses cumulativas superiores a 1,5g; se observarem alterações nos níveis de transaminases deve-se efetuar uma biopsia. A freqüente monitorização dos níveis de ALT, AST, GGT, ALP, albumina plasmática e a-GST (esta última – Alfa-glutationa-S-transferase – é um indicador sensível de danos nos hepatócitos e cuja concentração aumenta de um modo mais expressivo após a administração de metotrexato) leva à detecção mais precoce de possíveis danos hepáticos o que diminui a necessidade de realização de biopsias (diminuição da morbidade do doente e dos custos). Devem-se evitar as indicações não

neoplásicas em pacientes com insuficiência hepática. (DUFOUR e KAPLAN, 1996; GILBERT et al; 1990 e SHAW et al., 2004)

1.5 Contra Indicações

O fármaco é contra-indicado a pacientes com hipersensibilidade conhecida ao metotrexato ou a qualquer componente da fórmula e àqueles portadores de insuficiência renal grave. A presença de insuficiência hepática, alcoolismo, depressão da medula óssea (presença de anemia grave e/ou leucopenia grave e/ou trombocitopenia), infecções graves, úlcera péptica ou colite ulcerativa, gravidez e aleitamento requerem extrema cautela no uso do metotrexato para terapia antineoplásica enquanto representam contra-indicações para o uso em pacientes com psoríase (BOURNERIAS e CHOSIDOW, 1994, ROENIGK et al., 1988 e ROENIGK et al., 1998).

1.6 Interações Medicamentosas

Tabela 1: Interações medicamentosas do MTX

Fármaco	Interação
Cloroquina	Reduz a biodisponibilidade do metotrexato.
Colestiramina	Une-se ao metotrexato diminuindo a sua absorção.
Barbitúricos Fenitoína	Aumentam os efeitos indesejáveis do metotrexato porque potenciam a inibição da enzima diidrofolato redutase.
Carbamazepina	A associação diminui a absorção do antiepilético e por isso pode fazer com que o paciente passe a estar descontrolado.
Glucosídeos cardiotônicos	A associação implica má absorção do digitálico por alteração irreversível da mucosa intestinal.

Fármaco	Interação
Metamizol AINES Clonixina Fenilbutazona Sulfasalizina Sulfonamidas antiinfeciosas	Estes fármacos competem pelos locais de ligação às proteínas plasmáticas e estas associações promovem a diminuição da eliminação renal do metotrexato; estes dois fatores aumentam o risco de agranulocitose.
Omeprazol	Provoca diminuição da excreção urinária do metotrexato que se acumula no organismo.
Penicilinas	Competem pelo sistema de secreção tubular activa; as penicilinas têm maior afinidade para a proteína transportadora e por isso o metotrexato fica retido no organismo.
Quinolonas	Inibição do transporte tubular renal.
Cisplatina	Adição de efeitos com risco de aumento da hematotoxicidade por depressão da medula óssea podendo conduzir à agranulocitose.
Diuréticos hipocalemiantes	A administração concomitante provoca um efeito mielossupressor superior ao normal; pode diminuir a tolerância da medula óssea ou promover o desenvolvimento de infecções oportunistas.
Etretinato	O retinóide é um inibidor enzimático do metabolismo do metotrexato levando à sua acumulação no organismo.
Tamoxifeno	Potenciam a depressão da medula óssea.
Trimetoprim	Aumento do risco de hematotoxicidade devido aos efeitos sobre a diidrofolato redutase podendo conduzir a anemia.

1.7 Considerações Gerais

Como regra geral, a administração do metotrexato deve ser realizada sob supervisão de médicos com treinamento completo para a utilização de fármacos citotóxicos. É obrigatório o

controle minucioso da toxicidade, particularmente na administração de dosagens elevadas do fármaco. Embora a probabilidade de ocorrer efeitos tóxicos esteja relacionada, em termos de frequência e gravidade, com a dose e/ou frequência da administração do fármaco, a toxicidade pode ocorrer em todas as doses. Pacientes submetidos a tratamento com metotrexato devem ser informados dos riscos de toxicidade. Os pacientes devem ser cuidadosamente monitorados durante o tratamento, recomendando-se particular atenção aos pacientes com insuficiência renal, bem como para aqueles com derrames pleurais ou outras coleções em terceiro espaço (por exemplo, ascite), uma vez que a eliminação do fármaco pode estar comprometida.

As avaliações basais de rotina devem incluir um hemograma completo, testes de função renal e hepática e uma radiografia de tórax. Durante o tratamento da psoríase, recomenda-se a monitoração dos parâmetros hematológicos (pelo menos uma vez ao mês) e função renal e hepática (a cada um a três meses). Em pacientes oncológicos indica-se, usualmente, uma monitoração mais freqüente. A urina deve ser mantida alcalinizada ao longo de toda a terapia com metotrexato (DOLLERY C., 1999).

1.8 Biodisponibilidade e Biodisponibilidade Relativa

O termo biodisponibilidade é, na verdade, uma contração de disponibilidade biológica. Considera-se biodisponibilidade como sendo a taxa e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no sítio de ação da droga. Considerando-se que a quantidade do fármaco contida no fluído biológico está em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do princípio ativo da droga em sangue total, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo (BRASIL, 2003b).

Os principais parâmetros farmacocinéticos utilizados para a avaliação da biodisponibilidade são (STORPIRTIS, 1999):

- O pico de concentração máxima – C_{max} ;
- O tempo para ocorrer o pico - T_{max} ;
- A área sob a curva – ASC_t .

Essas medidas são obtidas diretamente das curvas de concentração sanguínea versus tempo, construídas no estudo (BRASIL, 2003b).

Há duas formas de avaliar a biodisponibilidade:

- **Biodisponibilidade absoluta:** é a fração da dose que é efetivamente absorvida após a administração extravascular de um medicamento. É calculada tendo como referência à administração do mesmo fármaco por via intravascular, que possui por definição biodisponibilidade igual a 100%.
- **Biodisponibilidade relativa:** a bioequivalência entre dois medicamentos administrados pela mesma via extravascular pode ser avaliada pela comparação de parâmetros farmacocinéticos relacionados à biodisponibilidade, ou seja, à quantidade absorvida e à velocidade do processo de absorção. Comparam-se dois produtos, administrados por via extravascular, tendo um deles como referência.

Medicamentos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos (mesma forma farmacêutica e quantidade do mesmo princípio ativo) que, ao serem administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação a biodisponibilidade (BRASIL, 2003b).

Os estudos de biodisponibilidade relativa são divididos em três etapas:

- Etapa Clínica;
- Etapa Analítica;
- Etapa Estatística.

1.8.1 Etapa Clínica

Os medicamentos teste e referência a serem submetidos ao estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência deverão, inicialmente, ser analisados segundo sua monografia inscrita na Farmacopéia Brasileira. A diferença de teor do fármaco entre os medicamentos teste e referência não deve ser superior a 5% (cinco por cento).

O estudo é realizado por meio da quantificação do fármaco e/ou do metabólito ativo na circulação (sangue, plasma ou soro) ou através de sua quantificação na urina.

O estudo convencional é do tipo aberto, aleatório, cruzado. Os voluntários recebem os medicamentos teste e referência em ocasiões separadas (períodos), em esquema de dose simples ou múltipla. Pode ser utilizado desenho paralelo, quando se fizer necessário.

Os medicamentos devem ser administrados aos voluntários com volume de líquido padronizado (geralmente 200 mL de água).

O número de períodos e de seqüências do estudo será determinado em função do número de medicamentos em análise, de forma a assegurar a validade estatística. O intervalo entre os períodos deverá ser de, no mínimo, sete meias-vidas de eliminação do fármaco.

O cronograma de coleta das amostras deverá contemplar um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco. O número de voluntários sadios deverá sempre assegurar poder estatístico suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de

bioequivalência. O número de voluntários pode ser calculado por meio do coeficiente de variação e poder do teste, não sendo permitida utilização de número inferior a 12 voluntários.

Devem-se evitar indivíduos fumantes e com histórico de abuso de álcool ou drogas. Caso sejam incluídos fumantes, os mesmos devem estar identificados.

O projeto de pesquisa, o protocolo experimental e o termo de consentimento livre e esclarecido devem ser submetidos e aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) credenciado no Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde/MS. Deverá constar no título do projeto o nome do fármaco, a dose por unidade, a forma farmacêutica e nome do fabricante dos medicamentos teste e de referência. Esse título também deverá constar no protocolo experimental, no termo de consentimento livre e esclarecido, bem como no parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (BRASIL, 2006).

1.8.2 Etapa Analítica

O método bioanalítico empregado para quantificação do fármaco em líquido biológico, deve ser validado para sua aplicação. É recomendável o uso de métodos cromatográficos.

A relação entre a concentração do analito e a resposta proveniente do método bioanalítico deve apresentar reprodutibilidade e ser definida adequadamente, empregando-se número suficiente de padrões para a construção da curva de calibração. Devem ser realizados estudos de estabilidade do analito (fármaco ou metabólito) nos líquidos biológicos

Todas as determinações com valores menores do que o Limite Inferior de Quantificação (LIQ) deverão ser consideradas iguais a zero, para os cálculos estatísticos (BRASIL, 2006).

1.8.3 Etapa Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos são obtidos das curvas de concentração sanguínea do fármaco versus tempo, e analisados estatisticamente para determinação da bioequivalência. Os seguintes parâmetros farmacocinéticos devem ser determinados:

- O pico de concentração máxima – C_{max} ;
- O tempo para ocorrer o pico - T_{max} ;
- A área sob a curva – ASC_t ;
- A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) do fármaco também deve ser determinada, embora não haja necessidade de tratamento estatístico.

Dois medicamentos são considerados bioequivalentes se os valores extremos do intervalo de confiança de 90% da razão das médias geométricas (ASC_{0-t} teste/ ASC_{0-t} referência e C_{max} teste/ C_{max} referência) forem maiores que 0,8 e menores que 1,25. Outros limites do intervalo de confiança 90% para C_{max} , previamente estabelecidos no protocolo, poderão ser aceitos mediante justificativas científicas. Quando clinicamente relevante T_{max} deverá também ser considerado (BRASIL, 2006).

1.9 Quais as Vantagens dos Medicamentos Genéricos?

1. Oferecer à população medicamentos de melhor qualidade, mais seguros e eficazes, comprovados através da realização de testes de equivalência farmacêutica e bioequivalência;
2. Disponibilizar medicamentos de menor preço, visto que os fabricantes de genéricos não precisam investir em pesquisa para o seu desenvolvimento e nem em propaganda;

3. Reduzir os preços dos medicamentos de referência, com a entrada de medicamentos concorrentes (genéricos);
4. Contribuir para aumento do acesso aos medicamentos;
5. Mudar o comportamento dos profissionais de saúde (prescritores e dispensadores).

1.10 Metodologias Analíticas Utilizadas para Quantificar MTX

Diversos métodos analíticos são utilizados para quantificar MTX em fluidos biológicos, entre eles estão: extração em fase sólida combinada com pré-coluna de derivação, quantificação por CLAE (EMARA et al, 1998), extração em fase sólida e quantificação por LC/MS/MS (SABATINI et al, 2005, RULE et al, 2001), extração líquido-líquido e quantificação por LC/MS (STEINBORNER e HENION, 1999), extração em fase sólida com irradiação foto-oxidativa e detecção por fluorimetria (ZUOXIANG et al, 1997), extração em fase sólida e quantificação por CLAE com detector UV-visível (ABONELEEN et al, 1996, ALBERTIONI et al, 1995), método microbiológico (ICKE et al., 1983) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) (SCHMAUS et al., 2002).

2. Objetivos

Este trabalho tem por objetivo submeter o medicamento teste metotrexato comprimido simples de 2,5 mg e o medicamento referência (Reutrexato®) comprimido simples de 2,5 mg, ao estudo de biodisponibilidade relativa. Utilizando-se para tanto, planejamento de blocos aleatorizados modificados (crossover), no qual cada bloco recebe mais de uma formulação do mesmo fármaco em períodos diferentes.

Desenvolver um método específico, sensível, preciso, exato e reproduzível em LC/MS/MS para determinar quantitativamente metotrexato em plasma humano, utilizando-se como padrão interno folinato de cálcio, avaliando a razão e a extensão da biodisponibilidade entre os comprimidos simples de metotrexato (teste e referência), de acordo com os critérios adotados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3. Materiais e Métodos



3.1 Etapa Clínica

3.1.1 Desenho do Estudo

O estudo foi aberto, randomizado aleatoriamente, cruzado, sendo dois tratamentos, dois períodos, duas seqüências, nos quais os voluntários receberam, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência, havendo, por conseguinte, dois braços de tratamento.

A seqüência de tratamento atribuída a cada voluntário nos períodos de estudo foi determinada por uma lista de randomização gerada automaticamente pelo sistema SCPCM (Sistema de Controle de Pesquisas Clínicas de Medicamentos).

Os voluntários receberam em cada um dos períodos do confinamento, seis comprimidos contendo 2,5 mg de Metotrexato cada, por via oral em dose única, seguidas de coletas de sangue.

3.1.2 População do Estudo

Foram selecionados 25 voluntários saudáveis, todos do sexo masculino, com idade entre 18 e 50 anos, com índice de massa corpórea maior do que 19,5 e menor do que 29,9 conforme previsto no protocolo. Os dados estão descritos na tabela 2.

A utilização de voluntários saudáveis é baseada no fato de que diversas patologias podem alterar a biodisponibilidade dos fármacos (GIBALDI, 1991) e podem fornecer dados errôneos de suas biodisponibilidades. Para evitar essas variáveis, os voluntários são submetidos a avaliações clínicas e laboratoriais para que possa corroborar o seu estado de saúde.

Dos vinte e cinco voluntários selecionados, vinte e quatro foram convidados a participar do estudo. O voluntário número 08 não compareceu para participação no primeiro período de confinamento e foi substituído pelo voluntário número 25.

Tabela 2: Tabela estatística descritiva dos dados dos voluntários (n=24)

Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Altura (m)	1,74	0,07	1,58	1,75	1,84
Peso (Kg)	71,70	8,75	57,40	70,50	86,80
IMC (Kg/m ²)	23,55	2,45	19,69	23,24	27,92
Idade (anos)	26,88	6,37	18,00	26,00	41,00

IMC: Índice de Massa Corpórea

3.1.3 Critérios para Inclusão do Voluntário

Foram considerados aptos a participar do estudo, voluntários com as seguintes características:

- Adultos do sexo masculino, independente de cor ou classe social;
- Idade entre 18 e 50 anos;
- Valores pressóricos normais com máxima não menor que 110mmHg e mínima não maior que 90mmHg;
- Índice de massa corpórea (IMC) dentro da normalidade, ou seja, entre 19,5 – 29,9; de acordo com a classificação de obesidade feita pela Organização Mundial de Saúde;
- Voluntários devidamente examinados e considerados com boa saúde física e mental com valores laboratoriais dentro dos padrões de normalidade;
- Se fumantes, foram devidamente identificados.

3.1.4 Critérios para Exclusão do Voluntário

Foram considerados inaptos para o presente estudo, voluntários, que apresentaram qualquer uma das características a seguir:

- Voluntário que fizessem uso abusivo de álcool ou drogas, devidamente caracterizado;

- Voluntários que apresentassem alterações clínicas em seus laudos laboratoriais e exames físicos devidamente qualificados;
- Voluntários que fizessem uso de medicamentos que pudessem levar a interação farmacocinética ou farmacodinâmica com o medicamento teste;
- Voluntários com demonstração de anormalidades nas suas funções renais, hepáticas e hematopoiéticas que poderiam levar a uma interferência com os processos farmacocinéticos do Ativo;
- Voluntários que tivessem participado de investigações clínicas e doação de sangue nos últimos três meses;
- Voluntários que tivessem sofrido alguma intervenção cirúrgica até oito semanas antes da iniciação do estudo;
- Voluntários que tivessem feito uso social de álcool ou drogas anterior a 48 horas da data de confinamento;
- Voluntários que tivessem história de hipersensibilidade ao ativo.

3.1.5 Restrições e Proibições

No período de confinamento os voluntários puderam realizar as seguintes atividades:

- Ler revistas e outros tipos de leitura;
- Assistir televisão.

Neste mesmo período não foi permitido:

- Deixar o hospital, por qualquer motivo;
- Fumar durante todo o confinamento;

- Ingerir bebidas alcoólicas ou que contivessem cafeína ou qualquer outra substância química;
- Fazer exercícios ou qualquer tipo de atividade que necessitassem de esforço físico ou alteração do comportamento (jogar, correr, etc.);
- Devido a possível hipotensão postural que alguns voluntários pudessem ter, foi sugerido as mesmas que permanecessem preferencialmente em seus leitos e que levantassem com calma e escalonadamente.

3.1.6 Critérios de Retirada do Voluntário

A. Solicitação por parte do voluntário para se retirar do estudo a qualquer momento:

- Voluntário não deseja continuar no estudo por razões pessoais (ou mesmo sem razão);
- Voluntário não deseja continuar no estudo devido aos eventos adversos da droga em estudo (efeitos não desejáveis possivelmente relacionados à droga em estudo);
- Voluntário não deseja continuar por razões outras que não efeitos adversos, por exemplo: indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo, ou mesmo, vontade própria.

B. O investigador poderia retirar o voluntário do estudo por uma das seguintes razões:

- Comprovação, no início ou durante o estudo, de qualquer alteração no quadro clínico, que tenha surgido após os exames físicos e laboratoriais e que o voluntário não tenha relatado. Apenas, poderiam ser emitidos em caso de não interferência com o estudo, já considerados na inclusão e exclusão do voluntário, sendo devidamente registrado na ficha de evolução clínica do voluntário;

- Ingestão pelo voluntário, de qualquer medicação no dia anterior ao estudo (automedicação), ou necessidade de qualquer terapia medicamentosa, nos períodos de confinamento, que pudesse interferir na cinética do fármaco em estudo. Foi permitido apenas com o conhecimento e permissão do pesquisador, que deveria analisar a interação, sendo devidamente registrada na ficha de evolução clínica do voluntário;
- Aparecimento de efeitos colaterais que comprometessem o estado de saúde geral do voluntário.

C. Violação dos critérios de inclusão e exclusão do protocolo:

- Fumar, ingerir bebidas alcoólicas nas últimas 24 horas, ingestão de qualquer medicamento de ação gástrica.

Se houvesse qualquer dúvida sobre o uso de álcool, poderia ser feito um teste para detecção de bebida alcoólica. Se o voluntário admitisse ingestão de droga, os Investigadores do Estudo decidiriam se seria permitido que o voluntário permanecesse no estudo, dependendo da droga usada, do tipo de droga e da dose.

D. Não comparecimento na segunda fase do estudo.

E. Perda da amostra que impossibilitasse uma análise farmacocinética (área sob a curva) da substância naquele voluntário.

F. Má conduta do voluntário durante os períodos de confinamento.

Se o voluntário admitisse o não cumprimento das demais restrições, os Investigadores do Estudo deveriam também decidir sobre sua permanência no Estudo, documentando o fato.

3.1.7 Exames Clínicos Laboratoriais

Para fins de avaliação das condições de saúde, durante o processo de seleção dos voluntários e após o estudo clínico, os voluntários realizaram os exames apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Exames laboratoriais pré/pós-estudo.

Exames Laboratoriais Pré e Pós-Estudo
Hemograma completo, urina I, Colesterol Total, Triglicérides, Uréia, Creatinina, Glicose Jejum, Ácido Úrico, TGO, TGP, Bilirrubina Total, Bilirrubina Direta, Bilirrubina Indireta, Fosfatase Alcalina, Gama GT, Proteínas Totais, Albumina, Globulinas, pH, Oxalato de Cálcio, Fosfato Triplo, Uratos Amorfos e Fosfatos Amorfos.
Exames Laboratoriais Pré-Estudo
Protoparasitológico, Hepatite B (anti-HBs), Hepatite B (anti-HBc IgM), Hepatite B (anti-HBc IgC), Hepatite C (anti-VHC), HIV-1, HIV-1 2, Hepatite B (AgHBs).

Os resultados dos exames de laboratório foram considerados “normais” quando dentro da faixa de normalidade declarada pelo laboratório. Para resultados numéricos, os valores até 10% da faixa de normalidade declarada foram considerados como “normais”.

Os exames clínicos laboratoriais foram realizados em um período não superior a 3 meses que antecederam a primeira administração da medicação e exames laboratoriais não superior a 3 meses. Os exames sorológicos, no entanto, podem ter sido realizados até 6 meses antes da primeira administração da medicação.

Os exames laboratoriais pós-estudo foram repetidos cerca de 3 dias após a última coleta de sangue do ensaio, em horário previamente estabelecido. Após o recebimento destes resultados, em data já agendada por ocasião da coleta dos exames, os voluntários compareceram para o exame clínico de alta, ocasião em que foram dispensados.

3.1.8 Condutas permitidas e não permitidas antes e durante o estudo clínico

Dieta – Não foi permitido, desde 48 horas antes e até a última coleta de sangue de cada internação (período de tratamento), o consumo dos seguintes produtos:

- Cafeína;
- Bebidas que contivessem xantina (chá, café, cola);
- Bebidas alcoólicas.

Além da proibição nos períodos mencionados, o consumo de bebidas foi limitado durante toda a etapa clínica. A ingestão de água foi permitida até seis horas antes e após duas horas da administração da droga. No momento da administração da medicação foram ingeridos 200 mL de água.

Durante as internações foram considerados os períodos de jejum, incluídas as restrições de líquidos. Também não foi permitida a ingestão de qualquer outro alimento (incluindo doces, pastilhas, gomas, chicletes, salgadinhos ou biscoitos de qualquer tipo), além dos programados.

3.1.9 Administração da Medicação

Tabela 4: Administração dos medicamentos

Posologia	15 mg de Metotrexato	
Forma de administração	6 comprimidos acompanhados de 200 mL de água	
Administração dos Medicamentos	Período I	Início: 18/06/2005 – 06:56 h Término: 18/06/2005 – 07:32 h
	Período II	Início: 02/07/2005 – 06:58 h Término: 02/07/2005 – 07:22 h
Intervalo entre os períodos	14 dias	

O início e o término da administração se referem à data e horário da administração da medicação ao primeiro voluntário e da administração ao último voluntário.

3.1.10 Cronograma das Coletas das Amostras

Tabela 5: Cronograma das coletas das amostras.

Períodos I e II		
Tempo (horas)	Atividade	Outras Atividades
0,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
0,25	Coleta de sangue	-
0,50	Coleta de sangue	-
0,75	Coleta de sangue	-
1,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
1,25	Coleta de sangue	-
1,50	Coleta de sangue	-
2,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
2,50	Coleta de sangue	-
3,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
5,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
6,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
6,50	Coleta de sangue	-
7,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
7,50	Coleta de sangue	-
8,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
8,50	Coleta de sangue	-
9,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
10,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
12,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
16,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
20,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.

Tempo (horas)	Atividade	Outras Atividades
24,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
36,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.
48,00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura.

* Dentro de 30 minutos que antecede a administração do medicamento, * PA – Pressão Arterial.

3.1.11 Coleta, Manipulação, Armazenagem e Transporte das Amostras.

Ao término de cada tempo de coleta, as amostras de sangue (8mL) foram colocadas em tubos de polipropileno contendo o anticoagulante heparina sódica e transportadas em estantes armazenadas dentro de caixas de isopor contendo gelo e posteriormente centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Imediatamente após a centrifugação, cerca de 2,5 mL de plasma, para cada amostra, foram transferidos para o primeiro tubo criogênico e o plasma restante para um segundo tubo criogênico como uma amostra em duplicata, identificados com o número e código de identificação do voluntário, fase do estudo, data da administração da droga, tempo de coleta, nome e o número do estudo. Em seguida foram colocados em sacos plásticos identificados, lacrados e armazenados no freezer (-20 °C).

3.1.12 Avaliação de Segurança

Para fins de acompanhamento de segurança, os voluntários foram observados durante o estudo visando à detecção de eventos adversos. Um evento adverso é qualquer ocorrência médica não desejada em um sujeito que esteja participando de uma investigação clínica e que já tenha recebido alguma das terapias vinculadas à investigação. Esta ocorrência não necessita ter uma relação causal com a terapia. Um evento adverso pode ser um sinal (incluindo achados normais de exames ou sinais

vitais) ou sintoma desfavorável e não intencional, ou uma doença temporalmente associada à terapia, relacionada ou não à terapia.

Um evento adverso sério é um Evento adverso que, independentemente da dose:

- Provoca a morte;
- Ameaça a vida;
- Requer hospitalização ou prorrogação da hospitalização;
- Resulta em debilidade/incapacitação significativa ou persistente;
- Trata-se de uma anomalia congênita ou defeito ao nascimento;
- Trata-se de uma neoplasia maligna.

3.1.13 Registro e Análise dos parâmetros de segurança

Procedimentos durante o estudo

Nos dias de administração da medicação, em cada período de tratamento, os voluntários permaneceram internados durante horas subseqüentes à administração dos medicamentos e foram observados pelos profissionais de saúde durante todo o estudo visando a detecções de eventos adversos incluindo sinais de toxicidade.

Quaisquer eventos adversos que ocorreram após o período sob supervisão médica direta foram imediatamente comunicados à equipe. Foram monitoradas, por ocasião das coletas de sangue, as frequências cardíacas e a pressão arterial do voluntário. A temperatura corpórea também foi acompanhada a partir da administração da medicação, de acordo com a tabela de atividades do estudo (tabela 5).

Procedimento Pós Estudo

Por ocasião da alta da última internação, todos os voluntários foram novamente avisados de que não deveriam doar sangue ou participar de qualquer estudo clínico com medicamentos que envolvessem a coleta de amostra por no mínimo 3 meses.

3.2 Ética

3.2.1 Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o termo de consentimento, foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp – credenciado pelo CONEP – Conselho Nacional de Saúde/MS.

Qualquer ensaio não é iniciado antes que exista um Protocolo escrito e aprovado pelo Comitê de Ética. O pesquisador é o responsável por obter aprovação do Protocolo de Estudo pelo Comitê de Ética. Uma cópia da aprovação foi enviada ao patrocinador, antes do início do estudo.

3.2.2 Conduta do Estudo

O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong kong (1989), Somerset Oeste (1996) e Edinburgh (2000), assim como as regulamentações locais (Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS/MS, bem como Resolução RDC 135/03 da ANVISA).

Conforme previsto na RE 397/Nov 04, o estudo foi iniciado após a emissão do laudo conclusivo da equivalência farmacêutica, a fim de preservar o voluntário.

3.3 Etapa Analítica

3.3.1 Método Bioanalítico

A metodologia analítica utilizada para a quantificação de metotrexato e folinato de cálcio (padrão interno) foi LC/MS/MS com ionização do tipo *eletrospray* no modo positivo, monitorou-se os “íons-filhos” de primeira transição para os dois compostos.

3.3.2 Condições Analíticas

As condições cromatográficas e espectrométricas utilizadas para determinação de MTX nas amostras do estudo, estão mostradas na tabela 6.

Tabela 6: Condições cromatográficas utilizadas para o estudo de validação, e que foram posteriormente utilizadas para os estudos farmacocinéticos.

HPLC	Alliance 2695
Coluna	Symmetry [®] C18 4,6 mm x 75 mm (3,5 µm)
Modo de Eluição	Isocrático
Fase Móvel	Água: Acetonitrila (80:20) com 0,1% de ácido fórmico
Vazão	0,4 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Quantificação	Padronização Interna (padrão interno: Folinato de Cálcio)
Tempo da corrida analítica	3,5 minutos

Tabela 7: Condições do Espectrômetro de Massas

Espectrômetro de Massas	Quattro Premier XE
Modo de Ionização	Electrospray Positivo (ES+)
Voltagem do Electrospray (kV)	3,0
Temperatura da Fonte (°C)	120
Temperatura de Dessolvatação (°C)	150
Fluxo de gás dessolvatação (L/h)	400
Fluxo de gás no cone da amostra (L/h)	20

Tabela 8: Parâmetros individuais dos íons monitorados (MRM)

Fármaco	Íon “Pai” (m/z)	Íon “Filho” (m/z)	Voltagem do Cone (V)	Energia de colisão (eV)
Metotrexato	455	308	40	20
Folinato de Cálcio	474	326	20	20

3.3.3 Procedimento para o tratamento das amostras de plasma

A extração do MTX em amostras de plasma foi realizada por precipitação de proteínas plasmáticas, após adição de solução de padrão interno, utilizando-se os seguintes procedimentos analíticos:

1. Transferiu-se 200 µL de plasma;
2. Adicionou-se 50 µL de solução de padrão interno, agitar por 10 segundos. A concentração do padrão interno nas soluções finais extraídas de plasma correspondeu a 2,5 µg/mL;
3. Adicionou-se 500 µL de acetonitrila e agitar por 60 segundos;
4. Centrifugou-se por 10 minutos a 15000 rpm e 20° C;
5. Retirou-se 500 µL da fase sobrenadante e adicionar 500 µL de fase móvel;
6. Agitou-se por 10 segundos;

7. Armazenou-se no auto-injetor até posterior análise.

3.3.4 Padrões de Referência

Os padrões de referência utilizados apresentam as seguintes origens:

Tabela 9: Padrões de referência:

Padrão	Função	Origem
Metotrexato	Analito	Farmacopéia Européia
Folinato de Cálcio	Padrão Interno	USP

3.3.5 Codificação das Amostras

Durante o processo de análise, os voluntários foram codificados com números sequenciais, conforme a codificação da etapa clínica, de um a sete e de nove a vinte e cinco, recebendo a letra A para o primeiro confinamento e a letra B para o segundo.

3.3.6 Cálculos de Concentração das Amostras

O cálculo das amostras foi realizado automaticamente através da equação linear $y = ax + b$, utilizando-se ponderação $1/x^2$. Esta quantificação foi realizada pelo software QuanLynx® v 4.0.

3.3.7 Validação do Método Analítico

A validação do método analítico garantiu, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às necessidades das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, apresentou:

- **Especificidade:** amostras de “plasma branco” foram analisadas para se evitar qualquer interferente no tempo de retenção do fármaco ou padrão interno, qualquer amostra que apresentou interferência significativa no tempo de retenção do MTX ou do padrão interno foi rejeitada. Os interferentes podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos ou produtos de decomposição de medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo. A interferência da nicotina, cafeína, produtos de venda isenta de prescrição médica e metabólitos foram consideradas sempre que necessário.
- **Precisão:** a repetibilidade do método foi verificada utilizando-se três concentrações 25, 150 e 250 ng ml⁻¹, realizando-se, cinco determinações de cada concentração. A precisão foi determinada em uma mesma corrida analítica (precisão intra-ensaio) e em corridas analíticas diferentes (precisão inter-ensaio). A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%). Não se admite valores superiores a 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%, segue a fórmula abaixo:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Onde, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

- **Exatidão:** a exatidão do método foi determinada utilizando-se três concentrações 25, 150 e 250 ng ml⁻¹, realizando-se cinco determinações de cada concentração. A exatidão foi determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-ensaio) e em corridas analíticas diferentes (exatidão inter-ensaios). Os desvios não podem exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. A

exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

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

- **Limite Inferior de Quantificação (LIQ):** foi estabelecido por meio da análise de amostras em plasma, contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável, com precisão e exatidão aceitáveis. Utilizou-se a razão 5:1 entre o sinal analítico e o ruído da linha de base. O pico de resposta do fármaco foi identificável e reproduzível através da análise de cinco amostras.
- **Limite de Detecção (LD):** foi estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectado. O LD foi 2 vezes superior ao ruído da linha de base.
- **Recuperação:** a recuperação mede a eficiência do procedimento de extração do método analítico, dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. Neste teste compararam-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir das concentrações baixa, média e alta, ou seja, 25, 150 e 250 ng mL⁻¹, com os resultados das amostras não extraídas nas mesmas concentrações descritas anteriormente (50, 150 e 250 ng mL⁻¹). Essas amostras não extraídas foram preparadas da seguinte maneira: extraíram-se amostras de plasma branco, de acordo com o procedimento descrito e após o preparado, essas amostras foram contaminadas com padrão de MTX e folinato de cálcio nas mesmas concentrações das

amostras extraídas. O cálculo foi feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído para o analito e para o padrão interno separadamente.

- **Estabilidades:** a estabilidade do fármaco em fluidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento, não deve ser extrapolada para outros. As condições de realização dos ensaios de estabilidade reproduziram as reais condições de manuseio de análise das amostras. Os resultados das estabilidades foram comparados com os resultados obtidos das amostras recém preparadas. Essas amostras foram preparadas, e imediatamente quantificou-se o fármaco, para que o mesmo não sofresse nenhum tipo de degradação. Para a avaliação das estabilidades, utilizaram-se três amostras das concentrações baixa e alta, ou seja, 25 e 250 ng mL⁻¹, determinadas na validação do método analítico, para as seguintes estabilidades:

1. **Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento:** testou-se a estabilidade do fármaco após três ciclos de congelamento e descongelamento, nas seguintes condições: as amostras foram congeladas à -20°C e mantidas por 24 horas, sendo então, submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Após o descongelamento, as amostras foram novamente congeladas à -20°C por 12 horas e assim sucessivamente até completar os três ciclos de congelamento e descongelamento. Ao fim dos ciclos, quantificou-se o MTX nas amostras e compararam-se os resultados com as amostras recém preparadas.

2. **Estabilidade de Curta Duração:** as amostras permaneceram à temperatura ambiente por vinte horas (esse tempo foi baseado no tempo em que as amostras do estudo ficaram sob temperatura ambiente), os resultados foram comparados com as amostras recém preparadas.
3. **Estabilidade de Longa Duração:** de acordo com o cronograma apresentado no protocolo de estudo de biodisponibilidade relativa, o tempo de armazenamento para a análise da estabilidade de longa duração excedeu o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e análise da última. A temperatura utilizada no ensaio reproduziu a recomendada para armazenamento das amostras, ou seja, igual a -20°C , os resultados foram comparados com as amostras recém preparadas.
4. **Estabilidade Pós Processamento:** essa estabilidade é determinada em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de amostragem/injeção. Realizou-se um estudo de estabilidade do fármaco, nas amostras, à temperatura de 20°C e por um período de tempo superior à duração da corrida analítica, ou seja, 24 horas.
5. **Estabilidades das Soluções-Padrão:** avaliou-se a estabilidade das soluções-padrão do fármaco e do padrão interno, mantidas à temperatura ambiente por seis horas após a preparação. Em seguida as amostras foram refrigeradas e após 8 dias reanalisadas, verificando-se assim a estabilidade do fármaco em solução sob refrigeração. Os resultados das amostras analisadas após 8 dias foram comparados com os resultados das amostras analisadas após 6 horas de preparo.

As amostras são consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas (GERÊNCIA GERAL DE INSPEÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS E PRODUTOS, 2002).

3.4 Etapa Estatística

3.4.1. Parâmetros Farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos das curvas de concentração plasmática do fármaco versus tempo, e analisados estatisticamente para determinação da bioequivalência. Os seguintes parâmetros farmacocinéticos devem ser determinados:

ASC_{0-t (h)} – área sob a curva de concentração plasmática versus tempo, calculada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao tempo t, onde t é o tempo relativo à última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação);

ASC_{0-∞} – área sob a curva de concentração plasmática versus tempo, do tempo zero ao tempo infinito, onde $ASC_{0-∞} = ASC_{0-t (h)} + Ct/k$, onde Ct é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação), e k é a constante de eliminação da fase terminal;

C_{máx} – pico de concentração máxima do fármaco;

T_{máx} – tempo para atingir a concentração máxima;

t_{1/2} – tempo de meia vida de eliminação do fármaco.

A análise estatística apresenta tabelas contendo valores individuais, médias, desvio padrão, coeficiente de variação de todos os parâmetros farmacocinéticos relacionados a administração dos medicamentos teste e referência. Os parâmetros $ASC_{0-t (h)}$ e $C_{máx}$ foram transformados em logaritmo

natural, uma vez que, a distribuição dos dados se aproxima mais a uma distribuição normal em relação aos dados originais.

Realizou-se análise de variância (ANOVA) dos parâmetros farmacocinéticos $ASC_{0-t(h)}$ e C_{max} transformados para avaliar os efeitos de seqüência, de voluntário dentro da seqüência, período e tratamento. Construiu-se um intervalo de confiança (IC) de 90% para a diferença das médias dos dados transformados dos medicamentos teste e referência, para os parâmetros $ASC_{0-t(h)}$ e $C_{máx}$. O T_{max} foi analisado como diferença individual (= teste – referência), construindo-se IC de 90%.

Os medicamentos teste e referência serão considerados bioequivalentes se os valores extremos do intervalo de confiança de 90% da razão das médias geométricas ($ASC_{0-t(h)} \text{ teste} / ASC_{0-t(h)} \text{ referência}$ e $C_{máx} \text{ teste} / C_{máx} \text{ referência}$) forem maiores que 0,8 e menores que 1,25 (dentro do intervalo de 80-125%). A $ASC_{0-t(h)}$, ser igual ou superior a 80% da $ASC_{0-\infty}$ em pelo menos 90% dos voluntários. Para análise dos parâmetros farmacocinéticos das duas formulações, foram utilizados os seguintes programas:

- WinNonlin™, version 3.1
- EquivTest, version 2.0
- GraphPad Prism, version 2.0
- Microsoft Excel, version 97104
- Microsoft Word version 97

4. Resultados

4.1 Etapa Analítica

A metodologia utilizada para a quantificação de Metotrexato e Folinato de Cálcio (PI) foi cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (LC/MS/MS), com ionização do tipo electrospray no modo positivo, monitorando-se os “íons-filhos” de primeira transição para os dois compostos. Os procedimentos descritos buscam atender às exigências analíticas, dentro dos parâmetros de validação para o fármaco em estudo, de acordo com a Resolução RE N° 899 “*Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*” de 29 de maio de 2003 da ANVISA/MS.

Os espectros dos “íons-filhos” de primeira transição para os dois compostos, monitorados em “monitoramento de múltipla reação” (MRM), estão mostrados na figura 1. As transições monitoradas foram: 455→308 para o metotrexato e 474→326 para o folinato de cálcio (PI).

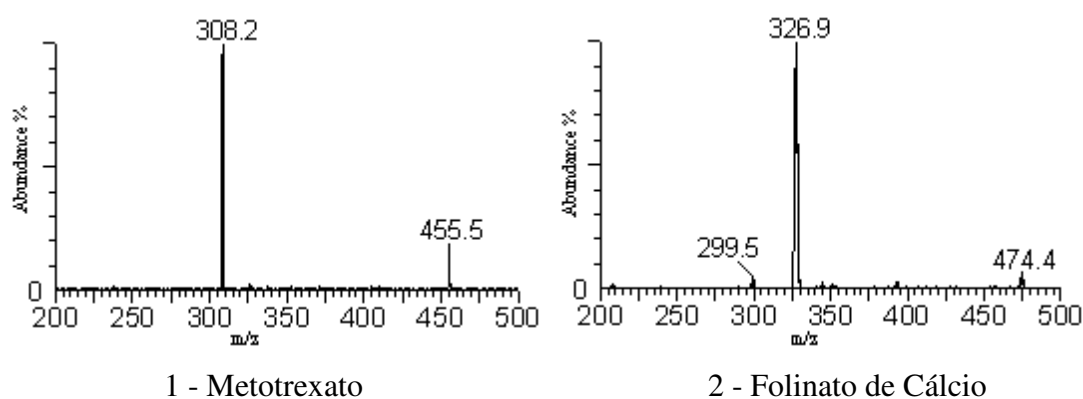
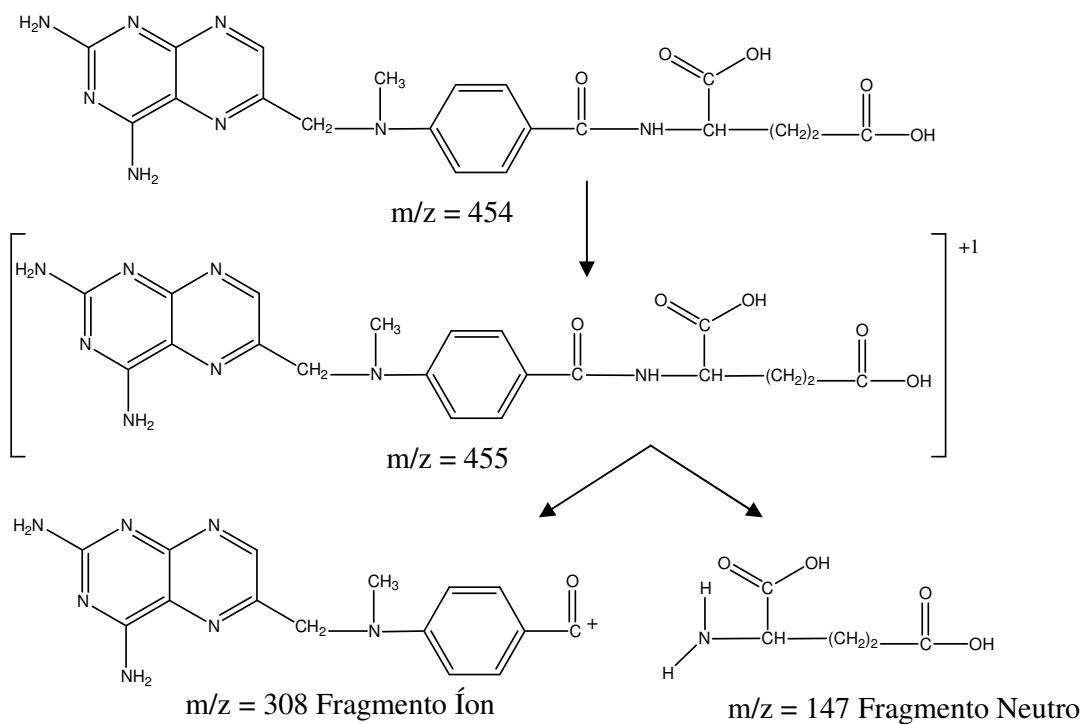


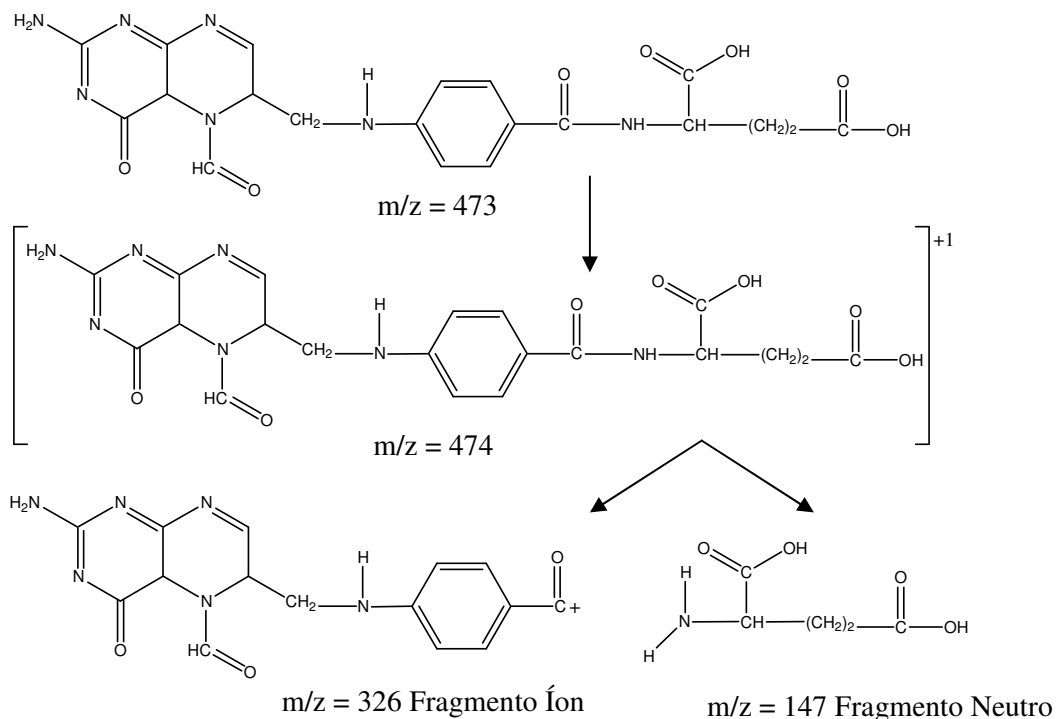
Figura 1 - Espectros de massas dos “íons-filhos” obtidos das moléculas protonadas $[M + H]^+$ do (1) metotrexato (455→308) e (2) folinato de cálcio (PI) (474→326).

As possíveis fragmentações das moléculas protonadas estão mostradas na figura 2.

Figura 2: Possíveis Fragmentações das moléculas protonadas de Metotrexato (1) e Folinato de Cálcio (2).



(1) Possível fragmentação do Metotrexato.



(2) Possível fragmentação do Folinato de Cálcio.

4.1.2 Parâmetros da Validação

4.1.2.1 Especificidade

Amostras de plasma branco foram analisadas de acordo com o método de extração descrito no item 3.3.3 e os cromatogramas obtidos foram comparados com os cromatogramas do limite de quantificação. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que não há nenhum tipo de interferente tanto para o analito quanto para o padrão interno. Os resultados obtidos estão mostrados na figura 3.

A escolha do folinato de cálcio como padrão interno para o metotrexato foi baseada na presença de grupos funcionais similares em ambas as estruturas e a similaridade de propriedades físico-químicas, bem como na proximidade no que diz respeito ao peso molecular e do comportamento químico. Embora os isótopos deuterados sejam mais favoráveis como padrões internos do que substâncias análogas estruturalmente, são muito difíceis de encontrar no mercado e sua síntese é muito cara.

4.1.2.2 Limite de Quantificação

O valor do limite de quantificação em matriz biológica foi resultado de áreas mínimas obtidas com resolução e variação aceitáveis para o estudo em questão. Os cromatogramas obtidos para o limite de quantificação estão na figura 3. O valor do limite de quantificação obtido foi de 10ng mL^{-1} . Através da análise de cinco amostras, provou-se que o limite de quantificação é preciso e exato. Os dados estão na tabela 10.

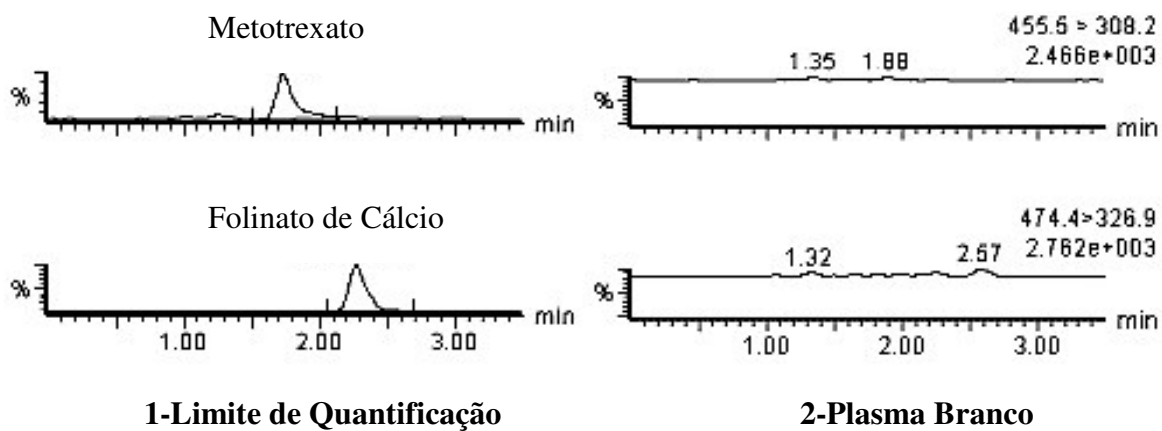


Figura 3: Cromatogramas do (1) limite de quantificação-10 ng mL⁻¹ e do (2) plasma branco.

Tabela 10: Resultados do Limite de Quantificação

Ensaio n=5	Limite de Quantificação 10 ng mL ⁻¹
Média	11,548
CV (%)	16,4
Exatidão (%)	115,5

4.1.2.3 Precisão e Exatidão

Para o estudo de precisão e exatidão três níveis de concentração (alto, médio e baixo) foram preparados em plasma com padrão interno e analisados em quintuplicata. Os cálculos de precisão e exatidão foram determinados em uma mesma corrida analítica (Precisão e Exatidão Intra-ensaio) e em corridas analíticas diferentes (Precisão e Exatidão Inter-ensaio). Os resultados obtidos estão na tabela 11.

Tabela 11: Resultados dos testes de Precisão e Exatidão

Ensaio		CQ-Baixo 25 ng mL ⁻¹	CQ-Médio 150 ng mL ⁻¹	CQ-Médio 250 ng mL ⁻¹
Intra-Ensaio n = 5	Média	22,70	167,37	234,02
	CV%	8,00	10,50	7,20
	Exatidão (%)	90,80	111,60	93,60
Inter-Ensaio n = 5	Média	25,01	167,98	251,68
	CV%	14,10	9,30	9,80
	Exatidão (%)	100,00	112,00	100,70

4.1.2.4 Linearidade

A linearidade foi determinada pela preparação de padrões de analito com padrão interno em plasma branco. Para a construção da curva de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações: 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ng mL⁻¹, com padrão interno na concentração fixa de 2,5 µg/mL. Para efeito de cálculo utilizou-se de equação linear do tipo $y = ax + b$ com ponderação tipo $1/x^2$. Os resultados são mostrados na Tabela 12 e na Figura 4.

Tabela 12: Dados das curvas de calibração das validações (n = 3).

Concentração Nominal (ng mL ⁻¹)	Concentração Obtida (ng mL ⁻¹)	Desvios (%)
10	9.70	-4.30
25	23.04	-9.00
50	47.79	-5.70
100	102.61	1.30
150	162.84	7.20
200	213.46	5.40
250	254.49	0.50
300	267.67	-11.90

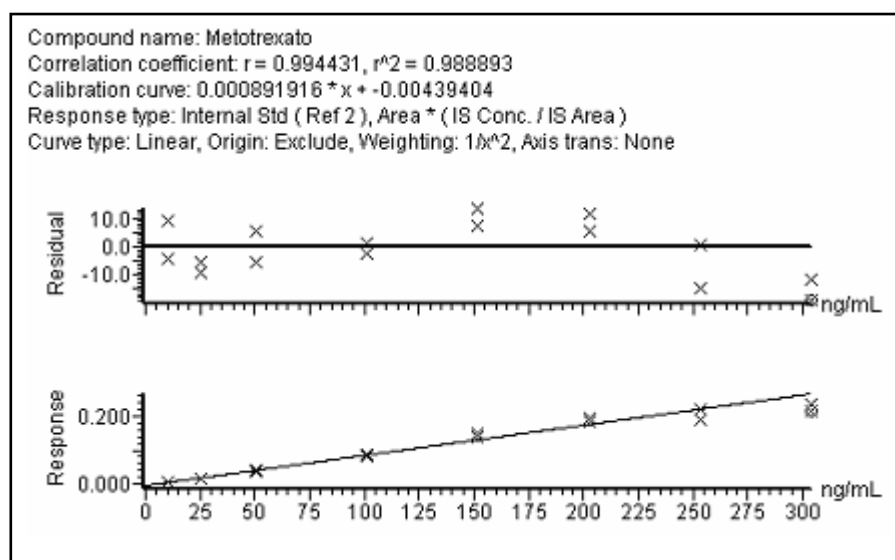


Figura 4: Dados das curvas de calibração.

4.1.2.5 Recuperação

Este teste foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com amostras contaminadas com solução padrão após o processo de extração (amostras não extraídas), que representam 100% de recuperação. O cálculo da

recuperação foi feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno separadamente. Os resultados estão na tabela 13 e tabela 14.

Tabela 13: Recuperação do Metotrexato

Metotrexato	CQ-Baixo 25 ng mL ⁻¹		CQ-Médio 150 ng mL ⁻¹		CQ-Alto 250 ng mL ⁻¹	
	Não Extraído	Extraído	Não Extraído	Extraído	Não Extraído	Extraído
Média	681,1	567,0	4506,5	3480,4	8244,7	5712,6
CV %	4,4	5,2	1,1	3,9	2,1	3,6
Recuperação (%)	83,2		77,2		69,3	

Tabela 14: Recuperação do Folinato de Cálcio

Folinato de Cálcio 2,5 µg mL ⁻¹	Não Extraído	Extraído
Média	25594,4	21288,0
CV %	13,9	3,7
Recuperação (%)	83,2	

Considerando-se a variação da recuperação do analito e padrão interno em meio biológico, pode-se observar que o resultado obtido foi compatível com a condição analítica proposta e de acordo com a Resolução RE nº899 de 29 de maio de 2003.

4.1.2.6 Estabilidades

Para determinar a estabilidade do MTX em várias condições de estocagem, manuseio e análise utilizou-se um conjunto de amostras preparadas a partir de uma solução padrão recente,

adicionado ao “plasma branco”. Os parâmetros das estabilidades avaliados estão descritos nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15: Valores dos desvios das estabilidades n=3.

Ciclos de Congelamento e Descongelação	CQ-Baixo 25 ng mL ⁻¹		CQ-Alto 250 ng mL ⁻¹	
	Fresco	Estabilidade	Fresco	Estabilidade
Média	27,3	23,7	269,3	257,2
Variação (%)		-13,4		-4,5
Curta Duração				
Média	27,3	23,2	269,3	248,7
Variação (%)		-14,9		-7,6
Tempo e Condições de Análise				
Média	27,3	26,5	269,3	257,2
Variação (%)		-3,2		-4,5
Longa Duração				
Média	25,24	21,48	259,19	221,79
Variação (%)		-14,88		-14,43

Com os resultados obtidos das concentrações e dos desvios entre as amostras do teste em relação aos valores das amostras recém-preparadas, conclui-se que nos ciclos de congelamento e descongelamento, na estabilidade de curta e longa duração e na estabilidade de pós-processamento as amostras foram consideradas estáveis, por apresentarem desvios menores do que 15%, de acordo com a Resolução RE N° 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003a).

Tabela 16: Estabilidades das soluções padrão (n=3)

Solução Padrão Metotrexato (8 dias)	Fresco (ng mL ⁻¹)	Estabilidade (ng mL ⁻¹)
Média	266,9	264,8
Varição (%)		-0,8

Solução Padrão Folinato de Cálcio (8 dias)	Fresco (µg mL ⁻¹)	Estabilidade (µg mL ⁻¹)
Média	1,001	1,007
Varição (%)		0,6

De acordo com os resultados obtidos de concentração e dos desvios entre as amostras do teste em relação aos valores das soluções recém-preparadas, conclui-se que após 8 dias de armazenamento sob refrigeração, as soluções foram consideradas estáveis, por apresentarem desvios menores do que 15%, de acordo com a Resolução RE Nº 899 de 29 de maio de 2003.

4.1.3– Análise dos Voluntários

Após a validação do método analítico, iniciou-se a quantificação do metotrexato nas amostras dos voluntários. As análises foram divididas em corridas analíticas, onde cada corrida continha: uma curva analítica composta de amostras de branco, branco com padrão interno e os pontos da curva de calibração, amostras dos voluntários e controles de qualidade. Foram analisados, em média, 3 voluntários por curva, num total de oito curvas. As concentrações obtidas para cada tempo de coleta estão em anexo, valores abaixo do limite de quantificação (10 ng mL⁻¹) foram zerados. Os indivíduos foram codificados com as letras A para o primeiro período e B para o segundo período.

4.2- Etapa Estatística

4.2.1 – Análise das concentrações plasmáticas individuais

Nos anexos estão apresentados os dados das concentrações dos parâmetros farmacocinéticos e as razões individuais de $ASC_{0-t(h)} / ASC_{0-\infty}$, para as duas formulações (referência e teste).

Na etapa clínica houve atrasos nos tempos de coleta, os mesmos foram considerados no cálculo dos parâmetros farmacocinéticos.

A figura 5 apresenta as curvas médias das concentrações plasmáticas do Metotrexato (teste e referência) versus tempo dos 24 voluntários submetidos ao estudo.

É importante ressaltar que o fato da figura 5 ser construída a partir das médias dos valores das concentrações de cada tempo, a mesma não avalia a diferença entre os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e $ASC_{0-t(h)}$.

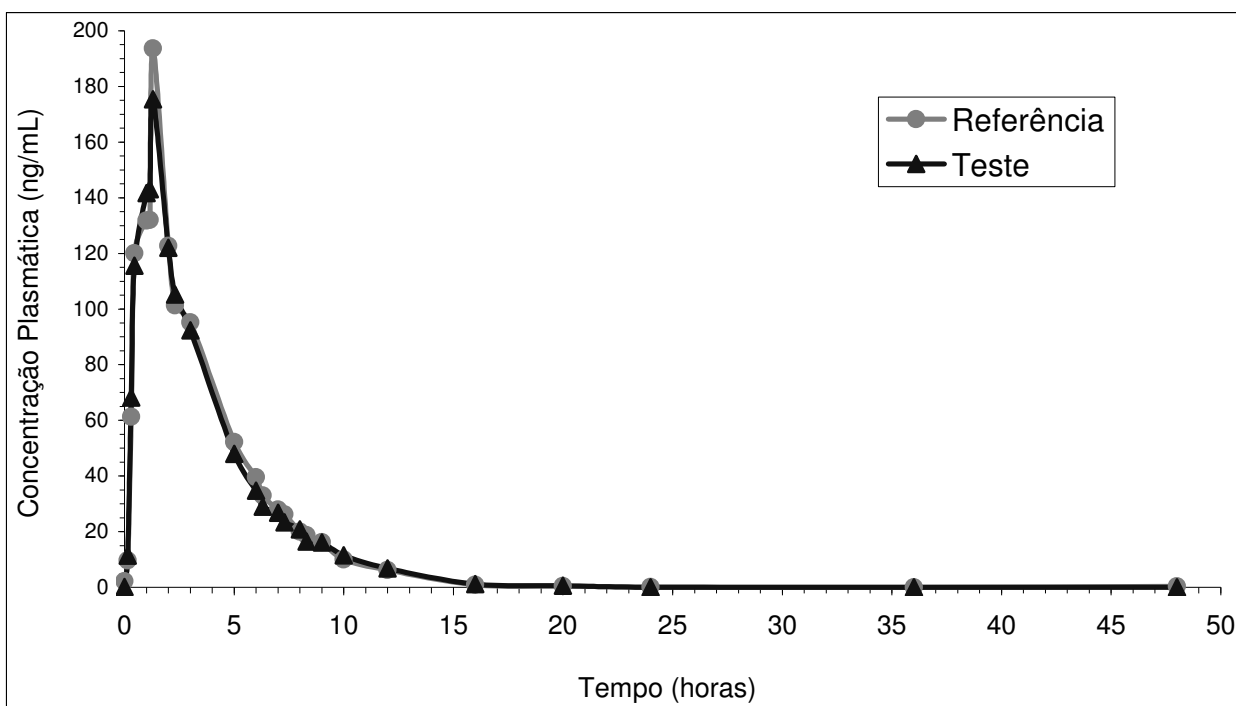


Figura 5: Curva média da concentração de dois medicamentos Reutrexato® (referência) e Metotrexato (teste), baseada em 24 voluntários.

Na tabela 17, estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos médios, usando um intervalo de confiança de 90%, obtidos das análises plasmáticas de 24 voluntários submetidos ao estudo de medicamentos Reutrexato® (referência) e Metotrexato (teste).

Tabela 17: Médias e IC (90%) dos parâmetros farmacocinéticos.

Análise Estatística	Medicamento Referência		Medicamento Teste	
	Média Geométrica	90% (CI)	Média Geométrica	90% (CI)
Tmax (horas)	1,41	1,19 – 1,63	1,47	1,21 – 1,73
Cmax (ng mL ⁻¹)	193,64	162,85 – 224,43	175,43	155,16 – 195,70
AUC 0-48h (ng hr mL ⁻¹)	630,7	522,84 – 738,56	622,97	530,14 – 715,80
AUC 0-∞ (ng hr mL ⁻¹)	671,54	564,30 – 778,78	672,82	582,48 – 763,17
T½ (horas)	2,76	2,46 – 3,06	2,48	2,25 – 2,71

Pode-se notar que os resultados obtidos para os medicamentos referência e teste são próximos, tanto para a média como para o IC 90%. Observa-se também que a média de $ASC_{0-t(h)}$ (referência = 613, 505, teste = 607,768) é maior que 80% da média de $ASC_{0-\infty}$ (referência 80% = 537, 235, teste 80% = 538,256), para o medicamento referência e teste, em acordo com o que preconiza a legislação vigente. As razões individuais de $ASC_{0-t(h)} / ASC_{0-\infty}$ encontram-se no Anexo.

A tabela 18 contém os valores de IC 90% para C_{max} , $ASC_{0-t(h)}$ e $ASC_{0-\infty}$. Observe que os intervalos estão contidos entre 80 a 125%.

Tabela 18: Valores das médias geométricas e do IC 90% para C_{max} , $ASC_{0-t(h)}$ e $ASC_{0-\infty}$.

Razão entre os medicamentos: teste e referência	Média Geométrica	IC 90%	Bioequivalência
C_{max}	94,256	(85,71 - 103,65)	Sim
$ASC_{0-t(h)}$	100,77	(91,74 - 110,69)	Sim
$ASC_{0-\mu}$	97,941	(90,33 - 106,20)	Sim

O coeficiente de variação intra-individual para C_{max} , $ASC_{0-t(h)}$ e $ASC_{0-\infty}$ foram 17,540%, 19,119% e 16,007% respectivamente.

5. Discussão

A quantificação de fármacos em fluidos biológicos por LC/MS/MS está se tornando cada vez mais comum devido a maior sensibilidade e ao custo-benefício que a técnica proporciona. Embora esta técnica necessite de um grande investimento, uma vez que o equipamento é muito caro, o método desenvolvido para quantificar MTX em plasma humano oferece algumas vantagens em relação às demais técnicas, por exemplo: não há a necessidade de reação de derivação, extração em fase sólida, o tempo e o custo necessários para preparação das amostras são bem menores, pequenas quantidades de plasma (0,2 mL) são necessárias para a análise, não há a necessidade do uso de soluções tampões e o procedimento de extração é muito simples e rápido.

A literatura relata várias técnicas de extração e quantificação de metotrexato em plasma e outros fluidos biológicos (urina, soro e saliva) tais como: extração em fase sólida combinada com pré-coluna de derivação, quantificação por CLAE com detector de fluorescência, LQ de 50 ng mL⁻¹ e corrida analítica de 15 minutos (EMARA et al, 1998), extração em fase sólida e quantificação por LC/MS/MS com fonte electrospray no modo positivo, LQ de 1,1 ng mL⁻¹ (SABATINI et al, 2005), extração em fase sólida e quantificação por LC/MS/MS com fonte electrospray no modo positivo, LQ (em urina) de 1µg mL⁻¹ e LQ (em plasma) de 5 ng mL⁻¹ (RULE et al, 2001), extração líquido-líquido e quantificação por LC/MS com fonte electrospray no modo positivo, LQ de 0,5 ng mL⁻¹ (STEINBORNER e HENION, 1999), extração em fase sólida com irradiação foto-oxidativa e detecção por fluorimetria, LQ de 3,6 ng mL⁻¹ (ZUOXIANG et al, 1997), extração em fase sólida e quantificação por CLAE com detector UV-visível, LQ de 0,05 µmol L⁻¹ (ABONELEEN et al, 1996), extração em fase sólida e quantificação por CLAE com detector UV-visível, LQ de 0,5 nmol L⁻¹ (ALBERTIONI et al, 1995), método

microbiológico (ICKE et al., 1983) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) (SCHMAUS et al., 2002).

O processamento de um grande número de matrizes biológicas, que geralmente é requerido em estudos de farmacocinética, bioequivalência e biodisponibilidade, necessita de procedimentos analíticos rápidos, sensíveis, específicos e seletivos. O presente método apresentou um limite de quantificação adequado de 10 ng mL^{-1} . É um método apropriado que pode ser realizado em um curto período, pois apresenta um tempo de retenção de 1,7 e 2,3 minutos para o metotrexato e para o folinato de cálcio respectivamente, apresentando um tempo total de corrida analítica de 3,5 minutos.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica empregada, foram levadas em consideração as características físico-químicas do metotrexato. Primeiramente definiu-se qual seria o padrão interno a ser utilizado. Foi escolhido o folinato de cálcio como padrão interno por se tratar de uma substância com bastante similaridade química do metotrexato, disponível comercialmente e que atende às finalidades analíticas propostas. A técnica de extração do fármaco das amostras de plasma foi precipitação de proteínas plasmáticas. Apesar de ser uma técnica extremamente simples, as amostras não ficam tão limpas quanto em uma extração líquido-líquido ou extração por fase sólida, porém o método por precipitação de proteínas plasmáticas foi capaz de fornecer resultados reprodutíveis e recuperação aceitável de acordo com a legislação vigente.

Após a extração do metotrexato da matriz biológica a quantificação foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC/MS/MS). O sistema LC/MS/MS com monitoramento de reações múltiplas é uma técnica altamente seletiva e sensível para mensurar quantidades pequenas de substâncias presentes em matriz complexa. Para definir os íons que seriam monitorados, do analito e do padrão interno, fez-se o espectro total (“modo

scan”) das moléculas de metotrexato e folinato de cálcio protonadas $[M-H]^+$. Através da análise do espectro total, os íons mais abundantes foram selecionados e fragmentados. Simultaneamente, todos os parâmetros do equipamento foram escolhidos e ajustados. Dessa forma, os íons de maior abundância e melhor definição para as finalidades analíticas foram: $455 > 308$ para o metotrexato e $474 > 326$ para o folinato de cálcio. Todos os parâmetros definidos e validados objetivaram a combinação de resultados confiáveis em um menor tempo de análise. O tempo de corrida cromatográfica foi relativamente curto (3,5 minutos).

O método analítico foi devidamente validado pelos parâmetros de seletividade/especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão, com uma recuperação média para o metotrexato e para o folinato de cálcio de 76,6% e 83,2% respectivamente.

Nenhuma interferência significativa foi observada nos tempos de retenção do analito e do padrão interno, nas condições analisadas, conforme demonstrado nos cromatogramas apresentados, na figura 3.

O método mostrou-se preciso e exato, inter e intra corridas analíticas para todos os valores obtidos.

De acordo com os resultados de estabilidades obtidos (resultados com coeficiente de variação inferiores a 15%), comprovou-se que o fármaco e o padrão interno são estáveis em todas as condições experimentais do estudo, nos recipientes e condições de armazenagem empregados.

O número de voluntários escolhido foi o número recomendado pela legislação vigente, que estabelece 24 voluntários.

A população do estudo foi composta por voluntários sadios tanto pela questão ética quanto para obtenção de homogeneidade entre as pessoas avaliadas, considerando a alta variabilidade inter-individual intrínseca, além de estar estabelecido pela ANVISA.

O intervalo de confiança de 90%, calculado para a razão individual das médias de C_{max} , $ASC_{0-t(h)}$ e $ASC_{0-\infty}$ para as duas formulações, esteve incluído dentro do intervalo de 80-125% definido pelo FDA (FDA, 1993; FDA, 1998), estabelecendo assim a bioequivalência para a taxa e extensão de absorção entre as duas formulações.

Para a decisão da bioequivalência, todos os voluntários foram considerados no cálculo, pois não foram observados voluntários com características discrepantes do grupo.

Ambos os tratamentos com as formulações teste e referência, em geral, foram muito bem tolerados sem adventos adversos observáveis ou relatados pelos voluntários.

A metodologia empregada para a determinação de metotrexato em plasma humano mostrou estar de acordo com os conceitos de sensibilidade, especificidade e rápido processamento das amostras requerido para estudo farmacocinético, de bioequivalência e de biodisponibilidade.

O medicamento teste foi considerado bioequivalente ao medicamento de referência, o que significa dizer que o mesmo é tão seguro e eficaz quanto ao medicamento referência, e pode ser com este intercambiável.

6. Conclusão

Foi desenvolvido e validado, de acordo com as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um método por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (LC/MS/MS) para quantificação de metotrexato em plasma humano.

De acordo com os resultados obtidos nos parâmetros descritos, pode-se considerar a metodologia como confiável, ou seja, validada para a técnica de LC/S/MS, de acordo com os procedimentos e condições analíticas aqui estabelecidas, para a determinação de metotrexato em amostras de plasma humano.

Dois medicamentos são considerados bioequivalentes quando IC de 90% para a razão entre as médias dos dados transformados em logaritmo natural de C_{max} , $ASC_{0-t(h)}$ estiverem entre 80 e 125%, conforme legislação vigente. Estando os resultados deste estudo em acordo com as especificações exigidas, razão entre as médias de C_{max} e $ASC_{0-t(h)}$ entre 80 e 125% pode-se concluir que as duas formulações: comprimido simples de metotrexato fabricado por laboratório Blausiegel Indústria e Comércio Ltda. (medicamento teste) e do comprimido simples de metotrexato (Reutrexato[®] - medicamento referência) fabricado por laboratório Apsen Farmacêutica S.A., ambos na dosagem de dois e meio miligramas, são considerados como bioequivalentes farmacêuticos.

7. Referências

Bibliográficas

ABONELEEN, H.; BACKES, D.; SIMPSON, J. Determination of methotrexate in seum by high performance liquid chromatography. *J Chromatography B*, 681:317-322, 1996.

ACKLAND, S.P.; SCHILSKY, R.L. High-dose methotrexate: a critical reappraisal. **Journal of Clinical Oncology**, 5:2017-2031, 1987.

ALBERTIONI, F.; PETTERSON, B.; BECK, O.; RASK, C.; SEIDEMAN, P.; PETERSON, C. Simultaneous quantitation of methotrexate and its two main metabolites in biological fluids by a novel solid phase extraction procedure using high-performance liquid chromatography. **J Chromatography B**, 665:162-170, 1995.

BAGGOTT, J.E.; VAUGHN, W.H.; HUDSON, B.B. Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5-adenylate deaminase by poliglutamates of methotrexate and oxidized folates and 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide. **Biochem J**, 236:193-200, 1986.

BLEYER, W.A. The clinical pharmacology of methotrexate: new application of an old drug. **Cancer** 41: 36-51, 1978.

BOURNERIAS, I.; CHOSIDOW, O. Méthotrexate et psoriasis. Pharmacologie et prise en charge thérapeutique. **Ann Dermatol Veneréol**, 121:69-74, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada da ANVISA (RDC) nº 135, de 29 de maio de 2003. Estabelece regulamento técnico para medicamento genérico. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 1170, de 19 de abril de 2006. Dispõe sobre guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos.

Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de abril de 2006.

CHABNER, B.A.; ALLEGRA, C.J.; CURT, G.A.; CLENDENINN, N. J.; BARAM, J.; KOIZUMI, S.; DRAKE, J.C. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? **J Clin Invest**, 76:907-912, 1985.

CRONSTEIN, B.N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in vivo model of inflammation. **J Clin Invest**, 92: 2675-2682, 1993.

CRONSTEIN, B.N. The mechanism of action of methotrexate. **Rheum Dis Clin North Am**, 23:739-755, 1997.

DANÃO, T.; STEINBRUNNER, J.; MEDENDORP, S.V.; MACKENZIE, A.H.; SEGAL, A.M. Methotrexate (MTX) in juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, 32: S28, 1989.

DOLLERY, C. **Therapeutic Drugs** - Second Edition. Volume 2. Churchill Livingstone, New York, 1999.

DONEHOWER, R.C.; HANDE, K.R.; DRAKE, J.C.; CHABNER, B.A. Presence of 2,4-diamino-N¹⁰-methyl-ptericoic acid after high-dose methotrexate. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 26:63-72, 1979.

DUFOUR, J.F.; KAPLAN, M.M. Methotrexate therapy and liver disease. **N. Engl. J. Med**, 335:898-899, 1996.

EMARA, S.; ASKAL, H.; MASUJIMA, T. Rapid determination of methotrexate in plasma by high performance liquid chromatography with on-line solid phase extraction and automated precolumn derivatization. **Biomed Chromatogr**, 12, 338-342, 1998.

FLOMBAUM, C.D.; MEYERS, P.A. High-dose leucovorin as sole therapy for methotrexate toxicity. **J. Clin Oncol**, 17:1589-1594, 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION IN VIVO. Bioequivalence guidances. **Pharmacopeial**, 9:6501-6508, 1993.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bioavailability and bioequivalence requeriments; Abbreviated applications; Proposed revisions. FDA Proposed rule. **Fed. Regist.** 63:64222-64228, 1998.

GERÊNCIA GERAL DE INSPEÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS E PRODUTOS. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2.v., 2002.

GIBALDI, M. **Biopharmaceuticals and Clinical Pharmacokinetics**, 4^a Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. 406, 1991.

GILBERT, S.C.; KLINTMALM, G.; MENTER, A.; SILVERMAN, A. Methotrexate-induced cirrhosis requiring liver transplantation in three patients with psoriasis. **Arch. Intern. Med**, 150:889-891, 1990.

GOERTTLER, E.; KUTZNER, H.; PETER, H.H.; REQUENA. L.; 1999; Methotrexate-induced papular eruption in patients with rheumatic diseases: distinctive adverse cutaneous reaction produced by methotrexate in patients with collagen vascular diseases. **J. Am. Acad. Dermatol.**; VOL 40, P702-707, (REF 27).

GRAHAM, L.D.; MYONES, B.L.; RIVAS-CHACON, R.F.; PACHMAN, L.M. Morbidity Associated with long-term methotrexate therapy in juvenile rheumatoid arthritis. **J Pediatr**, 120: 68-473, 1992.

GUBNER, R.; AUGUST, S.; GINSBERG, V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. **Am J Med Sci**, 221: 176-182, 1951.

HESTON, W.D. Development of a Biologic Basis for PSMA Targeting in Prostate Cancer. **Govt Reports Announcements & Index (GRA&I)**, Issue 02, 2004.

ICKE, G.C.; DAVIS, R.E.; THOM, J. A microbiological assay for the measurement of methotrexate in biological fluids. **J Clin Pathol** 36: 1116-1119, 1983.

JOHNSON, C.A.; RUSSEL, A.S.; KOVITHAVONGS, T.; DASGUPTA, M. Measurement of immunologic and inflammatory response in vitro in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. **J. Rheumatol**, 13:294-296, 1986.

KOREN, G.; LISHNER, M. Cancer Chemotherapeutic Agents in Pregnancy. **Reprod Toxicol**, 19(2):252-3, 2004.

LEBWOHL, M.; ALI, S. Treatment of psoriasis. Part 2. Systemic therapies. **J Am Acad Dermatol**, 45:649-61, 2001.

MARTINS, G.A.; ARRUDA, L. Tratamento sistêmico da psoríase, Parte I: Metotrexato e acitretina. **Na Bras Dermatol**, 79(3): 263-278 mai/jun. 2004.

MORABITO, L.; MONTESINOS, M.C.; SCHREIBMAN, D.M.; BALTER, L.; THOMPSON, L.F.; RESTA, R.; CARLIN, G.; HUIE, M.A.; CRONSTEIN, B.N. Methotrexate and sulfalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5-nucleotidase –mediated conversation of adenine nucleotides. **J Clin Invest**, 101: 295-300, 1998.

NESHER, G.; MOORE, T.L.; DORNER, RH. In vitro effects of methotrexate on peripheral blood monocytes: modulation by folinic acid and S-adenosylmethionine. **Ann Rheum Dis**, 50: 637-641, 1991.

NOVAES, S.G.; MELLO, S.B.V. Atividade das enzimas cicloogenases e drogas anti-reumáticas modificadoras de doença. **Rev Bras Reumatol**, 40, n^o2, Mar/abr, 2000.

OLSEN, E.A. The pharmacology of methotrexate. **J Ann Acad Dermatol**, 25:306-18, 1991.

OSTENSEN, M.; FUHRER, L. Counselling Patients With Rheumatic Disease Who Desire Children. **Experience of a Specialized Center Lupus**; 13(9): 751, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; TITTER, J.M. **Farmacologia**; 4ª edição; Editora Guanabara Koogan S. A., 2001.

ROEGNIK, H.H.JR.; AUERBACH, R.; MAIBACH, H.I.; WEINSTEIN, G.D. Methotrexate in psoriasis: consensus conference. **J Am Acad Dermatol**, 38:478-85, 1998;

ROEGNIK, H.H.JR.; AUERBACH, R.; MAIBACH, H.I.; WEINSTEIN, G.D. Methotrexate in psoriasis: Revised guidelines. **J Am Acad Dermatol**, 19:145-55, 1988.

RULE, G.; CHAPPLE, M.; HENION, J.; A 384-well solid-phase extraction for LC/MS/MS determination of methotrexate and its 7-hydroxy metabolite in human urine and plasma. **Anal Chem**, 73 (3): 439-443, 2001.

SABATINI, L.; BARBIERI, A.; TOSI, M.; VIOLANTE, F.S. A new high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil as markers of surface contamination for occupational exposure monitoring. **J. Mass Spectrom**, 40:669-674, 2005.

SANTOS, W.S.; BASTOS, V.; HILÁRIO, M.O.; GOLDENBERG, J. Uso do MTX no tratamento da artrite reumatóide juvenil. **Rev Bras Reumatol**, 35, 4, Jul/Ago, 1995.

SASAKI, Y. F. Micronucleus Test With Mouse Peripheral Blood Erythrocytes: Summary Report of the Fifth Collaborative Study By The Collaborative Study Group For The Micronucleus Test (Csgmt/Jems.Mms). **Mutat Res**, 253(3):283, 1991.

SAYGILI, U.; GOL, M. Influence of high dose methotrexate therapy on the primordial follicles of the mouse ovary. **Arch Gynecol Obstet**, 271(Suppl 1):S37, 2005.

SCHMAUS, G.; SCHIERL, R.; FUNCK, S. Monitoring surface contamination by antineoplastic drugs using gas chromatography-mass spectrometry and voltammetry. **Am J. Health. Sust. Pharm**, 59:956, 2002.

SHAW, M.C.; MAXWELL, P.R.; MENDONÇA, C. Alpha Glutathione S-Transferase As A Novel Biomarker For Monitoring Chronic Methotrexate Hepatotoxicity. **Toxicologist**, 78(1-S):171-2, 2004.

SPECKMAIER, M.; FINDEISEN, J.; WOO, P.; HALL, A.; SILLS, J.A.; PRICE, T.; HOLLINGWORTH, P.; CRAFT, A.; ANSELL, B.M. Low-dose methotrexate in systemic onset juvenile chronic arthritis. **Clin Exp Rheumatol** 7:647-650, 1989.

STEINBORNER, S.; HENION, J.; Liquid-liquid extractation in the 96-well plate format with SRM LC/MS quantitative determination of methotrexate and its major metabolite in human plasma. **Anal. Chem.**, 71(13), 2340-2345, 1999.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica e fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos.** [S.n.s.L.], 78, 1999.

TERNOWITZ, T.; BJERRING, P.; ANDERSON, P.H.; SCHROEDER, J.M.; KRAGBALLE, K. Methotrexate inhibits the human C5a induced skin response in psoriatic patients. **J. Invest Dermatol.**, 89 (1987) 192.

TRUCKENBRODT, H.; HAFNER, R. Methotrexate therapy in juvenile rheumatoid Arthritis: A retrospective Study. **Arthritis Rheum**, 29:801-807, 1986.

WEINBLATT, M.E.; COBLYN, J.S.; FOX, D.A.; FRASER, P.A.; HOLDSWORTH, D.E.; GLASS, D.N.; TRENTAM, D.E. Efficacy of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, 312: 818-822 1985.

WEINBLATT, H.J.; MAIER, A.L.; FRASER, P.A.; COBLYN, J.S. Longterm prospective study of methotrexate in rheumatoid arthritis: conclusion of after 132 months of therapy. **J Rheumatol** 25: 238-242, 1998.

WILLIAMS, H.J.; WILKENS, R.F.; SAMUELSON, C.O. JR. Comparison of low dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis: a controlled clinical trial. **Arthritis Rheum**, 28:721-730, 1985.

WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L. Harrison's. **Principles of Internal Medicine**; 12th Ed. New York, McGraw-Hill, Medical Publishing. 1991.

ZUOXIANG, Y.; DOUGLAS, W.; KARL-SIEGFRIED, B. Determination of methotrexate and its metabolite 7-hydroxymethotrexate by direct injection of human plasma into a column-switching liquid chromatographic system using post-column photochemical reaction with fluometric detection. **J. Chromatography B**, 689:379-386, 1997.

Anexos

CONCENTRAÇÃO INDIVIDUAL DE METOTREXATO (TESTE)							
Tempo	Vol-01	Vol-02	Vol-03	Vol-04	Vol-05	Vol-06	Vol-07
0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	30.916	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.50	147.001	36.410	24.413	36.495	0.000	29.479	37.140
0.75	295.202	160.797	55.787	50.059	20.222	16.545	209.505
1.00	246.313	140.947	118.138	79.198	60.414	34.650	180.651
1.25	305.124	123.798	56.010	76.914	66.306	45.058	192.529
1.50	233.798	158.425	86.760	72.615	52.899	47.994	145.905
2.00	155.829	222.993	40.083	54.749	94.280	63.607	114.914
2.50	161.506	197.680	48.974	32.805	59.361	69.354	108.728
3.00	137.729	241.743	36.744	41.353	44.694	127.671	50.330
5.00	90.593	100.161	24.521	18.302	23.264	90.113	43.385
6.00	62.897	81.349	21.866	22.147	14.903	42.365	17.872
6.50	58.823	62.976	12.034	23.995	11.154	45.400	19.083
7.00	59.581	53.241	19.104	0.000	10.824	23.997	15.965
7.50	47.922	71.661	15.913	0.000	12.183	19.538	15.025
8.00	39.675	49.523	0.000	0.000	10.014	16.184	13.631
8.50	32.629	47.551	0.000	0.000	0.000	20.816	0.000
9.00	30.434	50.408	0.000	0.000	0.000	15.545	14.220
10.00	19.963	30.365	0.000	0.000	0.000	11.387	0.000
12.00	18.476	13.776	0.000	0.000	0.000	10.060	0.000
16.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
48.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
CONCENTRAÇÃO INDIVIDUAL DE METOTREXATO (REFERÊNCIA)							
Tempo	Vol-01	Vol-02	Vol-03	Vol-04	Vol-05	Vol-06	Vol-07
0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	24.276	0.000	16.692	0.000	0.000	11.992	24.175
0.50	75.998	60.663	114.853	32.789	0.000	63.917	166.753
0.75	174.908	219.507	135.904	76.979	0.000	122.527	240.311
1.00	207.801	292.984	120.524	89.859	14.918	85.215	185.569
1.25	362.674	227.166	82.385	63.714	37.085	120.112	166.515
1.50	232.702	402.294	96.329	69.599	39.201	168.496	81.022
2.00	159.829	220.213	71.849	41.958	49.861	72.034	108.893
2.50	149.305	444.002	60.016	35.765	48.330	74.321	101.737
3.00	118.948	294.344	46.271	28.815	56.613	45.235	113.233
5.00	79.712	125.183	22.539	10.550	32.463	28.791	37.145
6.00	45.272	87.408	25.133	0.000	15.905	22.761	34.780
6.50	35.022	66.651	18.375	0.000	10.272	19.625	32.837
7.00	33.625	49.379	16.169	0.000	14.113	0.000	36.569
7.50	41.543	39.804	0.000	0.000	12.944	11.850	33.368
8.00	39.142	50.094	0.000	0.000	0.000	16.837	26.396
8.50	37.866	45.830	0.000	0.000	0.000	10.720	0.000
9.00	33.976	44.870	0.000	0.000	0.000	15.529	21.643
10.00	24.011	28.622	0.000	0.000	0.000	0.000	16.327
12.00	21.980	17.844	0.000	0.000	0.000	0.000	13.973
16.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
48.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
NC = Ponto Não Coletado/ Concentração em ng mL ⁻¹ / Tempo em horas							

CONCENTRAÇÃO INDIVIDUAL DE METOTREXATO (TESTE)							
Tempo	Vol-09	Vol-10	Vol-11	Vol-12	Vol-13	Vol-14	Vol-15
0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	49.250	52.862	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.50	51.744	234.005	38.530	88.055	51.779	17.835	99.302
0.75	152.832	270.009	52.321	207.386	117.848	36.691	176.749
1.00	195.798	275.372	60.691	156.812	176.824	72.237	211.399
1.25	196.197	240.494	65.374	206.564	246.032	81.841	194.229
1.50	181.013	202.788	112.557	219.185	230.528	110.658	206.296
2.00	168.077	152.411	117.702	192.159	171.041	197.532	208.746
2.50	162.428	111.052	93.511	149.560	103.682	157.871	128.465
3.00	150.960	99.298	126.405	132.871	96.423	145.168	93.755
5.00	85.930	62.423	54.991	69.448	50.765	92.427	49.922
6.00	78.146	38.988	38.267	62.332	52.326	80.170	39.817
6.50	56.751	31.158	25.760	39.728	45.939	49.923	37.478
7.00	53.119	36.153	21.161	24.598	36.773	43.225	27.719
7.50	50.071	31.017	23.613	28.908	33.115	35.039	25.879
8.00	40.375	27.763	16.144	24.357	29.272	29.618	22.896
8.50	33.597	20.341	0.000	30.935	45.849	28.635	18.308
9.00	34.487	19.896	0.000	15.759	15.107	25.341	16.399
10.00	25.376	14.953	0.000	11.537	20.423	17.723	0.000
12.00	19.555	0.000	0.000	0.000	14.392	10.203	0.000
16.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
48.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
CONCENTRAÇÃO INDIVIDUAL DE METOTREXATO (REFERÊNCIA)							
Tempo	Vol-09	Vol-10	Vol-11	Vol-12	Vol-13	Vol-14	Vol-15
0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	10.839	10.532
0.50	22.494	109.938	12.257	186.540	35.629	71.508	92.334
0.75	36.281	177.993	19.875	239.346	89.716	101.195	165.303
1.00	155.064	170.672	38.677	292.985	147.869	214.253	210.874
1.25	217.486	127.460	79.312	273.891	211.651	198.118	169.571
1.50	297.154	146.510	78.529	276.725	222.429	231.950	220.821
2.00	224.048	161.750	73.173	206.751	215.254	162.518	151.720
2.50	165.389	116.209	132.060	161.732	180.787	144.005	114.594
3.00	153.586	110.105	110.845	140.638	144.609	96.121	92.561
5.00	84.153	66.101	59.600	63.076	75.279	52.932	52.743
6.00	79.072	37.630	35.767	41.423	56.923	35.033	37.583
6.50	74.051	22.193	33.252	31.747	58.638	34.764	29.446
7.00	53.816	39.019	26.693	29.166	52.800	25.210	22.708
7.50	61.523	26.367	26.371	25.228	42.120	24.810	16.708
8.00	51.043	25.533	13.461	18.673	30.333	23.163	20.768
8.50	43.204	21.089	0.000	14.073	30.279	17.015	19.636
9.00	38.775	18.835	0.000	13.391	24.231	0.000	12.466
10.00	38.573	16.203	0.000	0.000	18.518	11.667	0.000
12.00	22.452	0.000	0.000	0.000	15.384	0.000	14.282
16.00	10.880	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
48.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
NC = Ponto Não Coletado/ Concentração em ng mL ⁻¹ / Tempo em horas							

CONCENTRAÇÃO INDIVIDUAL DE METOTREXATO (TESTE)							
Tempo	Vol-16	Vol-17	Vol-18	Vol-19	Vol-20	Vol-21	Vol-22
0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	0.000	24.806	17.594	11.282	0.000	20.991	0.000
0.50	25.702	110.694	49.628	54.015	43.835	48.775	92.398
0.75	56.959	149.327	73.538	117.079	80.436	102.767	162.291
1.00	65.542	109.169	94.869	111.033	105.867	160.120	149.212
1.25	101.944	88.250	170.819	104.773	113.772	193.908	121.057
1.50	93.067	83.604	145.844	86.377	119.376	182.709	134.716
2.00	90.476	52.497	134.261	74.794	90.890	122.376	68.462
2.50	172.317	46.694	105.683	56.418	69.603	120.233	58.913
3.00	169.084	67.255	91.907	44.606	53.727	92.044	38.655
5.00	68.210	22.203	45.012	24.079	30.482	64.691	27.788
6.00	52.112	17.545	39.729	22.613	22.182	46.861	17.496
6.50	52.221	15.658	37.211	18.775	20.959	36.489	20.411
7.00	43.374	20.815	29.557	18.555	18.315	35.700	16.662
7.50	40.359	12.132	33.217	15.625	15.017	38.831	17.180
8.00	28.389	0.000	22.254	15.620	13.582	32.508	12.687
8.50	29.405	0.000	20.112	12.948	12.420	29.115	11.631
9.00	29.188	0.000	17.705	13.875	12.053	27.573	10.968
10.00	18.645	0.000	10.739	0.000	0.000	19.639	0.000
12.00	16.416	0.000	0.000	0.000	0.000	14.345	0.000
16.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
48.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
CONCENTRAÇÃO INDIVIDUAL DE METOTREXATO (REFERÊNCIA)							
Tempo	Vol-16	Vol-17	Vol-18	Vol-19	Vol-20	Vol-21	Vol-22
0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	0.000	28.513	10.354	16.906	0.000	39.522	0.000
0.50	10.371	110.411	80.501	67.359	81.699	107.740	64.690
0.75	17.295	147.352	134.525	115.891	145.932	138.287	123.880
1.00	44.461	204.234	192.352	135.581	136.288	129.567	136.050
1.25	76.510	209.818	218.170	111.702	109.154	98.022	152.889
1.50	110.260	179.044	202.102	136.055	94.388	82.932	156.420
2.00	141.726	135.954	140.331	109.119	66.019	73.211	126.385
2.50	144.151	108.659	106.850	92.861	44.441	62.729	88.423
3.00	98.791	84.118	89.477	72.797	42.437	47.239	89.763
5.00	56.660	37.393	50.502	38.451	27.674	37.618	39.215
6.00	46.617	25.260	39.014	31.074	26.321	25.486	27.755
6.50	39.001	23.923	32.061	24.669	19.067	24.273	20.233
7.00	25.995	28.640	37.158	21.737	21.208	22.257	22.909
7.50	27.584	18.392	24.228	20.423	20.414	25.239	20.248
8.00	21.934	18.119	22.460	17.513	17.380	21.354	12.668
8.50	19.081	13.467	16.909	15.271	15.958	22.160	0.000
9.00	19.715	16.615	15.578	15.568	13.960	18.208	14.359
10.00	13.785	11.204	13.127	11.254	0.000	16.071	0.000
12.00	26.538	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
16.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
24.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
48.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
NC = Ponto Não Coletado/ Concentração em ng mL ⁻¹ / Tempo em horas							

CONCENTRAÇÃO INDIVIDUAL DE METOTREXATO (TESTE)								
Tempo	Vol-23	Vol-24	Vol-25	Média	Mínimo	Máximo	D.P.	CV(%)
0.00	0.000	0.000	0.000	0.00	0.00	0.00	0.00	-
0.25	0.000	26.492	0.000	8.70	0.00	52.86	15.60	179.26
0.50	14.081	131.047	54.153	56.22	0.00	234.01	52.89	94.07
0.75	75.565	191.199	131.616	109.81	0.75	295.20	81.74	74.43
1.00	107.562	189.376	165.619	121.14	1.00	275.37	72.63	59.95
1.25	112.731	184.750	146.739	127.37	1.25	305.12	79.20	62.18
1.50	100.893	187.712	173.485	124.95	1.50	233.80	69.51	55.63
2.00	81.494	154.492	151.583	110.42	2.00	222.99	63.74	57.72
2.50	46.201	127.057	113.793	92.94	2.50	197.68	54.71	58.86
3.00	66.038	97.293	93.070	86.96	3.00	241.74	55.99	64.39
5.00	33.490	51.260	60.640	48.11	5.00	100.16	28.48	59.20
6.00	24.198	28.848	46.748	36.66	6.00	81.35	22.48	61.33
6.50	18.283	26.576	45.929	30.82	6.50	62.98	17.16	55.69
7.00	14.680	25.802	33.963	26.07	0.00	59.58	15.34	58.85
7.50	14.814	15.641	23.127	24.38	0.00	71.66	15.89	65.17
8.00	12.572	15.244	11.110	18.79	0.00	49.52	12.72	67.67
8.50	10.075	13.894	18.094	17.11	0.00	47.55	13.91	81.30
9.00	12.535	0.000	19.772	15.12	0.00	50.41	12.22	80.84
10.00	0.000	12.492	0.000	9.01	0.00	30.37	9.40	104.30
12.00	0.000	0.000	10.673	6.07	0.00	19.56	7.21	118.81
16.00	0.000	0.000	0.000	1.78	0.00	16.00	5.12	-
20.00	0.000	0.000	0.000	2.22	0.00	20.00	6.41	-
24.00	0.000	0.000	0.000	2.67	0.00	24.00	7.69	-
36.00	0.000	0.000	0.000	4.00	0.00	36.00	11.53	-
48.00	0.000	0.000	0.000	5.33	0.00	48.00	15.37	-
CONCENTRAÇÃO INDIVIDUAL DE METOTREXATO (REFERÊNCIA)								
Tempo	Vol-23	Vol-24	Vol-25	Média	Mínimo	Máximo	D.P.	CV(%)
0.00	NC	0.000	0.000	0.00	0.00	0.00	0.00	-
0.25	22.034	11.014	0.000	7.82	0.00	39.52	10.99	140.55
0.50	44.127	65.968	39.393	63.21	0.00	186.54	49.82	78.81
0.75	104.707	93.674	98.122	105.65	0.00	240.31	72.14	68.28
1.00	79.843	102.585	148.592	128.15	1.00	292.99	81.98	63.97
1.25	88.713	164.863	155.654	129.37	1.25	273.89	75.52	58.38
1.50	53.345	143.937	134.934	139.58	1.50	402.29	97.18	69.62
2.00	56.208	113.468	111.465	109.23	2.00	224.05	66.12	60.54
2.50	41.425	89.789	83.502	101.90	2.50	444.00	85.89	84.29
3.00	39.700	68.278	74.001	82.64	3.00	294.34	60.20	72.85
5.00	22.322	36.877	42.050	42.86	5.00	125.18	26.90	62.76
6.00	15.694	29.058	33.139	31.80	0.00	87.41	20.21	63.55
6.50	18.661	24.721	17.447	26.75	0.00	74.05	17.70	66.19
7.00	18.568	24.508	27.794	24.52	0.00	53.82	14.44	58.91
7.50	15.993	14.495	25.384	21.38	0.00	61.52	13.33	62.34
8.00	16.199	22.180	22.512	18.95	0.00	51.04	12.37	65.27
8.50	0.000	14.945	18.523	13.99	0.00	45.83	12.37	88.42
9.00	17.038	16.328	16.669	14.65	0.00	44.87	10.75	73.37
10.00	0.000	11.578	13.675	9.64	0.00	38.57	9.78	101.52
12.00	10.792	0.000	0.000	6.05	0.00	26.54	8.39	138.71
16.00	0.000	0.000	0.000	2.26	0.00	16.00	5.49	242.35
20.00	0.000	0.000	0.000	2.31	0.00	20.00	6.52	-
24.00	0.000	0.000	0.000	2.77	0.00	24.00	7.82	-
36.00	0.000	0.000	0.000	4.15	0.00	36.00	11.73	-
48.00	0.000	0.000	0.000	5.54	0.00	48.00	15.64	-
NC = Ponto Não Coletado/ Concentração em ng mL ⁻¹ / Tempo em horas								

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS METOTREXATO (REFERÊNCIA)							
Voluntário	Tmax (h)	Cmax (ng mL ⁻¹)	ASCult (ng.h.mL ⁻¹)	t _{1/2} (h)	ASCall (ng.h.mL ⁻¹)	ASCinf (ng.h.mL ⁻¹)	Rand
1	1.250	362.674	931.894	3.040	975.854	1028.310	TR
2	2.500	444.002	1524.617	2.552	1560.305	1590.306	TR
3	0.750	135.904	343.372	2.323	347.414	397.572	RT
4	1.000	89.859	177.365	1.408	182.640	198.793	TR
5	3.000	56.613	223.615	1.861	226.851	258.368	TR
6	1.500	168.496	387.223	2.722	394.988	448.199	RT
7	0.750	240.311	674.154	3.155	702.100	737.758	RT
9	1.500	297.154	1109.374	3.445	1131.134	1163.443	TR
10	0.750	177.993	694.770	4.027	710.973	788.916	TR
11	2.500	132.060	470.900	1.857	474.265	506.973	RT
12	1.017	292.985	898.737	1.742	905.322	932.389	RT
13	1.500	222.429	907.439	2.477	938.207	962.416	TR
14	1.500	231.950	682.844	2.152	694.511	719.062	TR
15	1.500	220.821	679.510	2.547	708.074	731.995	TR
16	2.500	144.151	593.686	3.083	646.762	711.717	TR
17	1.250	209.818	614.046	2.081	625.250	647.676	TR
18	1.250	218.170	658.935	4.098	672.062	736.551	RT
19	1.500	136.055	501.326	2.377	512.580	539.912	RT
20	0.750	145.932	373.282	2.828	380.262	430.242	TR
21	0.750	138.287	441.277	3.498	457.482	522.388	RT
22	1.500	156.420	518.304	2.098	525.484	561.774	RT
23	0.750	104.707	306.805	5.031	328.389	385.132	TR
24	1.250	164.863	496.525	2.317	508.103	535.225	TR
25	1.250	155.654	514.124	3.437	527.799	581.929	RT

Média	1.407	193.638	613.505	2.757	630.700	671.544	
Mediana	1.250	166.680	555.995	2.550	576.525	614.803	
Mínimo	0.750	56.613	177.365	1.408	182.640	198.793	
Máximo	3.000	444.002	1524.617	5.031	1560.305	1590.306	
D.P.	0.633	88.006	300.755	0.855	308.305	306.540	
CV (%)	44.984	45.449	49.022	31.032	48.883	45.647	

PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS METOTREXATO (TESTE)							
Voluntário	Tmax (h)	Cmax (ng mL ⁻¹)	ASCult (ng.h.mL ⁻¹)	t _{1/2} (h)	ASCall (ng.h.mL ⁻¹)	ASCinf (ng.h.mL ⁻¹)	Rand
1	1.250	305.124	1048.265	2.799	1085.217	1122.884	TR
2	3.000	241.743	1138.640	1.633	1166.077	1171.092	TR
3	1.000	118.138	259.309	2.915	263.287	326.239	RT
4	1.000	79.198	233.427	2.377	239.426	299.347	TR
5	2.000	94.280	254.918	1.904	257.421	282.426	TR
6	3.000	127.671	544.210	2.179	564.330	575.835	RT
7	0.750	209.505	498.982	1.907	506.092	538.109	RT
9	1.250	196.197	971.233	3.018	1010.343	1056.364	TR
10	1.000	275.372	818.575	2.488	833.528	872.239	TR
11	3.000	126.405	510.683	1.700	514.719	550.280	RT
12	1.500	219.185	826.619	2.056	838.156	860.837	RT
13	1.250	246.032	759.682	2.648	788.466	814.661	TR
14	2.000	197.532	800.591	2.322	820.997	834.764	TR
15	1.000	211.399	708.566	2.398	716.765	765.308	TR
16	2.500	172.317	744.736	2.601	777.568	806.337	TR
17	0.750	149.327	353.725	2.270	356.758	393.452	TR
18	1.250	170.819	578.298	2.390	589.037	615.327	RT
19	0.750	117.079	350.609	2.531	357.546	401.276	RT
20	1.500	119.376	383.668	2.689	389.695	430.429	TR
21	1.250	193.908	719.786	3.165	748.357	785.291	RT
22	0.750	162.291	390.596	4.761	396.080	465.928	RT
23	1.250	112.731	368.209	2.295	374.477	409.711	TR
24	0.750	191.199	666.849	1.973	679.341	702.409	TR
25	1.500	173.485	656.249	2.430	677.595	693.666	RT

Média	1.469	175.430	607.768	2.477	622.970	657.259	
Mediana	1.250	172.901	617.274	2.394	633.316	654.497	
Mínimo	0.750	79.198	233.427	1.633	239.426	282.426	
Máximo	3.000	305.124	1138.640	4.761	1166.077	1171.092	
D.P.	0.735	57.954	255.848	0.625	265.359	258.287	
CV (%)	50.020	33.036	42.096	25.234	42.596	39.298	

RAZÕES INDIVIDUAIS DE ASCult / ASCinf PARA AS DUAS FORMULAÇÕES						
Medicamento Referência				Medicamento Teste		
Vol	ASCult	ASCinf	Razão ASCult/ASCinf	ASCult	ASCinf	Razão ASCult/ASCinf
1	931.894	1028.310	0.906	1048.265	1122.884	0.934
2	1524.617	1590.306	0.959	1138.640	1171.092	0.972
3	343.372	397.572	0.864	259.309	326.239	0.795
4	177.365	198.793	0.892	233.427	299.347	0.780
5	223.615	258.368	0.865	254.918	282.426	0.903
6	387.223	448.199	0.864	544.210	575.835	0.945
7	674.154	737.758	0.914	498.982	538.109	0.927
9	1109.374	1163.443	0.954	971.233	1056.364	0.919
10	694.770	788.916	0.881	818.575	872.239	0.938
11	470.900	506.973	0.929	510.683	550.280	0.928
12	898.737	932.389	0.964	826.619	860.837	0.960
13	907.439	962.416	0.943	759.682	814.661	0.933
14	682.844	719.062	0.950	800.591	834.764	0.959
15	679.510	731.995	0.928	708.566	765.308	0.926
16	593.686	711.717	0.834	744.736	806.337	0.924
17	614.046	647.676	0.948	353.725	393.452	0.899
18	658.935	736.551	0.895	578.298	615.327	0.940
19	501.326	539.912	0.929	350.609	401.276	0.874
20	373.282	430.242	0.868	383.668	430.429	0.891
21	441.277	522.388	0.845	719.786	785.291	0.917
22	518.304	561.774	0.923	390.596	465.928	0.838
23	306.805	385.132	0.797	368.209	409.711	0.899
24	496.525	535.225	0.928	666.849	702.409	0.949
25	514.124	581.929	0.883	656.249	693.666	0.946