

SANDRO EVANDIR DE OLIVEIRA

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE DUAS
FORMULAÇÕES DE OXCARBAZEPINA DE 600 mg EM
VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS**

CAMPINAS

2006

SANDRO EVANDIR DE OLIVEIRA

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE DUAS
FORMULAÇÕES DE OXCARBAZEPINA DE 600 mg EM
VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, área de concentração em Clínica Médica.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto De Nucci

CAMPINAS

2006

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

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

Ol4e Oliveira, Sandro Evandir de
 Estudo de bioequivalência entre duas formulações de oxcarbazepina
 de 600mg em voluntários sadios de ambos os sexos / Sandro Evandir
 de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Gilberto De Nucci
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Epilepsia. 2. Farmacologia. 3. Medicamentos Genéricos.
I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : “Bioequivalence study between two 600mg
Oxcarbazepine formulations in health volunteers of both genders”**

Keywords: • Epilepsy
 • Pharmacology
 • Therapeutic Equivalency

Área de concentração : Clínica Médica

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

Banca examinadora: Prof Dr Gilberto De Nucci

Profa. Dra. Maria Elena Guariento

Prof Dr Eduardo Werneck Barroso

Data da defesa: 05-05-2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Prof. Dr. Gilberto De Nucci*

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) Eduardo Werneck Barroso

2. Prof(a). Dr(a). Maria Elena Guariento

3. Prof(a). Dr(a). Gilberto De Nucci

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 05/05/2006

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Maria Alice, por todo amor, incentivo, apóio e credibilidade durante toda minha vida. E a quem devo toda a minha formação acadêmica e o caráter de que tanto me orgulho.

A meus irmãos, Soraia Cristina, Cecília Aparecida, Silvana Tolentino e Paulo Sérgio, Silvio José e a meu cunhado Edson Tolentino por terem sido companheiros, amigos e participantes de todo o meu crescimento.

A Galeno Desenvolvimento em Pesquisas, por ter me ensinado e proporcionado a experiência profissional.

Primeiramente, o Prof. Dr. Gilberto De Nucci por ter-me dado essa chance, pela credibilidade, incentivo e presença nos momentos em que precisei, apóio este imprescindível a realização e conclusão desse trabalho.

A Carlos Sverdloff, Yara Del Antônio Taveira, Gustavo Mendes, André Borges, Elisabete Ceccon, Renato Medeiros, Diogo de Oliveira, Alberto dos Santos, Vinícius Marcondes, José Jorge Gabbai, Yuri, Gabriel Garcia, Hugo do Valle, Mauro Sucupira, Claudia Domingues, Rafael Barrietos, Márcia Aparecida, Paulo Spolidorio, Lina Sayuri e a prof^a Maria Rita Barbosa pela imensa ajuda, apóio e amizade, sempre presentes nos momentos de duvidas.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxi</i>
1- INTRODUÇÃO.....	35
1.1- Histórico.....	37
1.2- Normas e legislação.....	37
1.3- Método analítico de uso habitual.....	38
1.4- Considerações estatístico.....	39
1.5- Sobre a epilepsia.....	39
1.6- Oxcarbazepina.....	40
1.7- Composição.....	40
1.8- Mecanismo de ação.....	41
1.9- Indicação de uso.....	41
1.10- Contra-indicação e precauções.....	41
1.11- Farmacocinética.....	41
1.12- Reações diversas.....	43
1.13- Tratamento.....	43
2- OBJETIVOS.....	45
3- METODOLOGIA.....	49
3.1- Etapa clínica.....	51
3.2- Etapa analítica.....	58
3.3- Etapa estatística.....	75

4- RESULTADOS.....	77
5- DISCUSSÃO.....	83
6- CONCLUSÃO.....	89
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
8- ANEXOS.....	103
9- PUBLICAÇÃO.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
anti-HCV	anticorpos para o vírus de hepatite C
anti-HIV	anticorpos para o vírus da síndrome de imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	área sob a curva
BPC	boas práticas clínicas
BPF	boas práticas de fabricação
BPL	boas práticas laboratoriais
CQ	controle de qualidade
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas
CLAE/EM-EM	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
C _{max}	concentração máxima atingida
CV	coeficiente de variação
CRF	formulário de relato de caso
DAEs	drogas antiepilépticas
EA	evento adverso
EAS	evento adverso sério
ECG	Eletrocardiograma
EXCEL	planilha de cálculos comercial
FDA	Food and Drug Administration
FRC	formulário de relato de caso
HBs-AG	antígeno de superfície para o vírus da hepatite B
IMC	índice de massa corporal
LOQ	limite de quantificação
MRM	multiple reaction monitoring

POP	procedimento operacional padrão
Tmax	tempo máximo atingido à concentração plasmática
T-R	formulação teste-referência
R-T	formulação referência-teste
Washout	intervalo entre as administrações de medicamentos
WinNonLin	sistema comercial de avaliação farmacocinética e estatística

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Resultados farmacocinéticos para oxcarbazepina.....	79
Tabela 2- Resultados farmacocinéticos para 10-hidroxicarbazepina.....	80

	PÁG.
Figura 1- Cromatografia da oxcarbazepina com íon 253.2 m/z como pai e o íon filho 180.1.....	60
Figura 2 - Cromatografia da hidroxycarbazepina com íon 255.1 m/z como pai e o íon filho 194.1.....	60
Figura 3- Estrutura química da oxcarbazepina (A1), 10-hidroxycarbazepina (A2) e carbamazepina-D10 (I.S.).....	61
Figura 4- Cromatografia de uma amostra de plasma lipêmico. Ilustra que não houve interferência.....	62
Figura 5- Cromatografia de uma amostra de plasma hemolisado.....	63
Figura 6- Cromatografia de uma amostra de plasma branco.....	63
Figura 7- Cromatografia de uma amostra de plasma contaminado pelo analítico.....	64
Figura 8- Cromatografia do teste “carry-over”.....	65
Figura 9- Curva de calibração de oxcarbazepina.....	67
Figura 10- Curva de calibração de hidroxycarbazepina.....	67
Figura 11- Dados referentes aos controles de qualidade da oxcarbazepina, demonstrando que precisão e acurácia estão dentro dos parâmetros estabelecidos.....	68
Figura 12- Dados referentes aos controles de qualidade da 10-hidroxycarbazepina, demonstrando que precisão e a acurácia estão dentro dos parâmetros estabelecidos.....	68
Figura 13- Indica o resultado da precisão e acurácia em relação ao LOQ da oxcarbazepina.....	69

Figura 14-	Indica o resultado da precisão e acurácia em relação ao LOQ da 10-hidroxicarbazepina.....	69
Figura 15-	Resultados do teste de recuperação.....	70
Figura 16-	Os três tipos de plasmas humano utilizados.....	73
Figura 17-	Concentração plasmática média dos 24 voluntários, após administração da formulação teste e referência, em relação ao tempo para oxcarbazepina.....	81
Figura 18-	Concentração plasmática média dos 24 voluntários, após administração da formulação teste e referência, em relação ao tempo para o metabólito 10-hidroxicarbazepina.....	82

PÁG.

Quadro 1-	Indica a aleatorização dos voluntários e as seqüências da administração do medicamento teste e/ou referência.....	52
------------------	---	----

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo comparar a biodisponibilidade de duas formulações de oxcarbazepina em comprimidos de 600mg, produzidas pelo Laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, formulação teste, com a formulação de referência Trileptal[®], comprimidos 600mg, elaborada pelo Laboratório Novartis Pharma.

Baseando-se na baixa variabilidade interindividual da droga e na bibliografia existente, definiu-se um número de vinte e seis voluntários de ambos os sexos, entre 18 a 50 anos, considerados sadios com base em exames físicos e laboratoriais.

As amostras plasmáticas coletadas foram quantificadas por um método validado, empregando-se a cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massas (LC-MS-MS).

Com base nos dados da quantificação, obtiveram-se as curvas de concentração de oxcarbazepina *versus* tempo e seu metabólito *versus* tempo, determinando-se assim, os seguintes parâmetros farmacocinéticos: área sob a curva AUC – área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo, concentração máxima atingida após a administração da dose (C_{max}) e tempo em que ocorreu essa concentração máxima (T_{max}).

Concluiu-se que a formulação oxcarbazepina 600 mg produzida pelo Laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda é bioequivalente à formulação Trileptal[®], comprimido 600mg, elaborado pelo Laboratório Novartis Pharma, para extensão e taxa de absorção de oxcarbazepina, considerando-se os intervalos de confiança de 90% para as razões geométricas estabelecidos pela Food and Drug Administration (80-125%).

ABSTRACT

The purpose of this study was to compare the bioavailability of two oxcarbazepine formulations in 600mg pills - a test formulation produced by Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda with the Trileptal[®] formulation by Novartis Pharma.

Based on the low interindividual variability of this drug and the existing bibliography, the study sample size indicated was 26 volunteers of both sexes, considered healthy according to their physical and laboratory exams, .

The plasma samples were quantified by a validated method that used high pressure liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS-MS).

The quantification data was used to obtain the concentration curves of oxcarbazepine *versus* time and metabolite *versus* time that determined the following pharmacokinetic parameters: the AUC curve- area under the plasma concentration *versus* time curve, maximum concentration achieved after the dose was administered (C_{max}) and the time taken to achieve e maximum concentration (T_{max}).

We concluded that the 600mg oxcarbazepine formulation produced by Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda was bioequivalent to the 600mg Trileptal[®] formulation produced by Novartis Pharma in relation to the rate and extent of oxcarbazepine absorption, considering confidence intervals of 90% for geometric ratios established by the Food and Drug Administration (80-125%).

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

No Brasil, as pesquisas clínicas com psicotrópicos foram iniciadas em meados dos anos 80 pelo Professor Doutor Elisaldo L. A. Carlini, no Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina, atual Universidade Federal de São Paulo. Entretanto, os estudos com bioequivalência e biodisponibilidade, amplamente divulgados no meio científico nacional, iniciaram-se com o Doutor Gilberto De Nucci, professor, atualmente, da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp e da Universidade São Paulo – USP (Moraes, 2003).

1.2- Normas e legislação

Com a nova Lei 9.787/99 e a Resolução 391/99 (ANVISA, 1999), que regulamenta os medicamentos genéricos, atualmente requer-se a realização de estudos de equivalência farmacêutica e bioequivalência para o registro e a comercialização do produto (Moraes, 2003).

A ANVISA define a bioequivalência como um estudo comparativo entre as biodisponibilidades de dois medicamentos que possuem a mesma indicação terapêutica, com a mesma dose e via de administração, nas mesmas condições experimentais e que não apresentem diferenças significativas em relação às biodisponibilidades (Oliveira, 2002).

A FDA (1998) define a biodisponibilidade como a velocidade e extensão pelas quais um fármaco é absorvido a partir de um produto farmacêutico e torna-se disponível no local de ação.

A partir de 10 de agosto de 1999 é possível solicitar o registro de genéricos no Brasil, para os medicamentos cuja patente já tenha expirado. O medicamento genérico poderá substituir o medicamento de referência porque terá qualidade comprovada através de testes *in vitro* e *in vivo* e terá a mesma eficácia clínica (Storpirtis, 1999).

Segundo Storpiotis (1999) o medicamento genérico tende a ser cerca de 40% mais barato em relação ao medicamento de referência pelo fato da pesquisa clínica ter custos menores e não contar com gastos promocionais da marca comercial.

1.3- Método analítico de uso habitual

Um dos mais utilizados métodos analíticos para avaliar a concentração de um fármaco em plasma é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com interface “electrospray”, como demonstram as inúmeras pesquisas referentes a essa técnica (Glish, 2003, Borges, 2004).

A cromatografia líquida de alta eficiência que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, é empregada como uma técnica de separação de várias misturas de componentes químicos e/ou biológicos. No final dos anos 70, novos métodos, incluindo cromatografia líquida de fase reversa, permitiram uma melhora na separação de compostos apolares. (Schoeff e Willians, 1993). Atualmente, inúmeros tipos de colunas para separação de compostos, assim como uma grande variedade de detectores de interface com a cromatografia líquida de alta eficiência estão no mercado (Wellinder et al., 1995).

Já a espectrometria de massa é uma técnica analítica eficaz utilizada para identificar compostos desconhecidos e quantificar materiais conhecidos. Fornece informação tanto para químicos, farmacêuticos, como para físicos, engenheiros, bioquímico e ainda para biólogos (Wellinder et al., 1995).

A técnica de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa e o surgimento da utilização de um “electrospray” têm se apresenta como uma técnica analítica confiável nos resultados e segura nas informações (Smith e Johnson, 1981; Hayes et al., 1983).

1.4- Considerações estatísticas

Os métodos estatísticos de bioequivalência surgiram no fim dos anos 70 e início da década de 80. Os esforços do Food and Drug Administration (FDA) foram de apontar a necessidade de métodos apropriados de avaliação estatística dos estudos de bioequivalência. Os principais desenvolvimentos foram a reformulação das hipóteses de bioequivalência (Anderson e Hauck, 1983; Schuirmann, 1981) e o método do intervalo de confiança (Meltzer, 1974; Westlake, 1972, 1976 e 1981) (Guidance for Industry, 2000).

Para cada voluntário, um gráfico com ambas formulações, relacionando concentração individual x tempo, em escala linear, em conjunto com os parâmetros farmacocinéticos (ANVISA, 2004).

A área sob a curva de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo é a mais importante medida avaliada. Frequentemente é utilizada para medir a extensão da absorção, ou o montante total de droga absorvida pelo organismo, após administração de dose única de um medicamento. A determinação da bioequivalência entre dois medicamentos resulta da comparação das AUCs obtidas no experimento, por meio de sua representação matemática (Chow, 2000).

O estudo de biodisponibilidade/bioequivalência considera na análise o intervalo de confiança (IC) de 90% da média geométrica da AUC (no que diz respeito à extensão da absorção) e C_{max} (no que diz respeito à velocidade de absorção). Devem estar dentro do intervalo de 80-125% da média geométrica da formulação referência (regras do FDA para estudos de bioequivalência e da Resolução 391/99 e Resolução 135/03 e complementares da ANVISA - MS) e o tempo no qual essa concentração foi alcançada T_{max} (RE, nº 397, 2004).

1.5- Sobre a epilepsia

A epilepsia pode ser causada por praticamente todas as doenças ou distúrbios graves nos seres humanos como anomalias congênitas, infecções, tumores, doenças vasculares, doenças degenerativas ou lesões cerebrais. As crises epiléticas representam apenas um dos muitos sintomas ocasionados. (Guerreiro, 2004).

Crises epilépticas são eventos clínicos que refletem disfunção temporária de uma pequena parte do cérebro conhecida como crises focais ou de uma área mais extensa, envolvendo todo o cérebro, chamadas de crises generalizadas. A crise epiléptica é causada por excessiva descarga elétrica anormal e transitória das células nervosas. Os sintomas específicos da epilepsia dependem da região do cérebro atingido (Andrew, 2004).

A epilepsia é a condição neurológica crônica mais comum em todo o mundo e afeta todas as idades, raças e classes sociais, impondo um peso significativo nas áreas: psicológica, física, social e econômica, revelando dificuldades não só individuais, mas também familiares, escolares e sociais, especialmente devido ao desconhecimento, crenças, medo e estigma (Aspe, 2004).

Estima-se que aproximadamente três milhões de brasileiros (de 1% a 2% da população) tenham epilepsia, mas entre 70% e 80% deles poderiam estar com as crises controladas, utilizando medicamentos de baixo custo, propiciando uma qualidade de vida melhor. (Teixeira, 2005)

1.6- Oxcarbazepina

A oxcarbazepina faz parte de uma classe de drogas chamadas de antiepiléticos (DAE). Está disponível no Brasil na forma farmacêutica de comprimidos revestidos de 150 mg, 300 mg e 600 mg, para administração por via oral. Também está disponível como suspensão oral na concentração de 60 mg.mL⁻¹ (Novartis, 2001).

1.7- Composição

A oxcarbazepina é um pó cristalino branco-alaranjado. É pouco solúvel em clorofórmio, diclorometano, acetona e metanol e praticamente insolúvel em etanol, éter e água.

1.8- Mecanismo de ação

A atividade farmacológica da oxcarbazepina é principalmente exercida através do seu metabólito 10-hidroxicarbazepina. Não se sabe o exato mecanismo pelo qual a oxcarbazepina e a seu metabólito exercem o efeito antiepilético, porém estudos eletrofisiológicos *in vitro* indicaram que elas produzem bloqueio de canais de sódio sensíveis a voltagem, resultando na estabilização das membranas neuronais hiperexcitadas, inibindo disparo neural repetitivo e uma diminuição significativa da propagação dos impulsos sinápticos (Sallas, 2003).

1.9- Indicação de uso

O uso da oxcarbazepina é indicado para o tratamento de epilepsia com crises parciais ou generalizadas em adultos e crianças. (Raman, 2004). Foi desenvolvida como segunda geração de antiepiléticos e segue o mesmo perfil terapêutico da carbamazepina embora tenha menos efeitos colaterais (Wang, 2003).

1.10- Contra-indicação e precaução

Hipersensibilidade conhecida à oxcarbazepina ou a qualquer outro componente presente nas formulações. A oxcarbazepina apresenta efeito sedativo, pode afetar a habilidade do paciente para dirigir veículos e/ou operar máquinas (Novartis, 2003; Perucca, et al. 2005).

1.11- Farmacocinética

- **Absorção**

Após a administração oral, a oxcarbazepina é completamente absorvida e extensivamente metabolizada em seu metabólito farmacologicamente ativo (10-hidroxicarbazepina derivado, MHD) (Shorvon, 2000).

- **Efeito da alimentação**

A alimentação não tem efeito sobre a taxa e extensão da absorção da oxcarbazepina em comprimidos (Flesch, 2003).

- **Metabolização**

A oxcarbazepina é reduzida, rapidamente, por enzimas citossólicas no fígado, ao seu metabólito 10-hidroxicarbazepina, o qual é primariamente responsável pelo efeito farmacológico da oxcarbazepina e metabolizado, posteriormente, por conjugação com ácido glicurônico. Pequenas quantidades (4% da dose) são oxidadas ao metabólito 10,11-diidroxi (DHD), farmacologicamente inativo (Novartis, 2003).

- **Excreção**

A oxcarbazepina é eliminada do organismo principalmente na forma metabolizada que é predominantemente, excretada pelos rins. Mais de 95% da dose aparece na urina, com menos de 1% na forma de oxcarbazepina inalterada. A excreção fecal corresponde a menos de 4% da dose administrada. Aproximadamente 80% da dose é excretada na urina, seja na forma de glicuronídeos do DMH (49%), seja como MHD não modificado (27%). Aproximadamente 3% são o inativo de HD e 13% da dose, conjugados do MHD e oxcarbazepina (Novartis, 2003).

A meia vida da droga original é cerca de duas horas, enquanto a meia-vida do seu metabólito é cerca de nove horas, de modo que o seu metabólito é responsável pela maior parte da atividade antiepiléptica (Lloyd, 1994).

Com administração de uma dose única em voluntários sadios, de ambos os sexos sob condições de jejum, o T_{max} médio foi de 4,5 horas.

- **Distribuição**

O volume aparente de distribuição do metabólito é 49L. Aproximadamente 40% do metabólito liga-se a proteínas séricas, predominantemente à albumina.

1.12- Reações adversas

- **Terapia adjunta ou monoterapia em adultos previamente tratados com outras DAEs.** Os eventos adversos mais comumente observados (> 5%) relacionados com a oxcarbazepina e substancialmente, mais freqüentes nos pacientes tratados com placebo foram: vertigem, sonolência, diplopia, fadiga, náusea, vômito, ataxia, visão anormal, dor abdominal, tremor, dispepsia e alteração da marcha (Perucca et al, 2005).
- **Terapia adjunta ou monoterapia em pacientes pediátricos previamente tratados com outras DAEs.** Os eventos adversos mais comumente observados (> 5%) em associação com a oxcarbazepina, nesses pacientes, foram semelhantes àqueles vistos em adultos.
- **Pacientes com insuficiência hepática**

Em geral, não são necessários ajustes de doses em pacientes com insuficiência hepática leve e moderada.

- **Pacientes com insuficiência renal**

Em pacientes com função renal prejudicada (depuração de creatinina < 30 mL.min⁻¹), a oxcarbazepina deve ser iniciada com metade da dose diária inicial usual (300 mg) e aumentada lentamente, até que se atinja a resposta clínica desejada.

1.13- Tratamento

- **Conversão para monoterapia.** Pacientes recebendo DAEs iniciam o tratamento com oxcarbazepina com 600 mg diários (divididos em duas tomadas diárias) enquanto diminui, simultaneamente, as doses das DAEs concomitantes. As DAEs devem ser completamente retiradas ao longo de três a seis semanas, enquanto a dose máxima de oxcarbazepina deve ser alcançada em duas a quatro semanas. A oxcarbazepina pode ser aumentada,

se clinicamente indicado, em incrementos máximos de 600 mg diários, a intervalos de aproximadamente uma semana, até, no máximo, 2400 mg diários. Foi demonstrado, num estudo, que a dose diária de 1200 mg é efetiva em pacientes cuja monoterapia foi iniciada com oxcarbazepina. Os pacientes devem ser observados de perto, durante essa fase de transição.

2- OBJETIVOS

O objetivo da pesquisa foi avaliar, comparativamente, a biodisponibilidade relativa de dois produtos contendo oxcarbazepina. O produto testado foi oxcarbazepina do Laboratório Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda, em comprimido de 600 mg, com o produto de referência Trileptal[®] comprimido de 600 mg, elaborado pelo Laboratório Novartis Pharma.

3- METODOLOGIA

O estudo de biodisponibilidade relativa a bioequivalência foi conduzido em três etapas: clínica, analítica e estatística, e planejou-se de acordo com o Guia para elaboração de protocolo de estudo de biodisponibilidade relativa a biodisponibilidade (RE nº 397, 2004).

3.1- Etapa clínica

Pré-estudo:

Comitê de Ética e Pesquisa

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o termo de consentimento – (anexo 1, foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp (anexo 2), credenciado pelo CONEP - Conselho Nacional de Saúde/MS conforme os critérios da CNS/RES nº 251, de 7 de agosto de 1997.

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 do CNS-MS), bem como RDC 103 de 08 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Resoluções complementares (RE nº196, 894, 895, 899 e 896, 1996).

Planejamento da pesquisa

O planejamento da pesquisa foi definido por um estudo aberto, aleatório, cruzado, com duas internações, nas quais os voluntários receberam para cada período de internação um comprimido de 600 mg por via oral, em dose única, referente à formulação teste ou referência conforme a tabela de aleatorização mostrada no quadro 1. Os períodos das internações tiveram um intervalo (wash-out) de sete dias. Participaram 13 voluntários do sexo masculino e 13 voluntárias do sexo feminino, todos considerados saudáveis, segundo parâmetros clínicos e laboratoriais.

Em termos de aleatorização, os pacientes foram distribuídos equilibradamente nas seqüências T-R ou R-T conforme mostra o quadro 1 e o anexo 3 (RE nº 896, 2003).

Quadro 1- Indica a aleatorização dos voluntários e as seqüências da administração do medicamento teste e/ou referência

Voluntários			Seqüência da Administração	
Número	Sexo	Iniciais	Período I	Período II
1	M	AC290480M	T	R
2	M	CA161072M	T	R
3	M	EN171072M	R	T
4	M	GS250575M	R	T
5	M	JS011271M	T	R
6	M	JS031269M	T	R
7	M	LM261068M	R	T
8	M	LJ120577M	T	R
9	M	RO200376M	T	R
10	M	JC160763M	R	T
11	M	RS080572M	R	T
12	M	SL080969M	R	T
13	M	WC290166M	R	T
14	F	AO260362F	R	T
15	F	AL271065F	R	T
16	F	ER220463F	R	T
17	F	JC030478F	T	R
18	F	JP270978F	T	R
19	F	JS230465F	T	R
20	F	MC200378F	R	T
21	F	GM020770F	T	R
22	F	MP020966F	R	T
23	F	ML110163F	R	T
24	F	MN260360F	T	R
25	F	RM070282F	T	R
26	F	SC131260F	T	R

Dados do medicamento

Formulação teste:

Oxcarbazepina comprimido de 600 mg (Leptard[®]) - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda..

Formulação referência:

Trileptal[®] comprimido de 600 mg – Novartis Pharma.

Os voluntários receberam em cada um dos períodos de internação, um comprimido de 600 mg de oxcarbazepina de uma das formulações acima discriminadas por via oral em dose única com um copo de água mineral (200mL), seguindo uma ordem de aleatorização previamente estabelecida.

População do estudo

A pesquisa foi realizada com vinte e seis voluntários sadios (condição comprovada através de exames médicos e laboratoriais), adultos de ambos os sexos com idade entre 18 a 50 anos, sem restrições quanto ao grupo étnico e proveniente do interior do Estado de São Paulo (RE nº 896, 2003).

Seleção de voluntários

Os voluntários receberam orientação sobre a pesquisa clínica, as internações e o termo de consentimento (anexo 1). Foram esclarecidas as dúvidas quanto aos procedimentos de internação e os tempos de coletas. Os voluntários que se manifestaram de acordo, assinaram o termo de consentimento para participação do estudo. Foi solicitado aos

voluntários, inicialmente, o comparecimento no laboratório clínico para coleta de amostras de sangue para realização dos testes laboratoriais (anexo 4).

Foram aceitos no estudo, voluntários somente considerados saudáveis através da história clínica (anexo 5), das condições emocionais, dos resultados dos exames físicos e laboratoriais. Após o término do estudo, os voluntários fizeram novamente os mesmos exames laboratoriais para confirmação do seu bem-estar físico e psicológico. Os critérios de inclusão e exclusão foram rigorosamente seguidos, conforme descrito abaixo (RE nº 894, 2003).

Critério de inclusão de voluntário

- O voluntário é do sexo masculino ou feminino. As mulheres que não se encontravam grávidas ou amamentando;
- O voluntário tem entre 18 até 50 anos de idade;
- O índice de massa corpórea dos voluntários está entre 19 e 28;
- O voluntário foi examinado e considerado em boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo médico, de acordo com as regras definidas no Protocolo e avaliações a que foram submetidos: história clínica, medidas de pressão arterial e pulso, exame físico, E.C.G. e exames laboratoriais complementares;
- O voluntário é capaz de compreender a natureza e o objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos, e tem intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – anexo 1.

Critérios de exclusão

- O voluntário tem sabidamente uma hipersensibilidade à(s) drogas(s) a ser (em) estudada(s) (remédio) ou a compostos quimicamente relacionados. Tem história de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer droga;
- História ou presença de doença hepática, gastrointestinais ou outra condição que interfere com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo da droga;
- Uso de terapia de manutenção com qualquer droga, menos as exceções definidas no protocolo;
- Apresenta história de doença hepática, renal, pulmonar, gastrointestinal, epiléptica, hematológica ou psiquiátrica; tem hipotensão ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina *pectoris* e/ou insuficiência cardíaca;
- Achados eletrocardiográficos que, a critério do investigador, não possibilitam recomendar sua participação no estudo;
- Os resultados dos exames laboratoriais complementares estão fora dos valores considerados normais de acordo com as normas do protocolo;
- O voluntário é fumante;
- O voluntário ingere quantidade elevada de cafeína (mais do que cinco xícaras de café ou chá por dia);
- Tem história de abuso de álcool ou drogas;
- Fez uso de medicação regular dentro do período compreendido entre duas semanas da data prevista (ou efetiva) para o início do tratamento e a data desta avaliação, ou de qualquer medicação dentro de uma semana, menos as exceções definidas no protocolo;

- Foi internado por qualquer motivo dentro do período compreendido entre oito semanas da data prevista (ou efetiva) para início do tratamento do estudo e a data da avaliação;
- Tratamento com qualquer droga que se conheça ter um potencial tóxico bem definido nos grandes órgãos, dentro do período compreendido entre três meses prévios à data prevista (ou efetiva) para o início do tratamento do estudo e a data da avaliação;
- O voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentro do período compreendido entre três meses da data prevista (ou efetiva) para o início do tratamento do estudo e a data da avaliação;
- O voluntário doou ou perdeu 450 mL ou mais de sangue dentro do período compreendido entre 12 meses da data prevista (ou efetiva) para o início do tratamento do estudo e a data da avaliação;
- Teste positivo de gravidez para as voluntárias mulheres;
- O voluntário tem qualquer condição que o impede de participar do estudo a juízo do investigador.

Durante e pós-estudo

- **Critérios de retirada**

Os seguintes critérios foram usados para a retirada dos voluntários da pesquisa:

- Voluntários que não desejaram continuar com o estudo por diferentes razões, como por exemplo, indisponibilidade e intolerância para o procedimento do estudo;

- Quando os efeitos não fossem os desejados da droga;
- Quando existisse doença concomitante que requeresse medicação.

- **Coleta de sangue**

Os voluntários selecionados fizeram exames laboratoriais pré-estudo (incluindo hematócrito, hemoglobina, creatinina, GOT, GPT - anexo 4). No dia anterior à internação, os voluntários ficaram de jejum oito horas antes até duas horas após a ingestão da medicação (RE nº 896, 2003). As administrações dos comprimidos teste ou referência de 600 mg de oxcarbazepina iniciaram-se às sete horas, e estavam presentes: médico, técnicos e auxiliares de enfermagem. Foram coletados 5 mL de sangue de cada voluntário antes da ingestão da medicação para teste controle e 0:30; 1:00; 1:30; 2:00; 2:30; 3:00; 3:30; 4:00; 4:30; 5:00; 5:30; 6:00; 7:00; 8:00; 10:00; 12:00; 14:00; 16:00; 18:00; 24:00; 48:00; 72:00 e 96:00 horas após a ingestão da medicação (anexos 6 e 7).

Os eventos adversos (parâmetros anexo 9) dos voluntários relatados durante a pesquisa estiveram de acordo com o da literatura e registrados em um formulário específico (anexo 8). Os eventos citados foram: cefaléia, sonolência e náusea (Perucca et al, 2005). Após o término da pesquisa, nenhum voluntário necessitou de atendimento médico.

Desistência de voluntários

Vinte e quatro voluntários foram incluídos na avaliação de bioequivalência. Saíram dois voluntários do sexo feminino durante a pesquisa. A voluntária JC030478F saiu por razões pessoais antes da administração do medicamento, no segundo período de internação. A segunda voluntária JP270978F saiu por razões pessoais antes da administração do medicamento, no primeiro período de internação.

Alta do estudo

Após a alta hospitalar, os voluntários fizeram exames laboratoriais pós-estudo (incluindo registro de ECG) e agendaram uma nova consulta na Unidade Ambulatorial de Campinas para certificarem boas condições de saúde.

Instalações

Os voluntários foram internados na Unidade Clínica *Philippe Pinel* com 40 leitos, posto de enfermagem e sala de atendimento de emergência com carrinho de emergência.

Armazenamento das amostras

As amostras de sangue foram centrifugadas em torno de 2000g por 10 minutos a baixa temperatura. Imediatamente após a centrifugação, o plasma foi retirado e armazenado em frasco adequado, identificado e armazenado em temperatura de (-20 C°) em freezer específico para amostras biológicas localizado na própria Unidade de Internação (anexo 10) (RE nº 896, 2003).

Após a finalização da etapa clínica, as amostras biológicas foram transportadas para o laboratório do centro e as documentações (documentos dos voluntários, tempos de coletas, etc) para o Departamento de Estatístico, tendo início a digitação dos tempos de coletas e a análise dos eventos adversos. Esse procedimento foi de acordo com a norma do centro de pesquisa intitulada como POP do centro para o transporte de amostras (anexo 10)

3.2-Etapa analítica

Alguns procedimentos foram realizados antes do desenvolvimento e da metodologia da pesquisa. Um deles foi conhecer o peso molecular do analito e do padrão interno.

A literatura foi um dispositivo científico importante para obtenção de dados sobre a massa molecular e os íons presentes naquelas (oxcarbazepina e padrão interno) moléculas específicas através de suas estruturas químicas presentes. A consulta literária contribuiu também para o conhecimento prévio do planejamento das primeiras testagens do analito e do padrão interno no equipamento e ajudou na escolha dos solventes para uma boa extração. O interesse em saber o peso molecular se fez necessário porque foi o primeiro parâmetro utilizado para a identificação da molécula no equipamento.

Com os dados levantados pela pesquisa, realizou-se a etapa de dissolução e testagens do padrão e do analito, após o ajuste do equipamento com os parâmetros (intervalos) referentes ao peso molecular das moléculas (padrão interno e analito). O procedimento constituiu em injetar as substâncias, separadamente, para identificação das moléculas no equipamento.

A metodologia usada para a determinação da oxcarbazepina e 10-hidroxicarbazepina plasmáticas foi cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massas, com fonte de ionização em “eletrospray” positivo monitorado (MRM) os íons resultantes da fragmentação da oxcarbazepina, da 10-hidroxicarbazepina, e da carbamazepina-D10, substância utilizada como padrão interno (Bruins, 1991).

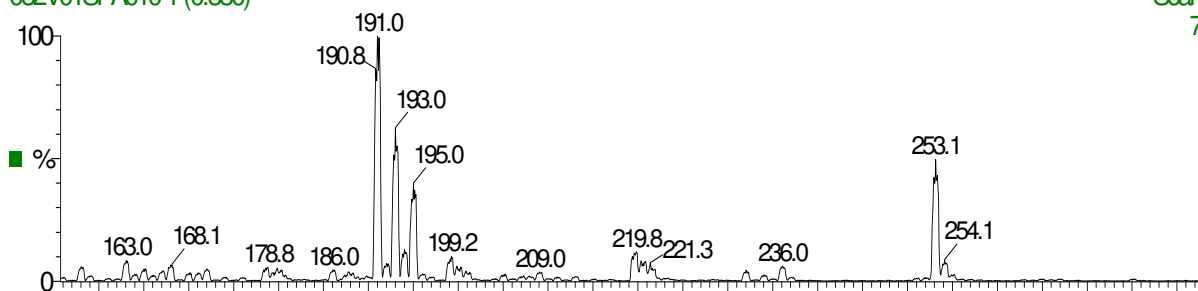
A oxcarbazepina, a 10-hidroxicarbazepina e o padrão interno, carbamazepina-D10, foram extraídas do plasma humano com a técnica de extração líquido/líquido empregando uma mistura de éter/diclorometano (60/40; v/v). A cromatografia líquida de alta pressão foi realizada, utilizando-se uma coluna C₁₈ 4 um (150 x 4.6 mm i.d.), a um fluxo de 1.2 mL/min de fase móvel composta de acetonitrila/água (50/50; v/v) + 20 mM de ácido acético.

O aparelho foi ajustado para as seguintes transições: 253.2>180.1 no caso da oxcarbazepina, 255.1>194.1 para a 10-hidroxicarbazepina, e de 247.3>204.3 para a carbamazepina-D10, sendo que os tempos de retenção foram tipicamente de 2,2, 1,7 e 2,7 minutos, respectivamente. Os testes realizaram-se a partir da injeção direta do analito (substância analisada) e padrão interno no espectrômetro de massas possibilitando a escolha dos íons mais abundantes conforme na figura 1 e 2.

10 ug/ml Oxcarbazepina em FM (agua/acetonitrila, 50/50 + 10 mM ácido fórmico) cone 20

082V01SPA010 1 (0.330)

Scan ES+
7.90e7



082V01SPA015 1 (0.335)

Daughters of 253ES+
1.55e6

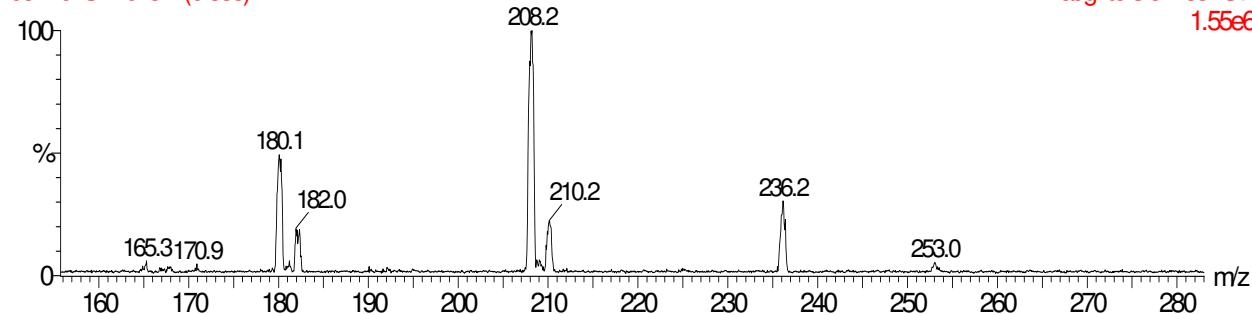
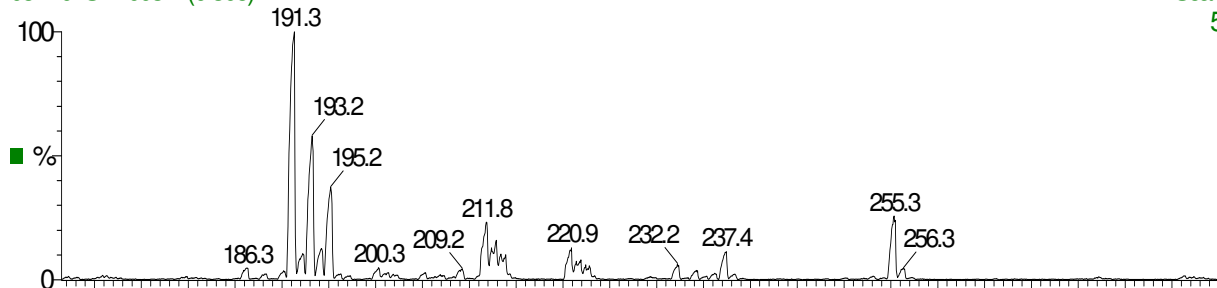


Figura 1- Cromatografia da oxcarbazepina com íon 253.2 m/z como pai e o íon filho 180.1.

10 ug/ml Hidroxicarbazepina em FM (agua/acetonitrila, 50/50 + 10 mM ácido fórmico)

082V01SPA003 1 (0.305)

Scan ES+
5.31e7



082V01SPA007 1 (0.335)

Daughters of 255ES+
1.19e6

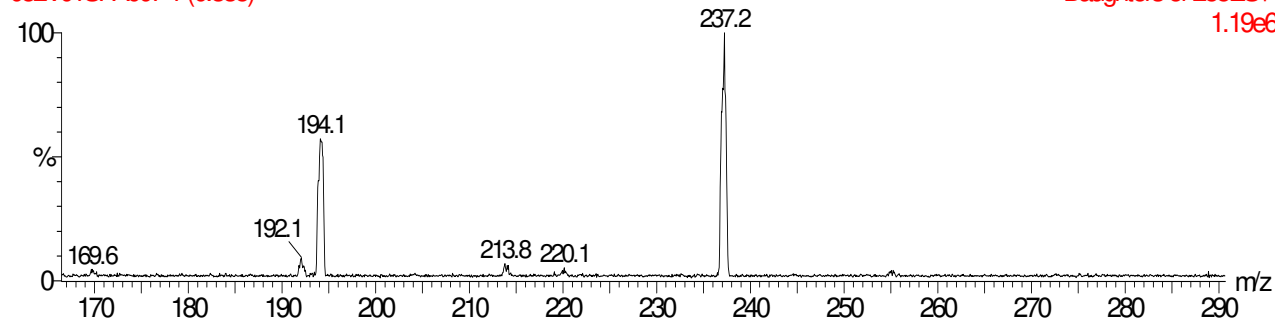


Figura 2- Cromatografia da hidroxicarbazepina com íon 255.1 m/z como pai e o íon filho 194.1

Produtos:

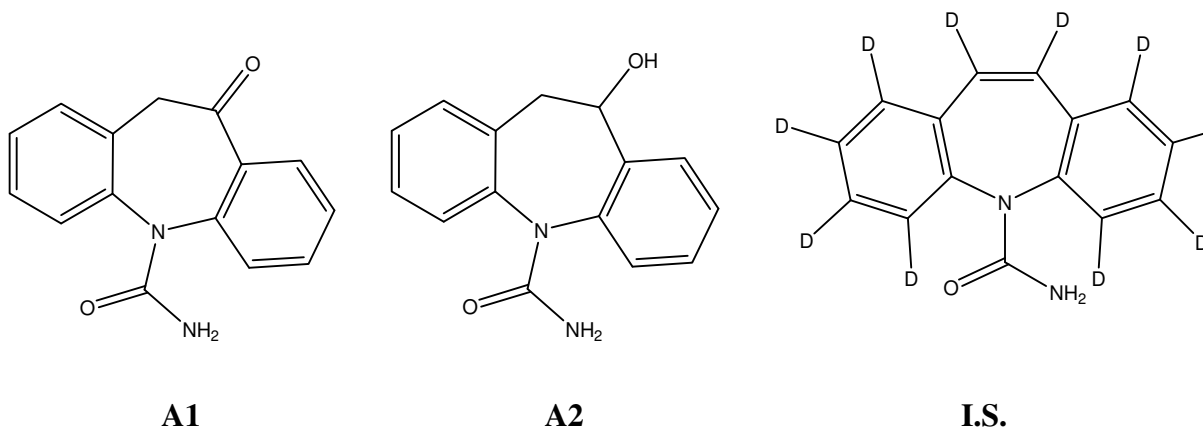


Figura 3- Estrutura química de oxcarbazepina (A1), 10-hidroxicarbazepina (A2) e carbamazepina-D10 (I.S.)

Testes de validação

Os parâmetros essenciais para testar e medir a aceitabilidade do desempenho de um método analítico, de acordo com FDA são: especificidade, seletividade, linearidade, precisão e exatidão (FDA, 1998). No presente estudo, de acordo com resolução RE nº 899, realizaram-se os seguintes testes estabelecidos:

Especificidade/seletividade - Especificidade consiste num método que produz respostas para apenas um analito específico, enquanto que a seletividade é a habilidade do método analítico de diferenciar e quantificar o analito na presença de outras substâncias da amostra. Para o teste de seletividade/especificidade devem ser usadas amostras “brancas” da matriz biológica em questão, provenientes de, ao menos seis fontes. Portanto, a seletividade e especificidade estão relacionadas ao evento de detecção do aparelho.

O procedimento foi injetar no equipamento seis matrizes de plasmas distintas. Primeiramente, injetou-se as quatro matrizes de plasmas normais, em seguida uma outra matriz de plasma hemolisado e, por último, uma matriz de plasma lipêmico. Após o

procedimento realizado, contaminou-se o plasma branco com o analito mais padrão interno e injetou-se o mesmo no equipamento. Esse teste foi repetido três vezes e é recomendado no início da validação (BRASIL, 1999; FDA, 2001).

Não houve nenhuma interferência relevante no tempo de retenção das amostras testadas. As figuras 4, 5, 6 ilustram os resultados dos plasmas injetados: branco, lipêmico e hemolisado. Na figura 7, o plasma branco foi contaminado com o analito aparecendo um pico relevante de identificação do aparelho.

Plasma Lipêmico

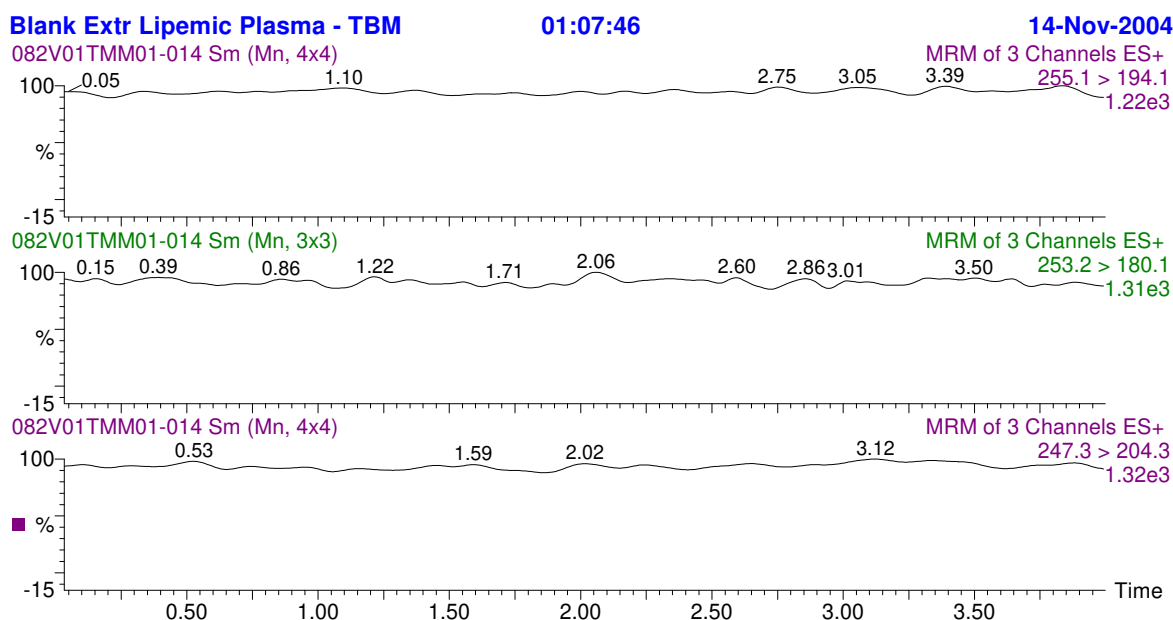


Figura 4- Cromatografia de uma amostra de plasma lipêmico. Ilustra que não houve interferência

Plasma Hemolisado

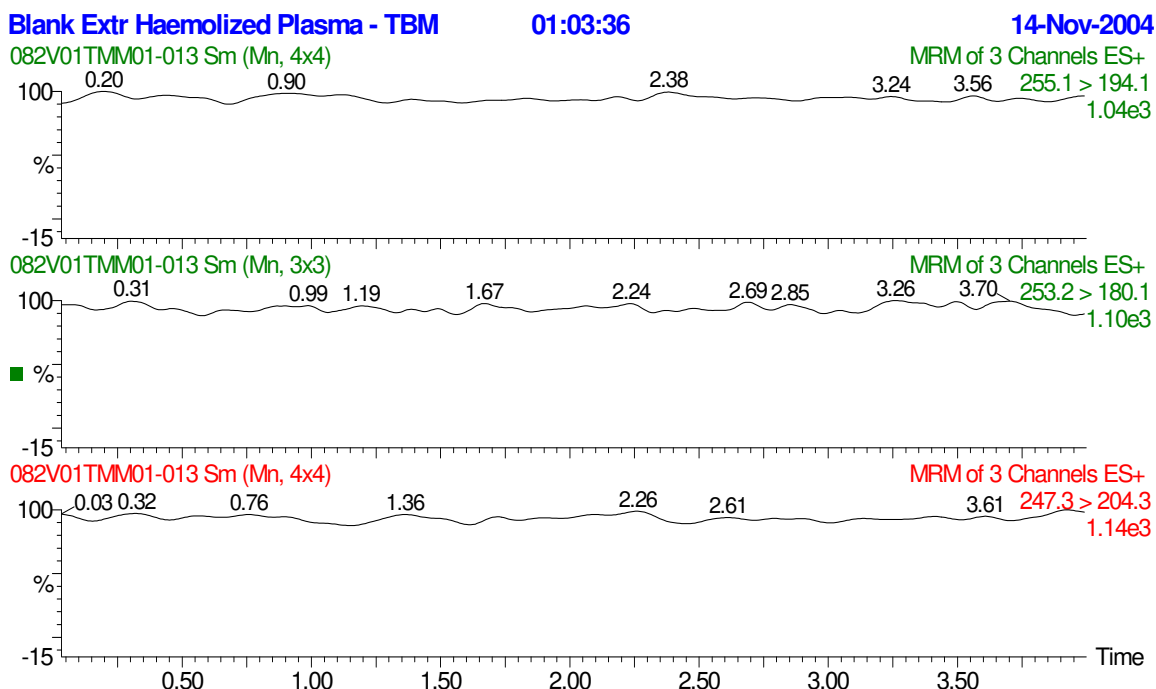


Figura 5- Cromatografia de uma amostra de plasma hemolisado. Ilustra que não houve interferência

Plasma normal

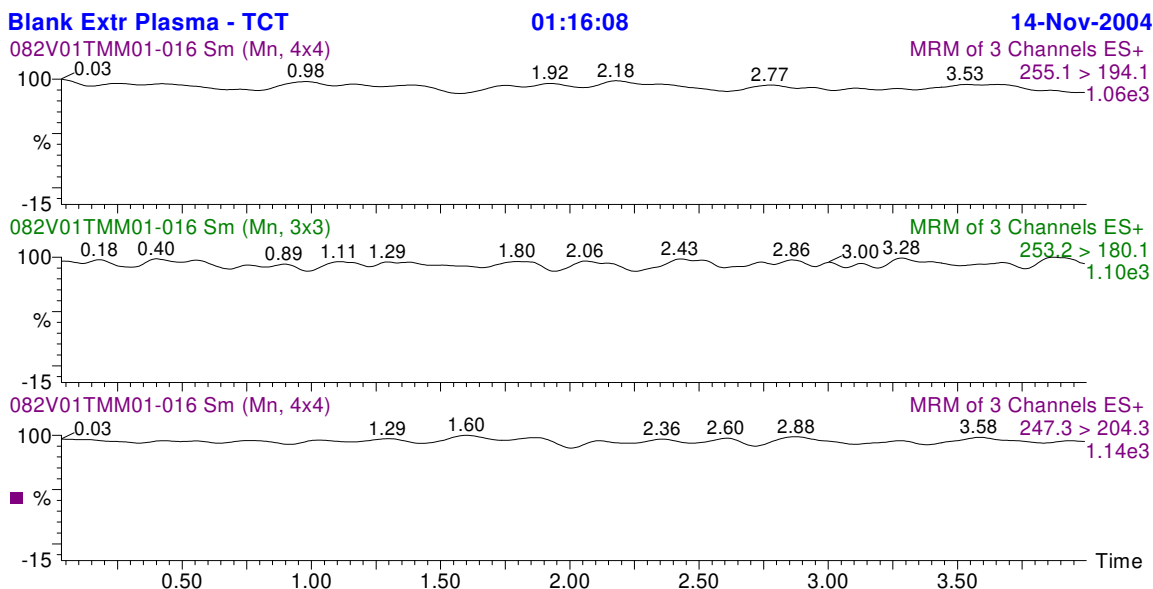


Figura 6- Cromatografia de uma amostra de plasma branco. Ilustra que não houve interferência

LOQ

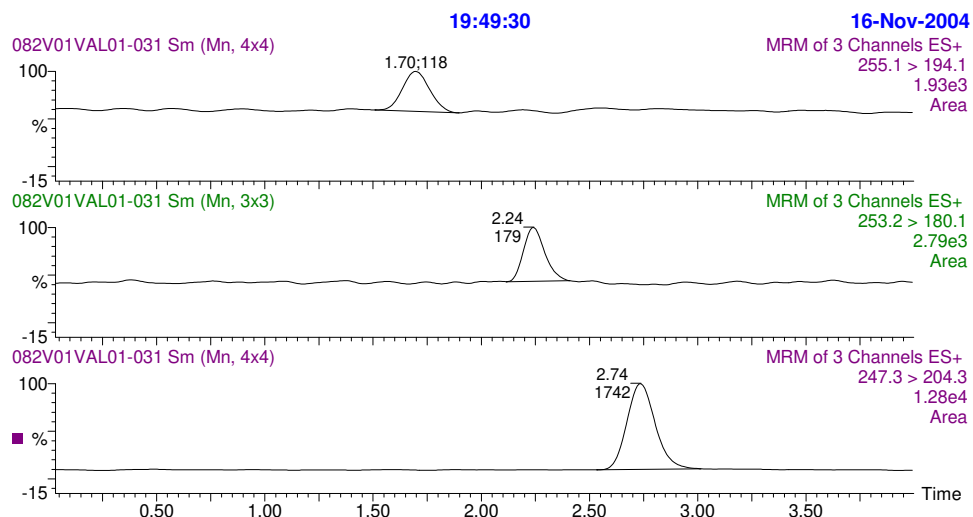
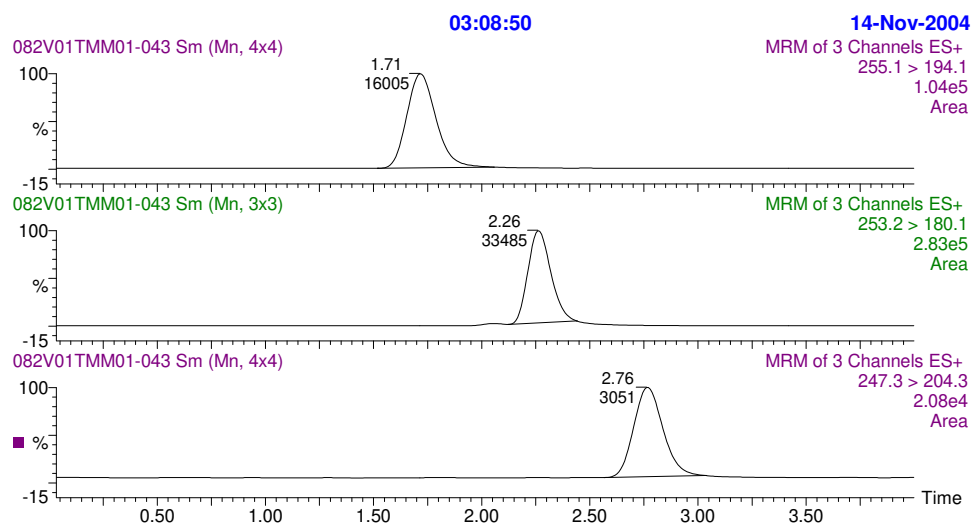


Figura 7- Cromatografia de uma amostra de plasma contaminado pelo analítico

Foi realizado o teste “carry-over” que é indicado para avaliar se os analitos injetados, na primeira amostra, ainda são detectados quando é injetada a amostra subsequente, podendo haver acúmulo ou qualquer contaminação que possa ocorrer no processo desde a injeção até a detecção. É um teste importante e indicado já na fase inicial da validação do método (RE nº 898, 2003).

A preparação desse teste consistiu da injeção de duas amostras do plasma branco extraído, depois a injeção de uma amostra contaminada de analito e padrão interno na concentração máxima e novamente o plasma branco extraído. Esse procedimento foi repetido três vezes. Exige-se que o teste seja realizado no mínimo em duplicatas. O cromatograma representativo desse teste é apresentado na figura 8.

Amostra - Alta Concentração



Amostra Branco Extraído

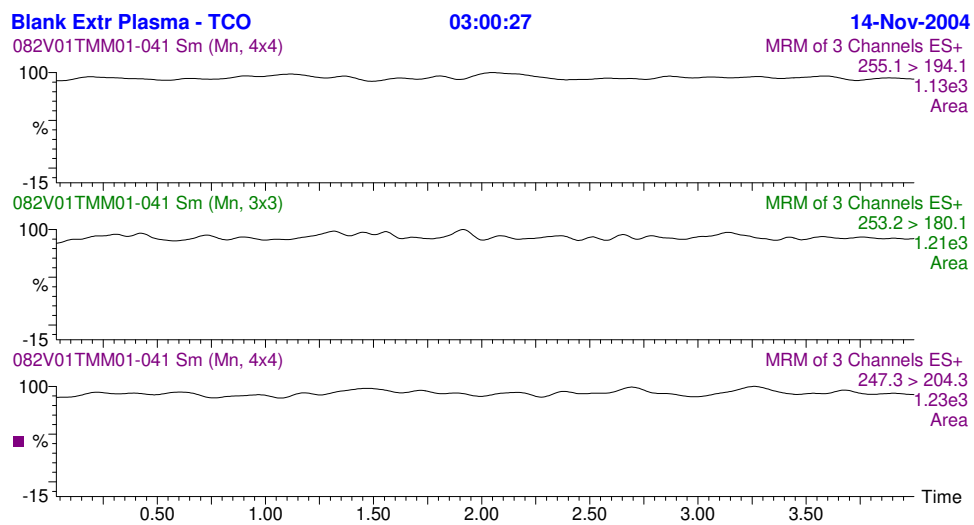


Figura 8- Cromatografia do teste “carry-over”

Outro teste foi “cross-talk” que avalia a interferência entre o analito, padrão interno e os íons residuais, considerando-se especificamente as características técnicas de detecção baseadas em espectrometria de massas. É possível que ocorra uma identificação (detecção) do analito e o padrão interno ou íons residuais, prejudicando a qualidade do método e os resultados obtidos. Este teste é indicado no início da validação do método, sendo que o analito e padrão interno deverão ser testados na concentração máxima a ser empregada no estudo.

O procedimento foi a injeção de duas amostras de plasma branco extraído, em seguida duas amostras do analito. Posteriormente, foram injetadas no equipamento duas amostras do metabólito, terminando com a injeção de duas amostras branco com o padrão interno.

Curva de calibração e a linearidade é a relação entre a resposta do instrumento e as concentrações normais do analito. Foi utilizado uma curva de calibração para cada composto. A elaboração da curva resultou da injeção de plasma extraído branco (sem padrão interno), plasma extraído com o padrão e plasma com o padrão interno e o analito em diferentes concentrações (FDA, 2001).

Para esse estudo, as curvas de calibração apresentaram linearidade na faixa de 20,0 a 5000,0 ng/mL para oxcarbazepina (figura 9) e de 40,0 a 10000,0 ng/mL para hidroxicarbazepina (figura 10).

Compound 1 name: Oxcarbazepine Method File: 082V01VAL01
 Coefficient of Determination: 0.998412
 Calibration curve: $-6.59550e-8 \cdot x^2 + 0.00478289 \cdot x + 0.00463522$
 Response type: Internal Std (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x², Axis trans: None

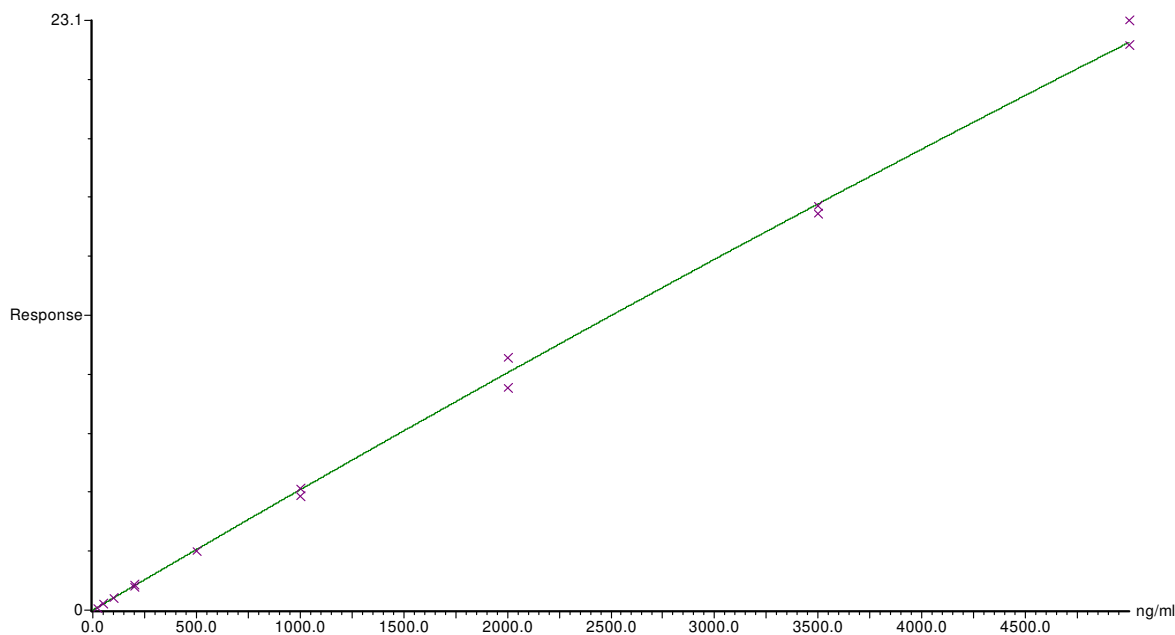


Figura 9- Curva de calibração de oxcarbazepina, mostrando a linearidade

Compound 2 name: Hydroxycarbazepine Method File: 082V01VAL01
 Coefficient of Determination: 0.998713
 Calibration curve: $-8.02611e-9 \cdot x^2 + 0.00143716 \cdot x + 0.0120123$
 Response type: Internal Std (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x², Axis trans: None

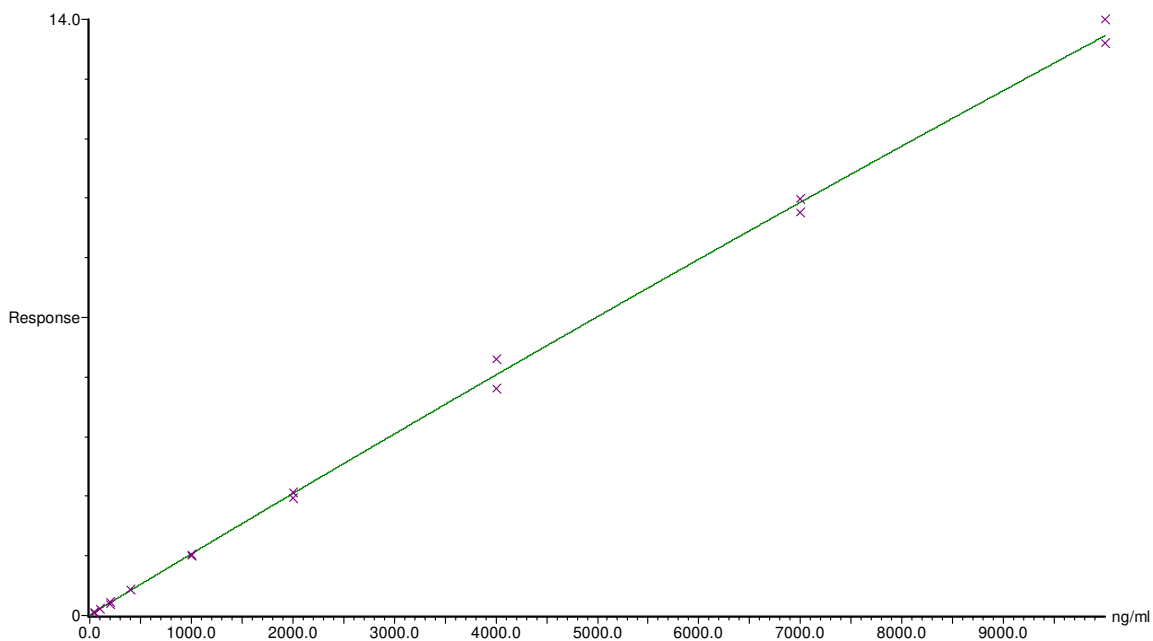


Figura 10- Curva de calibração de hidroxycarbazepina, mostrando a linearidade

Precisão e exatidão São avaliadas a partir da quantificação de pelo menos três controles, em concentrações distintas: QCA, QCB e QCC, correspondendo respectivamente, à concentração baixa, média e alta para cada controle. Os coeficientes de variação (CV%) calculados com base em matrizes biológicas, devem se apresentar dentro de mais ou menos 15% e mais ou menos 20% para LOQ (FDA, 2001).

Controles de qualidade foram definidos com o propósito de monitorar a precisão e acurácia durante o ensaio. As figuras 11 e 12 ilustram os parâmetros dos controles de qualidade de uma corrida e de três corridas de amostras com o analito e o padrão interno. A precisão foi inferior a 15% e para acurácia entre 80-125%, conforme o esperado na resolução 899, 2003.

	Intra-ensaio		Interensaio	
	Precisão	Acurácia	Precisão	Acurácia
QCA	6.1	108.3	4.3	109.4
QCB	7.4	111.1	6.3	109.9
QCC	3.6	105.9	4.7	109.1

Figura 11- Dados referentes aos controles de qualidade da oxcarbazepina, demonstrando que precisão e a acurácia estão dentro dos parâmetros estabelecidos

	Intra-ensaio		Interensaio	
	Precisão	Acurácia	Precisão	Acurácia
QCA	8.3	98.4	9.2	108.8
QCB	3.4	106.7	4.8	110.0
QCC	2.9	101.3	6.2	108.5

Figura 12- Dados referentes aos controles de qualidade da 10-hidroxicarbazepina, demonstrando que precisão e a acurácia estão dentro dos parâmetros estabelecidos

O limite de quantificação (LOQ) encontrado para oxcarbazepina foi de 20.0 ng/mL e 40.0 ng/mL para 10-hidroxicarbazepina, definidos como a menor concentração mensurada. De acordo com os parâmetros da FDA, a precisão deve ser inferior ou igual a 20% e a acurácia entre 80-120%. A figura 13 contém os resultados da precisão e da acurácia para oxcarbazepina e a figura 14 para 10-hidroxicarbazepina.

	Intra-ensaio		Interensaio	
	Precisão	Acurácia	Precisão	Acurácia
LOQ	4.5	111.9	7.4	106.8

Figura 13- Figura indica o resultado da precisão e acurácia em relação ao LOQ da oxcarbazepina

	Intra-ensaio		Interensaio	
	Precisão	Acurácia	Precisão	Acurácia
LOQ	10.7	91.8	13.2	96.2

Figura 14- Figura indica o resultado da precisão e acurácia em relação ao LOQ da 10-hidroxicarbazepina

Recuperação: A recuperação é o cálculo experimental do erro ou da perda do analito para toda a amostra que recebe um tratamento para análise (dilução, extração e concentração). A recuperação de um analito não precisa ser 100%, mas a quantidade de analito e do padrão interno recuperado deve ser consistente, precisa, reproduzível e dentro dos limites da variabilidade.

Para a realização do teste de recuperação foram preparados dois grupos de amostras com três preparos distintos para cada grupo. O preparado do primeiro grupo foi com amostras de matrizes biológicas nas concentrações alta, média e baixa para plasma branco, outra com plasma lipêmico e, por último, um preparo de amostra hemolisado nas

concentrações médias para os dois últimos preparos. Aplicou-se o procedimento de extração e, em seguida, adicionou-se o padrão e o analito.

O segundo grupo de amostras preparadas seguiu o mesmo procedimento do primeiro grupo, porém foi adicionado o analito e o padrão interno e, em seguida, aplicou-se o procedimento de extração.

Todas as amostras preparadas foram injetadas no equipamento, precedidas de uma curva de calibração, na mesma faixa de concentração do método. O resultado está na figura 15. Calculou-se a média de cada tipo de amostra e compararam-se os dois grupos.

	<i>Média de Recuperação</i>	<i>CV (%)</i>
oxcarbazepina (conc)		
baixa	88.4	2.6
média	87.0	2.5
alta	90.1	2.4
10-hidroxicarbazepina		
baixa	78.6	2.9
média	79.5	4.3
alta	85.1	6.5
carbamazepina-D10		
baixa	84.9	2.6
média	89.9	9.1
alta	95.9	13.0

Figura 15- Resultados do teste de recuperação

Materiais e Equipamentos:

- Pipetas ajustáveis (P200, P1000 e P10000)
- Ponteira de plástico descartável - amarela (52-200 μ L) e Azul (200-1000 μ L)
- Tubo de vidro descartável 120 x 12 mm
- Tubo plástico 50 e 15 mL de capacidade
- Misturador vortex
- Balança analítica

Componentes

- Cromatográfico líquido de alta eficiência (CLAE)
- Espectômetro de massa
- Banco de dados
- Auto injetor

Reagentes:

- Acetonitrila
- Éter dietílico
- Água deionizada
- Diclorometano
- Ácido acético glacial
- Acetato de amônia

Preparação das soluções padrões (mãe)

Foram preparadas soluções de oxcarbazepina, 10-hidroxicarbazepina e carbamazepina-D10, separadamente. Pesou-se uma quantidade apropriada de cada substância em um recipiente de polipropileno. Em seguida, foi adicionada uma mistura de acetonitrila/água (50/50 v/v) de modo a obter uma solução final de 1000 ug/mL para cada uma das substâncias.

Preparação da solução de trabalho

A preparação das soluções de trabalho de oxcarbazepina, 10-hidroxicarbazepina, carbamazepina-D10 e dos controles de qualidade foram feitas a partir das soluções principais, diluídas com acetonitrila/água (50/50; v/v) para obtenção de concentrações menores, correspondentes ao LIQ (limite inferior de quantificação) e ao QC (controle de qualidade).

Escolha do padrão interno

O composto escolhido para servir como padrão interno foi baseado em sua similaridade estrutural em relação ao analito (oxcarbazepina).

Preparação da fase móvel

A solução foi preparada numa proveta com capacidade de 1000 mL contendo 500 mL de água. Adicionou-se 1.2 mL de ácido acético glacial e 500 mL de acetonitrila, de modo a obter uma mistura 50/50 v/v de água/acetonitrila + 20 mM de ácido acético.

Preparação da amostra

Foram adicionados 100µL de plasma em tubo de vidro apropriado. Posteriormente, foram adicionados 50µL de carbamazepina, padrão interno, mais 4 mL de solvente orgânico (éter dietílico/diclorometano: 60/40; v/v) e misturados por 40s no agitador. Os tubos foram agitados por 1 minuto a 2000 rpm. Depois da centrifugação, a fase aquosa foram congeladas na temperatura de 70°C por 15 minutos. A camada orgânica foi, então, transferida para um outro tubo de vidro que foi colocado sob fluxo constante de nitrogênio a 50° C para permitir evaporação do solvente. Após a evaporação, foram adicionados 0,2 mL de fase móvel (acetonitrila/água 50/50 v/v) e em seguida, agitado por 10s e transferida a solução para o frasco apropriado, onde foi acondicionado para posterior análise.

Fonte

A fonte das amostras de plasma humano normal, lipêmico e hemolisado é ilustrado na figura 16.

Descrição	Fonte
Plasma humano normal	Hemocentro de São Paulo
Plasma humano lipêmico	Unidade Analítica Cartesius
Plasma humano hemolizado	Unidade Analítica Cartesius

Figura 16- Os 3 tipos de plasmas humano utilizados

Condições cromatográficas

De cada plasma extraído, foi injetado 10 µL na coluna Jones Gênesis C₁₈ 4µm (150x4.6 mm i.d) operando em temperatura ambiente. Os componentes foram eluídos pela fase móvel com fluxo de 1.2 mL/min. O tempo de retenção observado para a oxcarbazepina foi 2.2 min, para 10-hidroxicarbazepina foi de 1.7 min e 2.7 para carbamazepina-D10 padrão interno.

Condições do espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas utilizado foi o Micromass Quatro Última, operando com uma fonte do tipo “eletrospray” positivo e ajustado no monitoramento de reação múltipla (MRM), monitorando as transições m/z 253.2 $\Rightarrow$ 180.1 no caso da oxcarbazepina, para a hidroxicarbazepina foi de 255.1 $\Rightarrow$ 194.1 e para carbamazepina de 247.3 $\Rightarrow$ 204.3 como padrão interno.

Para os fármacos, o tempo de leitura foi de 0,12 segundos. A energia do cone foi de 15 e 20V e a colisão foi de 25 e 30eV.

Aquisição de dados e análise foram realizadas, usando o “software” MassLynx (versão 3.5), rodando no Window NT (versão 4.0) em PC Pentium III.

Com o método analítico validado e realizado todos os procedimentos da metodologia acima mencionada, iniciou-se a corrida cromatográfica em que as amostras dos voluntários referentes aos dois períodos do estudo foram injetadas no equipamento no qual os valores foram obtidos, ou seja, as concentrações foram transferidas numa curva de calibração já validada e para cada 10 pontos de amostras, foi inserido um controle de qualidade para determinar se o método era eficiente para aquela corrida.

Feito isso com todas as amostras de voluntários, foram obtidos os cromatogramas, que apresentam as concentrações de cada voluntário. Essas concentrações foram enviadas eletronicamente para a etapa estatística.

3.3- Etapa estatística

Com os dados gerados nas etapas clínica e analítica, esses foram encaminhados para a etapa estatística para a obtenção dos resultados farmacocinéticos do fármaco em questão.

A partir das concentrações plasmáticas (anexo 12) individuais obtidas da etapa analítica, foram construídas as curvas farmacocinéticas de cada voluntário, com auxílio de softwares apropriados. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

Parâmetros farmacocinéticos no plasma

A avaliação irá incluir, pelo menos:

a) Cálculo de:

$AUC_{[0-last]}$ Área sob a curva de concentração da droga *versus* tempo do tempo 0 (zero) ao tempo da última concentração acima do Limite de Quantificação (LOQ), calculada pelo método linear-log trapezoidal;

$AUC_{[0-\infty]}$ Área sob a curva de concentração da droga *versus* tempo do tempo 0 (zero) extrapolada ao infinito, calculada pelo método linear-log trapezoidal. $AUC_{[0-\infty]} = AUC_{[0-last]} + C_t/K_e$, onde C_t é a última concentração quantificável;

$AUC_{[0-96]}$ Área sob a curva de concentração da droga *versus* tempo do tempo 0 (zero) ao último (96 horas) tempo coletado, calculada pelo método linear-log trapezoidal;

b) Determinação de:

C_{max} Maior concentração alcançada, com base nos dados experimentais;

T_{max} Tempo no qual ocorreu o C_{max}

Foram utilizados para a análise farmacocinética os softwares Microsoft Excel Version 7.0; WinNonLin Professional Edition, Versão 1.5; e Graph Pad Prism Versão 3.02.

4- RESULTADOS

Todos os critérios de inclusão dos voluntários foram realizados conforme descritos na metodologia clínica. Na avaliação de bioequivalência, o grupo do sexo masculino foi composto por 13 voluntários sadios com idade entre 24 a 40 anos, altura de 1,65m a 1,85m e o peso entre 56,2 Kg a 87,70 Kg. Quanto ao grupo do sexo feminino, participaram 11 voluntárias entre 22 a 44 anos, altura de 1,50m a 1,74m e o peso variando entre 52,6 Kg a 78,0 Kg

As tabelas 1 e 2 indicam os valores farmacocinéticos obtidos de 24 voluntários, após a administração de oxcarbazepina.

Tabela 1- Resultados farmacocinéticos para oxcarbazepina.

Oxcarbazepina					
	Trileptal®		Leptard®		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
AUC _{last} ([ng*h]/mL)	6992	2104	6780	2109	
AUC _{inf} ([ng * h]/mL)	7796	2668	7297	2182	
AUC (0-96h) ([ng * h]/mL)	7536	2257	7242	2162	
C _{max} (ng/mL)	2242	853	2282	1065	
T _{1/2} (h)	10.52	6.28	9.36	4.30	
	Mediana	(intervalo)	Mediana	(intervalo)	
T _{max} (h)	1.26	0.50 2.50	1.00	0.50 3.00	

Tabela 2- Resultados farmacocinéticos para 10-hidroxicarbazepina

10-hidroxicarbazepina						
	Trileptal®			Leptard®		
	Média	Desvio Padrão		Média	Desvio Padrão	
AUC _{last} ([ng*h]/mL)	152997	31863		151088	30306	
AUC _{inf} ([ng * h]/mL)	154720	31342		153054	30251	
AUC (0-96h) ([ng * h]/mL)	154389	31054		152905	30114	
C _{max} (ng/mL)	7415	1712		7424	1628	
T _{1/2} (h)	9.43	1.43		9.17	1.62	
	Mediana	(intervalo)		Mediana	(intervalo)	
T _{max} (h)	5.50	3.00 10.00		5.00	3.00 12.00	

A média geométrica da razão do C_{max} para oxcarbazepina (Leptard® comprimido 600 mg) foi de 96.3% para oxcarbazepina (Trileptal®). O intervalo de confiança de 90% foi de 80.8%-114.7% e a média geométrica da razão do C_{max} 10-hidroxicarbazepina (Leptard®) foi de 100.3% para 10-hidroxicarbazepina (Trileptal®). O intervalo de confiança de 90% foi de 95.5%-105.4%.

Para a média geométrica da razão da AUC_{last} para oxcarbazepina (Leptard®) foi de 96.4% para oxcarbazepina (Trileptal®). O intervalo de confiança de 90% foi de 90.4%-102.7%. Para seu metabólito, a média geométrica da razão da AUC_{last} 10-hidroxicarbazepina (Leptard®) foi de 97.5% para 10-hidroxicarbazepina (Trileptal®). O intervalo de confiança de 90% foi de 94.5%-100.5%.

A média geométrica da razão da AUC_{0-96h} para oxcarbazepina (Leptard® comprimido 600 mg) foi de 95.8% para oxcarbazepina (Trileptal®). O intervalo de confiança de 90% foi de 90.0%-102.0% e a média geométrica da razão da AUC_{0-96h} 10-hidroxicarbazepina (Leptard®) foi de 97.7% para 10-hidroxicarbazepina (Trileptal®). O intervalo de confiança de 90% foi de 95.1%-100.5%.

A média geométrica da razão da AUC_{inf} para oxcarbazepina (Leptard[®]) foi de 94.3% para oxcarbazepina (Trileptal[®] comprimido 600 mg). O intervalo de confiança de 90% foi de 87.8%-101.3%. Para seu metabólito, a média geométrica da razão da AUC_{inf} 10-hidroxicarbazepina (Leptard[®]) foi de 97.6% para 10-hidroxicarbazepina (Trileptal[®]). O intervalo de confiança de 90% foi de 94.8%-100.5%.

As médias das concentrações plasmáticas dos 24 voluntários da oxcarbazepina e do seu metabólito 10-hidroxicarbazepina em relação ao tempo, após a ingestão da dose única de um comprimido de 600 mg da formulação teste ou referência são mostradas nas figuras 17 e 18.

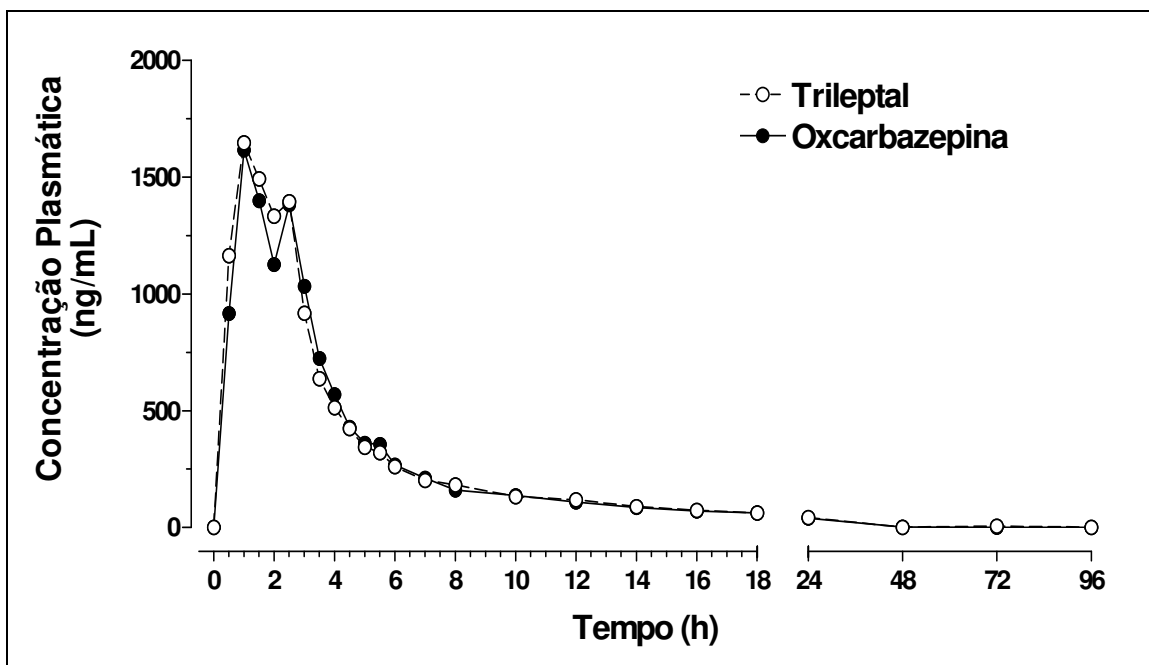


Figura 17- Concentração plasmática média dos 24 voluntários após administração da formulação teste e referência, em relação ao tempo para oxcarbazepina

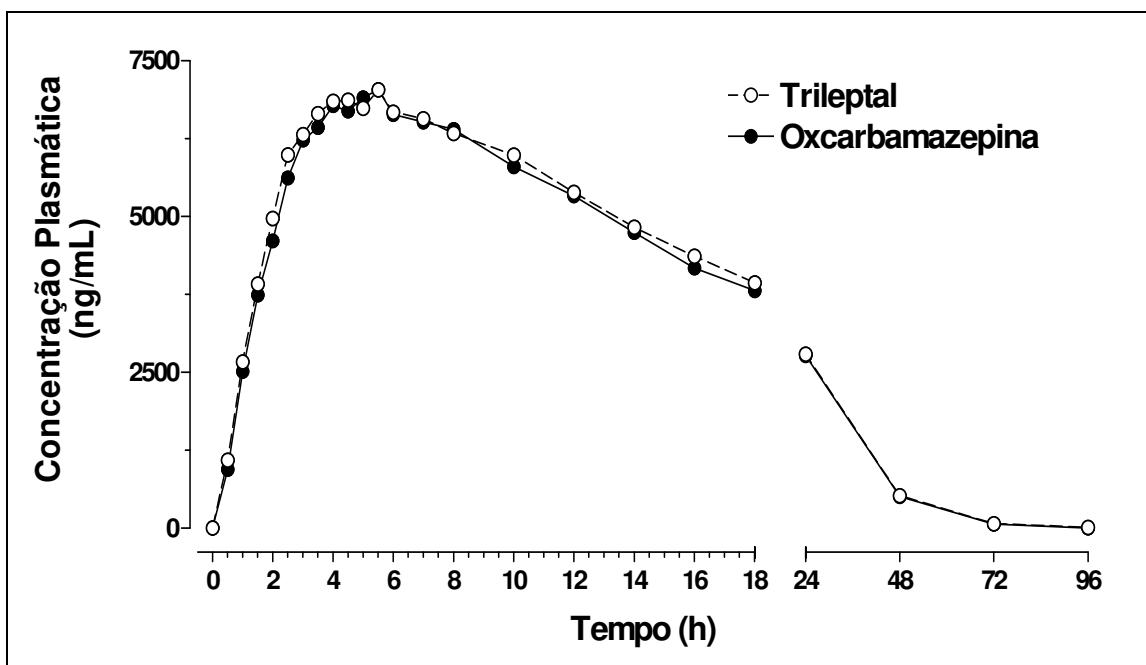


Figura 18- Concentração plasmática média dos 24 voluntários, após administração da formulação teste e referência, em relação ao tempo para o metabólito 10-hidroxicarbamazepina

5- DISCUSSÃO

O planejamento do estudo de bioequivalência preocupou-se com o andamento do mesmo, definindo objetivo e metodologia. Durante o planejamento, estabeleceu-se para a metodologia os principais itens: os tempos de coletas, definição do “washout” (tempo estimado para eliminação do fármaco), aleatorização, e o número de voluntários, entre outros. Todos os itens estão de acordo com os parâmetros do órgão regulatório, a ANVISA, que se fazem necessários para o bom andamento do estudo. (Bezerra, 2002).

Na tentativa de diminuir ainda mais as interferências de cada voluntário nos resultados conclusivos, eles próprios foram os controles, permitindo uma comparação do indivíduo com ele mesmo mediante a randomização estabelecida. (RE nº898,2003). O número de voluntários necessário foi estabelecido principalmente na variabilidade do fármaco nos indivíduos, conforme expresso na literatura disponível.

A técnica analítica utilizada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é considerada, em menos de 30 anos, um avanço tecnológico nos laboratórios de pesquisas ambientais, na área médica, toxicológica e em outros campos da ciência. Nos dias atuais, tornou-se um método analítico, fundamental para quantificação de substâncias químicas em laboratórios, em razão da alta sensibilidade de identificação de moléculas, sobretudo na área farmacêutica. (Tonhi, 2002)

O método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, utilizado para quantificação do fármaco e seu metabólito, neste trabalho, estão de acordo com as exigências da FDA (FDA, 1998)

Os estudos de Flesch (2004), Flesch (2003), Sallas (2003), Wang (2003), Hans (2002), Levert (2002) e Dickinson (1989), detectaram, em plasma humano, níveis de oxcarbazepina e seu metabólito em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta. Para esse trabalho, foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS)

As vantagens encontradas para essa técnica IES são: boa ionização, fácil adaptação à cromatografia líquida e boa sensibilidade, podendo ir de picomol à femtomol. Para isso, a limpeza do aparelho contaminado é essencial por causa da alta sensibilidade

para certos compostos e baixa tolerância à mistura, sendo a pureza da amostra muito importante para um bom desempenho do método. (Siuzdak, 1996, Niessen, 1999)

Segundo Hubert (1999), o critério de validação geralmente conta com uma boa sensibilidade e seletividade do equipamento em relação ao fármaco quantificado. Na pesquisa vigente, a especificidade e seletividade foram comprovadas pela injeção de plasma branco de seres humanos em diferentes fontes e, no entanto, não houve interferência significativas. O tempo de retenção foi de 2.2 minutos para oxcarbazepina, 1.7 minutos para o metabólito, não havendo interferência significativa, sendo que na literatura o tempo de retenção foi de 2 minutos para oxcarbazepina e 1.4 minutos para o metabólito (Hans, 2002). Essa diferença atribui-se às características do equipamento e aos compostos químicos utilizados no experimento.

O limite de quantificação (LOQ) de 20,0 ng/mL para oxcarbazepina e 40,0 ng/mL para seu metabólito foi estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. As figuras 13 e 14 ilustram a precisão e a exatidão intra e interensaio para oxcarbazepina e seu metabólito. Os parâmetros descritos na resolução nº899 e na FDA estabelecem 20% para precisão e 80-120% para exatidão. Portanto os valores nas tabelas estão de acordo com as normas vigentes na resolução e no manual FDA.

Na etapa estatística, no que se refere aos estudos de bioequivalência, o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos é comumente obtido a partir da curva de concentração sangüínea do fármaco *versus* tempo, após administração das preparações em estudo. Para esse caso, determina-se a área sob a curva (AUC), a máxima concentração sangüínea obtida (C_{max}) e o tempo em que esta concentração é atingida (T_{max}). (RE nº 896, 2003)

As médias das concentrações da oxcarbazepina e seu metabólito são ilustradas nas figuras 17 e 18. As representações gráficas mostram que a área sob a curva do fármaco oxcarbazepina e seu metabólito, formulação teste, é praticamente igual à área sob a curva do fármaco trileptal, formulação referência. A análise dos gráficos da oxcarbazepina, bem como seu metabólito indicam que, tanto a taxa de absorção (AUC) quanto da extensão do fármaco testado, são semelhantes nas biodisponibilidades na corrente sangüínea.

Os parâmetros farmacocinéticos, incluindo AUC, $C_{\max}$ e $T_{\max}$ foram comparados na análise estatística. Com isso, foi fundamental que o IC (intervalo de confiança), na metodologia utilizada, fosse de 90% e que os parâmetros ficassem entre 80-125% para AUC, $C_{\max}$ e $T_{\max}$ conforme descritos nos Resultados. (RE, nº 896, 2003). As médias plasmáticas nas tabelas 1 e 2 indicam que o fármaco teste, comparado com a referência, apresenta parâmetros farmacocinéticos semelhantes e significativos para um estudo de bioequivalência, de acordo com a FDA e o órgão regulatório ANVISA.

6- CONCLUSÃO

Conclui-se que a formulação Leptard[®] 600 mg comprimido, elaborada pelo laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda é bioequivalente à formulação Trileptal[®] comprimido 600 mg, elaborada pelo laboratório Novartis Biociências S.A., para taxa e extensão de absorção de oxcarbazepina. Considerou-se que os intervalos de confiança de 90% para as razões geométricas de C_{max} e AUC_{last} estão dentro do intervalo estabelecido pela Food and Drug Administration (80-125%).

O medicamento testado poderá ter um efeito terapêutico similar com o de referência (Trileptal[®]), quando utilizado sob as mesmas condições terapêuticas, mediante o teste de bioequivalência/biodisponibilidade.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrew JC. Initial Individualized selection of long-term anticonvulsant drugs by neurologists. *Neurology* 2004; 63 (Supl 4).

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – CNS/RES nº 196, de 10 de outubro 1996 - disponível em www.anvisa.gob.br acesso em 02/set/2005.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – CNS/RES nº 219, de 20 de setembro 2004 - disponível em www.anvisa.gob.br acesso em 28/agosto/2005.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – CNS/RES nº 251, de 10 de agosto 1999 - disponível em www.anvisa.gob.br acesso em 28/agosto/2005.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – RES nº 391/99, de 07 de agosto 1997 - disponível em www.anvisa.gob.br acesso em 02/set/2005.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução, RE nº 397, de 12 de novembro de 2004 - disponível em www.anvisa.gov.br acesso em 29/jul/2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução, RE nº 894, de 29 de maio de 2003 D.O.U. 02/06/2003 - disponível em www.anvisa.gov.br acesso em 29/jul/2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – CNS/RES nº 895, de 29 de maio 2003 D.O.U. 02/06/2003 - disponível em www.anvisa.gob.br acesso em 29/jul/2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – CNS/RES nº 896, de 29 de maio 2003 D.O.U. 02/06/2003 - disponível em www.anvisa.gob.br acesso em 29/jul/2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução – RE nº 898, de 29 de maio de 2003 D.O.U. 02/06/2003 - disponível em www.anvisa.gob.br acesso em 29/jul/2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – CNS/RES nº 899, de 29 de maio 2003 D.O.U. 02/06/2003 - disponível em www.anvisa.gob.br acesso em 09/set/2005.

ASPE BRASIL - Assistência à Saúde Paciente com Epilepsia, 2004 - disponível em <http://www.aspebrasil.org/v2/index.php?sec=aspe&id=sobreepi> acesso em 02/set/2005 .

Borges NCC, Mendes GD, Borges A, Oliveira SE, Astigarraga REB, Nucci G. Ticlopidine quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study, Journal of Mass Spectrometry, 2004; 39:1562-1569 – disponível em www.interscience.wiley.com acesso em 09/set/2005.

BRASIL – Lei 9.787, 10 fev. 1999. Altera a Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências, regulamentadas pela Resolução 391, 9 agosto 1999. Diário Oficial, Brasília, 10 agosto 1999. n. 152.

Bruins AP. Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure. Mass-Spectrom. Rev. 1991; 10:53-77.

Chow SC. Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies. New York 2000; Marcel Dekker.

Clemens B, Menes A, Nagy Z. Objective assessment of neurotoxicity while shifting from carbamazepine to oxcarbazepine. Acta Neurol Scand 2004; 109: 324-329.

Dickinson RG, WD. Hooper, PR. Dunstan, MJ Eadie. First dose and steady-state pharmacokinetics of oxcarbazepine and its 10-hydroxy metabolite. Austrália, J. Clinical Pharmacology 1989; p. 69-74.

Flesch G, Tudor D, Souppart C, D'Souza J, Hossain M. Oxcarbazepine final market image tablet formulation bioequivalence study after single administration and at steady state in healthy subjects, International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 2002; 11:524-532. v.40.

Flesch G, Tudor D, Denouel J, Bonner J, Camisasca R. Assessment of the bioequivalence of two oxcarbazepine oral suspensions versus a film-coated tablet in healthy subjects, International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 2003; 299-308. v.41.

Flesch JA, AM Kanner, J.Bautista, B.Abou-Khalil et al. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs I: Treatment of new onset epilepsy. Neurology 2003; p. 1252-1260.

Food and drug administration. National Archives and Records Service. Office of the Federal Register. Cod of Federal Regulations. Title 21: Food and Drug Administration, Department of Health and human Services. Part 320. Bioavailability and Bioequivalence requirements. Washington: FDA 1998; p.185-195.

Food and drug administration. Guidance for Industry – Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. U.S. Departament of Health and human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001.

Glish GL, Vachet RW. The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty-Frist Centry. Department of Chemistry, University of North, USA, 2003; p.140-150 v.2 – Disponível em www.nature.com/reviews/drugdisc acesso em 02/2003.

Guerreiro CAM, Guerreiro M. Epilepsia, Editora de Projetos Médicos Ltda, 2004; Unicamp.

Guerreiro CAM, Guerreiro M. Epilepsia, Editora Lemos, 1993.

Guidance for industry – Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations. U.S. Departament of Health and Human Services. Food and Drug Administations. Center for Drug Evaliation and Reseach (CDER), October 2000.

Hans HM, Carsten K, Armin AW, Frank TP, Thomas K. Validated assay for quantification of oxcarbazepine and its active dihydro metabolite 10-hydroxycarbazepine in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/massa spectrometry. J Mass Spectrom. 2002;37:687-692. Disponível em www.interscience.wiley.com, acesso em 22/jul/2005.

Hayes MJ, Lankmayer, EP. Vouros, P. Karger, BL. McGuine J.M. Moving-belt interface with spray deposition for liquid chormatography/mass spectrometry. Anal. Chem. 1983; 55:1745-52.

Hubert PC, J.Crommen, B.Boulanger, E.Chapuzet, N.Mercier, S.Bervoas-Martin, P.Chevalier, D.Grandjean et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. Analytica Chimica Acta 1999;(391)p.135-148

- Lever H, P.Odou, H. Robert. LC determination of oxcarbazepine and its active metabolite in human serum, J.Pharm. and Biomedical Analysis, 2001;p. 517-525.
- Loyd P. Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics of Oxcarbazepine. Epilepsia, 1994; 35 (suppl, 3); S10-S13.
- Kinga KB, Jarogniew JL, Stanislaw JC. Short Communication. J.Pharmacol, 2004; 56, 459-464.
- Moraes MEA, Mores MO. Biodisponibilidade e Bioequivalência: Ensaio Clínicos de Medicamentos no Brasil., 2003. Disponível em WWW.anvisa.gov.br/hotsite/genéricos/profissionais/artigos/ensaios/htm acesso em 29/jul/2003.
- Niessen WMA. State of art in liquid chromatography – mass spectrometry. Journal of Chromatography 1999; 856:179 –197.
- Novartis, Pharma. Complete Prescription Referência 2001; Suíça.
- Novartis, Pharma. Complete Prescription Referência 2003; Suíça.
- Oliveira CF. Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência., Brasília 2002; Ed. 1º, v.1. I, ANVISA.
- Perucca E. . Acta Neurol Scand 2005; 112 (suppl 181): 30.
- Raman S. Initial treatment of epilepsy with antiepileptic drugs. Los Angeles California, Neurology 2004; 63(Suppl 4):S30-S39.
- Sallas WM. Pharmacokinetic drug interactions in children taking oxcarbazepine by the American Society for Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2003;138-49.
- Silverstein, RM, Bassler, GC, Morrill, TC. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 6th edition, Wiley, NY, 1994.
- Siuzdak WMA. Mass spectrometry for biotechnology. Academic Press, 1996.
- Schoeff, MS., Williams, RH. Principles of Laboratory Instruments. St Louis: Mosby, 1993.
- Schulz, HU., Steinijans, VW. Striving for standards in Bioequivalence assessment: a review. Int J. Clin. Pharmacol 1991; Ther. Toxicol., 29 (8):293-298, 1991.

Smith RD, Johnson, AL. Deposition method for moving-ribbon liquid chromatograph – mass spectrometer interfaces. Anal. Chem. 1981; 53:739-40.

Shorvon, S. Oxcarbazepine: a review. Seizure, USA, 2000; 9:p.75-79.

Storpirtis S. Biofarmacocinética: Fundamentos de biodisponibilidades, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos, São Paulo, 1999; p.78p. (livro elaborado e disponível na biblioteca da USP – SP).

Teixeira P. O preconceito contra a pessoa com epilepsia é muitas vezes mais prejudicial do que a própria condição, Jornal da Unicamp 2005; ano XX, nº 310.

Theodor WM, Merker E, Rambeck Bernhard. Clinical Pharmacokinetics of Oxcarbazepine, Clin Pharmacokinet 2003; 42(12):1023-1042.

Wellinder BS, Kornfelt, T. Sorensen, HH: Analytical Chemistry 1995; 67, p.39-43.

Wang, LJ. LC method for the determination of oxcarbazepine in pharmaceutical preparations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analytical 2003; 31(57-62).

BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS

Andrew NW. Therapeutic equivalency of generic antiepileptic drugs: results of a survey. *Epilepsy&Behavior* 2004;5:995-998.

Choi BK, Hercules D, Gusev AI. Effect of liquid chromatographu separation of complex matrices on liquid chormatography – tandem mass spectrometry signal supression *Journal of Chromatography* 2001;907:337-342.

Covey TR, Lee ED, Bruins AP e Henion JD. Liquid chromatography – mass spectrometry, *Anal-Chem* 1896;58:145A-52A.

David WL, Kimford JM, Gregory PL. Determinats of quality of life in epilepsy. *Epilepsy&Behavie* 2005; (5)976-980.

Emma JRH, Sarah LH, Tim B. Epilepsy patients treated with antiepileptic drug therapy exhibit compromised ocular perfusion characteristics. *Epilepsy* 2002; 43(11):1346-1350.

Fattore C, Cipolla G, Gatti G, Limido GL, Sturm Y, Bernasconi G, Perucca E. Induction of Ethinylestradiol ando levonorgestrel Metabolism by Oxcarbazepine in healthy women. *J.Clinical Pharmacology*, 1999; 40(6), p. 783-787.

Gaskell SJ. Electrospray: Principles and Praticce. *Journal of Mass Spectrometry* 1997;32:677-688.

Gregory KB. Initial treatment of epilepsy: Special issues in treating the elderly. *J.Neurology* 2004; 63(supl 4) p.40-48.

Hopfgartner G, Bean K, Henoin J, Henry R. Ion spray mass-spectrometric detection for liquid chromatography: a concentration – or a mass-flow-sensitive device?, 1993:647: 51-61.

Jana EJ, Bruce PH, John LW, John JB, Frank Gilliam, Andres MK, Kimford KM. Screening for Major Depression in Epilepsy with Common Self-report Depression Inventories. *Epilepsy* 2005; 46(5):731-735.

James HY. The long struggle for the 1906 law. Food and drug administration. June 1981. Disponível www.cfsan.fda.gov/~lrd/history2.html, acesso em 25/set/2004.

Jemal M. High – through put quantitative bioanalysis by IC-MS-MS. Biomed Chromatogr. 2000 14(6):422-9.

Jarogniew JL, Kinga KB, Mariusz S, Stanislaw JC. Interactions between Oxcarbazepine and Conventional Antiepileptic Drugs in the Maximal electroshock test in mice: An Isobolographic Analysis. Epilepsy 2003; 44(4):489-499.

Jocken GWT, Jagdev S, Joanne P, Sarah J, Jonathan B, John A. Lack of Pharmacokinetic interaction between oxcarbazepine and lamotrigine. Neuropsychopharmacology 2005;p.1-6.

John W, Meir B, Svein IJ, Günther K, René L, Richard HM et al. Interlaboratory variability in the quantification of new generation antiepileptic drugs based on external quality assessment data. Epilepsy, 2003; 44(1):40-45.

Jurgita G, Voldemaras V, Donatas S. Gender differences of sodium metabolism and hyponatremia as na adverse drug effect. Medicina (Kaunas) 2004;40(10).p.935-942.

Page B.P. Antiepileptic drug pharmacokinetics during pregnancy and lactation. Neurology 2003;61:s35-s42.

Sang-Aham Lee, Hee-Jung Y, Byung-In Lee, Korean Q. Factors contributing to the stigma of epilepsy. Seizure 2005; (14)157-163.

8- ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO DE ATIVIDADES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de Biodisponibilidade Comparativa de uma Formulação Oxcarbazepina em comprimidos de 600 mg produzido pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. (formulação teste) versus uma Oxcarbazepina em comprimidos de 600 mg do Produto de Referência da Novartis Pharma. (Trileptal®) em Voluntários Sadios de Ambos os Sexos

GDN (99/04)

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Responsável: (investigador principal)

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG nº _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do médico/pesquisador (investigador principal) (Cartesius Desenvolvimento de Pesquisas Clínicas Ltda). O abaixo-assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar se um comprimido contendo 600mg de oxcarbazepina produzido pela *Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.* - *Formulação Teste* - atinge níveis no sangue equivalentes ao *Trileptal®* da *Novartis Pharma* - *Formulação Referência*. Você receberá as duas medicações, cada uma em uma ocasião diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá um sorteio.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

Antes de sua participação no estudo e, após a sua participação, você será convidado a ir à Unidade Ambulatorial Campinas para avaliar a sua condição de saúde. Você será examinado por um médico que lhe fará um exame completo, medindo o seu pulso, sua temperatura, sua pressão arterial. Também será feito um exame do coração (eletrocardiograma). O médico lhe perguntará se você teve ou tem alguma doença e se você faz uso de algum medicamento. Durante a visita serão coletadas amostras de sangue, urina e fezes para exames laboratoriais. Os exames laboratoriais incluem exame de sangue completo como hemograma completo ; bioquímica sangüínea (glicose no sangue, proteínas totais, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos); exame sumário de urina (Urina I) e teste de gravidez (β -HCG) para mulheres. Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV 1 e HIV2), no sangue, e exame de fezes (protoparasitológico), serão feitos somente no pré-estudo.

Durante o estudo, você será internado, duas vezes, por aproximadamente 25 horas cada período, na *Unidade Clínica Philippe Pinel*, com intervalo mínimo de 7 dias. Em cada internamento, a) será colhida uma amostra de sangue para dosagem de (Análise hematológica) Hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas; (Análise bioquímica) Uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicérides, ácido úrico e γ GT; (Urina) urina I; (Sorologia) Análise Sorológica para: hepatite B, hepatite C e HIV(1+2) e β -HCG para mulheres; b) será administrado um comprimido contendo 250 mg de oxcarbazepina, acompanhado de 200 mL de água sem gás; c) serão coletadas 24 amostras de sangue de 5 mL cada, através de agulha introduzida em veia superficial para a dosagem do medicamento e mais uma amostra de 10 mL antes da administração da medicação (somente na primeira internação) para o controle do método. d) em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura; e) serão também servidas refeições padronizadas (jantar, ceia, na noite da internação (*se não interferir com o jejum*); desjejum, almoço e lanche. Após as 8 horas da medicação você receberá alta da Unidade Clínica Philippe Pinel. Um total aproximado de 250 mL de sangue será colhido durante todo o estudo.

A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em 60 dias, a contar da primeira internação, após o processo de seleção.

RESPONSABILIDADES

É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que esteja em boa saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações e que tampouco tenha participado de outro estudo clínico com medicamentos nos últimos três meses. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo: a) não pode ser dependente de drogas ou álcool e caso o Pesquisador tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas; b) não pode ter doado (ou retirado/perdido por qualquer motivo) sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo ou ter doado 1500 mL (um litro e meio) no período de um ano antecedendo o estudo; c) não pode tomar bebidas contendo cafeína e xantinas (café, chá, coca-cola, etc) nas 12 horas que antecedem as internações até a última coleta.

É ainda de sua responsabilidade em relação à sua participação no ensaio clínico: a) comparecer às internações na data e horários informados; b) permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos 8 horas) em cada internação; c) tomar toda a medicação prevista; d) ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; e) retornar à Unidade Clínica na data, horário e local combinados, para realização da consulta e exames de alta, independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A administração por boca de *oxcarbazepina* de maneira continuada pode causar efeitos colaterais como diarreia, vermelhidão na pele, náusea, vômito, dor de barriga, boca seca. Entretanto, o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração de dose única de Oxcarbazepina tem menor probabilidade de aparecer. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

A retirada de sangue é um procedimento seguro e pode causar um leve desconforto, além de uma mancha roxa pequena no local da picada que freqüentemente, resolve-se sem maiores problemas.

BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES

A participação, neste estudo, não tem objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Conseqüentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função do tratamento.

INTERCORRÊNCIAS (efeitos indesejáveis)

Se você sofrer algum malefício em decorrência direta de sua participação no estudo, você receberá tratamento desta Instituição, sem qualquer custo. Não haverá, no entanto, qualquer compensação de ordem financeira em função do ocorrido, a não ser que a condição faça jus da indenização prevista no Seguro de Vida em Grupo mencionado abaixo. Contudo, ao assinar este termo, você não está renunciando a qualquer direito legal que você possui.

Durante o período de 180 dias, a partir da data da assinatura deste termo, o voluntário estará assegurado (Seguro de Vida em Grupo) pela empresa Executivos Seguros (Sul América Aetna).

RESSARCIMENTO

De acordo com valores previamente estabelecidos de R\$ 550,00, os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo despendidos na realização do supracitado estudo clínico após a consulta de alta. Caso desista ou seja dispensado antes do estudo ser finalizado, o voluntário receberá proporcionalmente ao tempo despendido, no final do estudo. Entende também que a desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

Estima-se que, durante o período de sua participação no Estudo, os voluntários terão como despesa apenas os gastos de deslocamento da residência ou trabalho até à Unidade Clínica para a realização dos exames e consultas. O transporte de Campinas até a Unidade de Internação em Itapira será providenciado pela equipe do Estudo. Ainda devem ser previstas eventuais visitas posteriores para acompanhamento dos eventos adversos. O ressarcimento destas despesas já está incluído no valor estabelecido no item acima.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

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

Obteve todas as informações e esclarecimentos necessários para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.

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

O Centro de Bioequivalência o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe do Centro de Bioequivalência.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética e Pesquisa Clínica, ou autoridades do(s) órgão(s) governamentais envolvido(s) na fiscalização e acompanhamento do estudo terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem no entanto violar a condição de que tais informações são confidenciais. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está também autorizando tal acesso, mesmo se você se retirar do Estudo.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o Centro de Bioequivalência (fone (19) 3251-6928) e solicitar que o mesmo contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os mesmos nos telefones indicados no final deste *Termo de Consentimento*.

Poderá contactar o (investigador principal), a Gerente de Pesquisa Clínica Cláudia Cristiana Domingues ou o Médico-atendente para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário.

Poderá contactar a *Secretaria do Comitê em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Estadual de Campinas*, fone 3788-8936 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

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

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

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

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

Ao assinar este Termo de Consentimento eu não renunciei a qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Campinas, ____/____/____

NOME DO VOLUNTÁRIO	DATA	Assinatura
PESSOA QUE ESTÁ OBTENDO O TERMO DE CONSENTIMENTO	DATA	Assinatura
TESTEMUNHA (Somente necessário se o voluntário não souber ler)	DATA	Assinatura

CONTROLE INTERNO Nº do Estudo: ____/____ Nº do Voluntário: ____

TELEFONES PARA CONTATO

UNIDADE ANALÍTICA CARTESIUS (11) 3091-7493

Dr. GILBERTO DE NUCCI (19) 3251-6928, (19) 9792-4032

Dra. MIRIAM PRADO GALUPPO (19) 3295-2060, (19) 9611-1458

Dr CELSO H DE OLIVEIRA (19) 3233-5319, (19) 9112-8820

Unidade Ambulatorial de Campinas (19) 3243-2767

ANEXO 2

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-7187

🌐 www.fcm.unicamp.br/pcsquisa/etica/indx.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 01/09/04.
(Grupo II)

PARECER PROJETO: N° 411/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE UMA FORMULAÇÃO DE OXCARBAZEPINA COMPRIMIDO DE 600 MG (LEPTARD) DO PRODUTO DE TESTE DA CRISTÁLIA PRODUTOS QUÍMICOS FARMACÊUTICOS LTDA. VERSUS UMA FORMULAÇÃO DE OXCARBAZEPINA COMPRIMIDO DE 600 MG DO PRODUTO DE REFERÊNCIA DA NOVARTIS (TRILEPTAL) EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto de Nucci

INSTITUIÇÃO: USP/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 20/08/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 21/03/05 e 21/09/05

II - OBJETIVOS

Avaliar comparativamente a biodisponibilidade de dois produtos contendo Oxacarbazepina, a fim de determinar se são bioequivalentes.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo aberto, randomizado, cruzado, com dois tratamentos, dois períodos, dose única por via oral, onde 26 voluntários de ambos os sexos, recebem, em cada período distinto, os medicamentos teste e referência, havendo por conseguinte dois braços de tratamento. Depois de uma seleção e observado um período de pelo menos 2 semanas sem fazer uso de qualquer medicação, caso o participante concorde, ele irá entrar no estudo. Serão realizados exames laboratoriais antes e após o estudo.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Protocolo bem estruturado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é claro e completo. Permite uma tomada de decisão conciente quanto a participação no estudo.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter

aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Aprovado *ad referendum* em 01/09/2004.

A ser homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de setembro de 2004.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 3

Lista de Aleatorização

Oxcarbazepina – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. VS. Trileptal®

Voluntário	Sexo	Seqüência	Período I	Período II
01	M	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
02	M	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
03	M	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
04	M	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
05	M	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
06	M	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
07	M	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
08	M	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
09	M	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
10	M	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
11	M	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
12	M	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
13	M	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
14	F	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
15	F	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
16	F	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
17	F	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
18	F	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
19	F	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
20	F	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
21	F	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
22	F	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
23	F	1	Trileptal®	Oxcarbazepina
24	F	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
25	F	2	Oxcarbazepina	Trileptal®
26	F	2	Oxcarbazepina	Trileptal®

ANEXO 4

EXAMES DE LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA Oxcarbazepina – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. VS. Trileptal®

Fase	Exame
Recrutamento	Hemograma
	Uréia
	Creatinina
	Bilirrubinas
	Proteínas totais
	Albumina
	Glicemia
	Fosfatase alcalina
	Transaminase pirúvica e oxalacética
	Colesterol total
	Triglicérides
	Ácido úrico
	Gama-glutamil transferase
	Beta-HCG para mulheres
	Sorologia para HIV I e II
	Sorologia para hepatite B e C
	Urina I
	Parasitológico de fezes.
	β-HCG para mulheres
Em cada Internação Dia -2	Creatinina
	Transaminase pirúvica e oxalacética
	Hematócrito
	Hemoglobina
	β-HCG para mulheres
Pós-estudo Após 3 dias da última coleta	Hemograma
	Uréia
	Creatinina
	Bilirrubinas
	Proteínas totais
	Albumina
	Glicemia
	Fosfatase alcalina
	Transaminase pirúvica e oxalacética
	Colesterol total
	Triglicérides
	Ácido úrico
	Gama-glutamil transferase
	Urina I
	β-HCG para mulheres

ANEXO 5

Nome do Componente		Código de Identificação do Voluntário			
Unidade Hospitalar		* GDN 000/00		Número do Voluntário	
Formulário de Relato de Caso (CRF)					
HISTÓRIA CLÍNICA – PRÉ ESTUDO					
História colhida em: _____					
1.1. Dados do Voluntário					
Nascimento	Idade	Sexo	Raça	Ocupação	
		M F	C M N A O		
Caucasoide <u>M</u> ulata <u>N</u> egra <u>A</u> marela <u>O</u> utra					
1.2. Medidas					
Pressão Arterial Sistólica / Diastólica (Após 5 min sentado)	1.2.1. Pulso Arterial (de pé)	1.2.2. Altura	1.2.3. Peso Corporal (Roupas leves)	Índice de Massa Corporal	Temperatura (axilar)
mm/Hg	baTempontos/min	m	kg	Kg/m ²	°C
1.3. Revisão de Sistemas					
Sistema / História	Normal	Anormal	Forneça os detalhes que julgar pertinentes		
Alergias, Alergia a drogas					
Olhos-ouvidos-nariz-garganta					
Respiratório					
Cardiovascular					
Gastrointestinal					
Genitourinário					
Sistema Nervoso Central					
Hematopoético-Linfático					
Endócrino-Metabólico					
Dermatológico					
Músculo-esquelético					
Estabilidade Emocional					
Abuso de Álcool ou Drogas					
História Familiar					
História Cirúrgica					
1.4. Outras Informações		O profissional deve também averiguar se há suspeita de não enquadramento do voluntário em função dos Critérios de Inclusão / Exclusão, assinalando o campo apropriado nas folhas onde constam estes critérios.			
Voluntárias Mulheres	Hist. Obstétrica	Gest.:	P. Norm:	Abortos:	Cesáreas:
	Método Anticoncepcional		ACO	ACim	DIU
					DUM
					Outro:Laqueadura
Tabagismo	Fumante	Desde:	Qtde:	1.4.1.1.1 Última Doação de Sangue	
Nunca Fumou	Ex-Fumante	Até:	Qtde:	Nunca Doou Doou Em:	
Café	Nega Consumo	Qtde/período & tipo consumido:			
Chá	Nega Consumo	Qtde/período & tipo consumido:			
Álcool	Nega Consumo	Qtde/período & tipo consumido:			
Outras Informações					
Dados Brutos assinado por: _____					
Responsável pela Avaliação					

ANEXO 6

Pressão arterial, coleta de sangue e temperatura

Oxcarbazepina – *Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.* VS. *Trileptal®*

Esquema do Estudo

<i>Períodos:(1, 2)</i>	Tempo (h)	Atividades	Outras atividades
	0:00 (dentro dos 1 h que antecedem a administração)	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	0:30	Coleta de sangue	
	1:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	1:30	Coleta de sangue	
	2:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	2:30	Coleta de sangue	
	3:00	Coleta de sangue	
	3:30	Coleta de sangue	
	4:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	4:30	Coleta de sangue	
	5:00	Coleta de sangue	
	5:30	Coleta de sangue	
	6:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	7:00	Coleta de sangue	
	8:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	10:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	12:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	14:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	16:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	18:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	24:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	48:00	Coleta de sangue	
	72:00	Coleta de sangue	
	96:00	Coleta de sangue	

ANEXO 7

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

Oxcarbazepina – *Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.* VS. *Trileptal®*

Assunto: COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE DOS VOLUNTÁRIOS	
Substitui: <em branco>	PEC 14/01
Data de Operacionalização: ____ / ____ / ____	Nº de Páginas: 04
Distribuição: Auxiliares, Assistentes, Enfermeiros e Supervisores de enfermagem.	
Elaborado por: Renata Pereira da Silva	Data: 18/09/2003
Revisado por: _____ Unidade da Garantia da Qualidade	Data: ____ / ____ / ____
Aprovado por: _____ Diretor	Data: ____ / ____ / ____
Obsoleto em: ____ / ____ / ____ Motivo:	

1. Objetivo

Estabelecer procedimentos para coleta de amostras de sangue dos voluntários de estudos de bioequivalência nos períodos de internação e pós-internação.

2. Abrangência

Auxiliares, assistentes, enfermeiros e supervisores de enfermagem.

3. Procedimento

3.1 – Definição:

– Coleta na internação: é a coleta seriada realizada para obtenção de amostras de sangue dos voluntários para quantificação de estudos de bioequivalência durante o período de internação.

– Coleta externa: é a coleta realizada para obtenção de amostras de sangue dos voluntários para quantificação de estudos de bioequivalência, após o período de internação.

– Coleta para exame: é a coleta realizada para obtenção de amostras de sangue dos voluntários com fins de exames laboratoriais.

3.2 – Coleta na internação:

- Preparação do voluntário:

– Material a ser utilizado

- Gelco 20 ou 22 com adaptador;
- Alcool 70%;
- Algodão;
- Cuba redonda;
- Esparadrapo;
- Solução de heparina;
- Caixa para descarte de material perfurocortante e
- Garrote

– Até 1 hora antes da primeira coleta seriada procede-se à punção da veia periférica do membro superior do voluntário.

- Garrotear o braço 4 dedos acima da fossa cubital ou do local da punção.
- Realizar a assepsia do local na região da punção com algodão embebido em álcool.
- Inserir o Gelco na veia calibrosa tomando o cuidado para que o bixel fique voltado para cima.
- Introduzido o Gelco retirar lentamente a agulha e inserir o adaptador (rosqueado).
- Em seguida é feita a fixação do Gelco no braço do voluntário com esparadrapo.
- Procede-se à heparinização do Gelco, introduzindo 1 ml da Solução de Heparina.
- Orientar o voluntário para não dobrar o braço ou realizar movimentos bruscos para evitar a perda do acesso por deslocamento ou dobra do cateter.
- Preparação da solução de heparina:
 - A solução de heparina é obtida, colocando-se 5 ml de heparina sódica (5.000 UI/ml) em 245 ml de soro fisiológico estéril (0,9%), preparada em seringa estéril de 10 ml de tal forma que a concentração total na seringa seja de 0,2 ml de heparina por 10 ml de solução.
 - Qualquer bolha tem que ser eliminada sistematicamente do sistema.
 - A solução de heparina tem coloração amarela bem clara. Pequenas variações na cor não afeta a sua eficácia.
 - A solução de heparina tem coloração amarela bem clara. Pequenas variações na cor não afetam a sua eficácia.
- Coleta na internação:

– Todo o material necessário já deverá estar na mesa de cabeceira do voluntário, conforme descrito no Pop PEC 30

– Antes de cada coleta de amostra de sangue, deve-se retirar 1 ml da solução de heparina que foi introduzida após a coleta anterior ou na preparação do voluntário.

– Em seguida, retirar a quantidade de sangue da amostra conforme solicitado no protocolo de pesquisa. O tubo para colocação da amostra já deve estar devidamente identificado conforme descrito no Pop PEC 11.

- Na seqüência procede-se à heparinização do Gelco, introduzindo-se novamente 1 ml da Solução de Heparina.

– Após a última coleta, é retirado o Gelco e se faz uma observação do local para verificar se houve hematomas ou hiperemia (indicação de formação de infecção).

– Na alta da internação, o voluntário é informado quanto ao local, dia e hora que deve se apresentar para fazer a primeira coleta externa.

– Coleta externa (pós-internação):

– A coleta externa é realizada na Clínica em sala apropriada para essa atividade.

– Ao chegar o voluntário é identificado e aguarda o horário de sua coleta.

Todo o material para coleta já deve estar disponível:

- Alcool 70%;
- Algodão;
- Blood-stop;
- Seringa descartável 10 ml;
- Estante com os tubos identificados para um determinado TC;
- Caixa para descarte de material perfurocortante e

- Garrote.
 - Garrotear o braço 4 dedos acima da fossa cubital ou do local da punção.
 - Realizar a assepsia do local na região da punção com algodão embebido em álcool.
 - Em seguida, retirar a quantidade de sangue da amostra, conforme solicitado no protocolo de pesquisa.
 - O sangue da seringa deve ser passado para o tubo de vidro do voluntário identificado com etiqueta conforme descrito no Pop PEC 42.
 - Após a coleta dos voluntários, relativo a um determinado Tempo de Coleta (TC) procede-se à centrifugação.
 - A pessoa responsável pela centrifugação leva os tubos com sangue à centrífuga e, verificando o balanceamento, centrifuga a 3000 rpm.
 - Separa os tubos criogênicos com os mesmos TC dos tubos que estão na centrífuga.
 - Arruma em uma estante auxiliar os tubos de vidro centrifugados e os tubos criogênicos, em duas fileiras diferentes e na mesma ordem.
 - Transfere o plasma de um tubo para outro (obedecendo à ordem já estabelecida) e tampa os tubos.
 - Leva os tubos criogênicos para o “freezer” e armazena até o transporte para quantificação.

ANEXO 8

Nome do Medicamento	Código de Identificação do Voluntário		Iniciais do voluntário
Nome do Hospital	* GDN (verificar)	Número do Voluntário	xxx
Formulário de Relato de Caso (CRF)			

Assinale caso se trate de uma nova versão
relativa ao mesmo evento.

FOLHA DE EVENTO ADVERSO				Nº de Ordem do Evento	xxx	
				Data Preenchimento		
Detalhes Evento						
Início do Evento Adverso	Data	Período _____	☐ Antes da administração do Produto sob Investigação * ☐ Após a administração, durante a internação ☐ Após ter recebido alta da internação			
	Hora	(de tratamento)				
Queixa / Diagnóstico						
Última Dose	Data	Hora	Dose administrada			(em mg)

Assinale caso se trate de uma nova versão relativa ao mesmo evento.

* Ocorrências antes da administração do Produto sob Investigação no 1º Período **não** são Eventos Adversos

Classificações						
Seriedade	☐ Não Sério	☐ Sério	→ Nº Identificação do EA. Sério: _____			
Intensidade	☐ Fraco	☐ Moderado	☐ Intenso			
Relação c/ Terapia	☐ Provável ⚡	☐ Possível ⚡	☐ Não Relacionado	☐ Não Classificável		
Expectativa	☐ Esperado	☐ Não Esperado →	Quando a natureza, intensidade ou frequência não é consistente com a informação disponível na literatura			
Conduta						
Conduta Imediata (escolha 1 ou mais opções que se apliquem)	Dose: ☐ Reduzida		☐ Aumentada	☐ Interrompida	☐ Encerrada	☐ Ñ Aplicável
	☐ Tratamento Farmacológico *			☐ Outra Terapia	☐ Hospitalização	
	☐ Observação (ou nenhuma ação imediata)			☐ Outros	☐ Não Aplicável	
Exames Complem.	☐ Desnecessário	☐ Solicitados Exames: _____				
Detalhes	* Os Tratamentos Farmacológicos são descritos na Folha de Terapias Adicionais constante no CRF.					
Próximo Acomp.	☐ Através dos retornos já programados			☐ Solicitado retorno adicional em: _____		
Desligamento	☐ O médico retirou o Voluntário do Estudo em função do Evento ☐ O Voluntário resolveu interromper sua participação no estudo em função do Evento					
Outras Informações e/ou Evolução						

Se o **desfecho** está sendo preenchido em conjunto com a avaliação acima, assinar somente na última linha deste formulário

Desfecho		Avaliado em	Data:	☐ Preenchido em conjunto c/ a avaliação acima	
Término	Data	Hora	Duração	☐ Não Encerrado (Ver abaixo)	
Status (escolha apenas 1 opção)	Recuperação:		☐ Total	☐ Com Sequelas	
	Evento Adverso ainda presente:		☐ Sob Observação	☐ Sob Tratamento	
	☐ Falecimento	☐ Dados Não Disponíveis (Não compareceu aos retornos solicitados)			
Outras Informações					

Médico Responsável pelas Informações

Assinatura

Data

ANEXO 9

Descrição do Evento Adverso

Oxcarbazepina – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. VS. *Trileptal*[®]

Para fins de acompanhamento de segurança, os voluntários serão observados durante o estudo visando a detecção de eventos adversos.

Um evento adverso é qualquer ocorrência médica não desejada em um sujeito que esteja participando de uma investigação clínica ao qual já tenha sido administrado alguma das *terapias* vinculadas à investigação. Esta ocorrência não necessita ter uma relação causal com a *terapia*. Um *Evento Adverso* pode portanto ser um sinal (incluindo achados anormais 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, independente de dose:

- Provoca a morte;
- Ameaça à 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.

A "ameaça à vida" refere-se a condições que, efetivamente, são encontradas no momento da ocorrência do evento ou que requeiram, também no momento do evento, intervenção para prevenir que haja "ameaça" à vida"; não se refere à possibilidade de "ameaça à vida" caso o evento fosse mais intenso.

Define-se como hospitalização, a admissão em um centro hospitalar, mesmo que seja por um período inferior a 24 horas. Excluem-se as admissões a) para tratar de uma condição pré-existente que esteja documentada na história clínica e que tenha sido planejada anteriormente ao estudo; b) devido a problemas sociais; c) contempladas no protocolo como parte dos procedimentos do estudo; d) eletivas (cirurgia estética)

Além da comunicação de eventos pelo voluntário ou simples observação, o Pesquisador deverá registrar e avaliar as seguintes variáveis, visando a detecção de eventos adversos:

- Sinais vitais dos voluntários (FC, PA e temperatura) obtidos durante as internações;
- Resultados dos exames laboratoriais (hematologia, bioquímica e análise de urina) e eletrocardiograma, obtidos ao final do estudo e avaliados de forma comparativa àqueles obtidos na fase de seleção dos voluntários.
- Achados de exame físico, obtidos ao final do estudo e avaliados de forma comparativa àqueles obtidos na fase de seleção dos voluntários.

Os eventos adversos deverão ser documentados e notificados de acordo com os critérios e definições constantes na seção 9.3 do presente Protocolo.

ANEXO 10

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

Oxcarbazepina – *Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.* VS. *Trileptal®*

Assunto: ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS	
Substitui: PEC 43/02	PEC 12/04
Data de Operacionalização: ____ / ____ / ____	Nº de Páginas: 05
Distribuição: Todos os envolvidos em estudos conduzidos segundo princípios do Sistema de Qualidade.	
Elaborado por: (gerente da etapa clínica)	Data: 28/09/2000
Revisado por: _____ Unidade da Garantia da Qualidade	Data: ____ / ____ / ____
Aprovado por: _____ Diretor	Data: ____ / ____ / ____
Obsoleto em: ____ / ____ / ____ Motivo:	

1. Objetivo

Estabelecer os procedimentos de armazenamento e transporte de amostras de modo a manter a sua integridade.

2. Abrangência

Todos os envolvidos no transporte de amostras de estudos conduzidos segundo princípios do Sistema de Qualidade: pessoal de transporte e despacho de amostras, motoristas, receptores de amostras no laboratório analítico.

3. Procedimento

3.1 – Responsabilidades:

O pessoal que conduz o ensaio clínico é responsável por enviar as amostras ao laboratório para quantificação.

3.2 – Armazenamento:

Todas as amostras coletadas são mantidas em “freezer” até o momento do transporte para a Unidade Analítica.

3.3– Envio das amostras ao laboratório:

3.3.1 – O responsável pelo despacho das amostras para o laboratório deve acondicionar os tubos em caixas térmicas.

3.3.2 – As amostras devem ser embaladas em gelo reciclável (embalagem plástica contendo gel) ou gelo seco.

3.3.3 – Dentro da caixa deverá ser colocado um termômetro digital de Máxima e Mínima e resetado no momento em que a temperatura se estabilizar.

3.3.4 – A caixa térmica deve ser enviada, acompanhada de um Comunicado de Despacho em duas vias, detalhando as amostras, data, condições de transporte e responsável pelo despacho. Ver anexo 1.

3.3.5 – O responsável pelo despacho das amostras deve avisar o laboratório com antecedência de pelo menos um dia, quantas amostras serão enviadas e de qual estudo, para que haja tempo de preparar espaço para acomodar as amostras.

3.4 – Acompanhamento:

A pessoa responsável pelo despacho das amostras deve certificar-se de que as amostras chegaram ao laboratório e foram recebidas em horário que garanta a presença de responsáveis pelo recebimento. Isto deve ser feito, protocolando uma segunda via do Comunicado de Despacho, que deve ser arquivada por quem despachou as amostras.

ANEXO 11

TERMO DE RECRUTAMENTO

Você está sendo convidado a participar de um processo de recrutamento de voluntários para um projeto de pesquisa clínica. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos deste processo sejam esclarecidos.

Responsável: (investigador principal)

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário de um processo de recrutamento para um projeto de pesquisa clínica sob responsabilidade do (Investigador principal). (*Cartesius Desenvolvimento de Pesquisas Clínicas Ltda*). O abaixo-assinado está ciente de que:

- 1** - A sua participação neste processo de recrutamento tem como objetivo avaliar suas condições de saúde para possível participação em um projeto de pesquisa clínica.
- 2** - Será submetido aos seguintes exames laboratoriais: (Análise hematológica) Hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas; (Análise bioquímica) Uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicérides, ácido úrico e γ GT; (Urina) urina I; (Sorologia) Análise Sorológica para: hepatite B, hepatite C e HIV(1+2) e β -HCG para mulheres.
- 3** - Obteve todas as informações necessárias para decidir conscientemente sobre a participação no referido processo.
- 4** - Tem a liberdade de desistir ou interromper a participação no processo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e que esta desistência não implicará em qualquer penalidade .

5 - Os resultados obtidos durante o processo serão mantidos em sigilo, e o Centro de Bioequivalência não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

6 - O Centro de Bioequivalência fornecerá informação ao voluntário e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao processo, quando solicitado pelo mesmo.

7 – Caso seja selecionado para um ensaio de pesquisa clínica, poderá entrar em contato com a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisas da Unicamp, pelo telefone 3788-8936 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

8 - É condição indispensável, para participação no processo, que o voluntário esteja em boa saúde e, portanto, caso durante o processo de recrutamento, a avaliação clínica e/ou os exames laboratoriais não estiverem dentro dos limites de normalidade, você será dispensado com os devidos esclarecimentos e orientação médica.

9 - Caso esteja sob tratamento médico no momento, ou esteja fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações, ou tenha participado de qualquer outro ensaio clínico no período de 90 dias antes da assinatura deste termo de seleção prévia você não poderá ser recrutado.

10 – É condição indispensável para participação nos ensaios clínicos que voluntárias femininas não estejam grávidas, comprovado por exame laboratorial de gravidez.

11 - Caso seja selecionado para participar do estudo, você fará uma nova entrevista antes da internação e nesta serão fornecidos os dados do estudo em questão. Neste caso, você deverá assinar um outro termo denominado termo de consentimento livre e esclarecido, antes da administração da medicação.

Campinas, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura da pessoa responsável pelo atendimento

ANEXO 12

Oxcarbazepina

	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
Tempo (h)	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0:30	2440	0	774	2310	1280	1380	1510	1490	0	198	407	105
1:00	2450	381	1400	1490	952	911	1830	2690	151	3410	258	626
1:30	1620	1170	1330	1160	580	589	2040	2810	775	1720	233	375
2:00	1830	1390	910	1170	482	451	1660	2430	1960	1330	541	325
2:30	2000	1040	767	1090	298	431	1590	2250	1130	1040	1600	440
3:00	1310	950	393	620	320	295	1210	1940	620	664	871	383
3:30	840	771	414	505	250	272	744	1500	412	359	525	241
4:00	618	531	301	347	242	282	946	1390	298	275	496	172
4:30	408	435	256	273	221	193	1200	945	299	186	385	141
5:00	283	381	242	238	175	154	1100	936	302	154	266	157
5:30	289	827	194	228	194	293	690	805	327	154	271	184
6:00	192	448	215	159	248	346	607	660	248	111	216	214
7:00	151	421	205	108	147	192	483	526	138	74.1	177	153
8:00	147	140	188	74.5	213	248	557	385	137	88.6	195	99.5
10:00	117	104	153	74.2	161	157	290	385	102	59.5	117	153
12:00	82.1	57.8	122	57.7	96.3	89.1	345	220	168	55.6	108	123
14:00	75.8	63.5	123	54	50.5	69.9	249	157	72.7	49.6	79.8	113
16:00	65.3	48.5	77.7	60.4	47.2	56.4	214	106	85.5	33.1	63.7	75.4
18:00	58.4	43.9	97.4	50.6	45.5	39.4	90.9	83.3	58.7	42.1	64.2	74.1
24:00	44.4	28.4	60	40.5	25	26.9	50.2	36.2	32.6	32.3	51.8	48.4
48:00	0	0	0	22	0	28	0	0	0	0	0	0
72:00	0	N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
T paired (h)	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00
AUC 0-Tlast(paired)	8554	5643	5627	5831	4073	4383	11666	13302	4782	5617	4664	3379
AUC0-inf	9486	6059	6436	7371	4277	5426	11991	13569	5065	6108	5207	3964
% AUC 0-inf	9.83	6.87	12.57	20.89	4.77	19.22	2.71	1.97	5.58	8.04	10.43	14.75
Tlast (h)	24.00	24.00	24.00	48.00	24.00	48.00	24.03	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00
AUC 0-Tlast	8554	5643	5627	6559	4073	5041	11668	13302	4782	5617	4664	3379
% AUC 0-inf	9.83	6.87	12.57	11.02	4.77	7.08	2.70	1.97	5.58	8.04	10.43	14.75
AUC 0-all	9086	5983	6347	6823	4373	5377	12269	13736	5174	6004	5286	3960
C _{max}	2450	1390	1400	2310	1280	1380	2040	2810	1960	3410	1600	626
T _{max} (h)	1.00	2.00	1.02	0.50	0.50	0.50	1.50	1.50	2.00	1.00	2.50	1.00
T _{1/2} (h)	14.55	10.16	9.35	25.58	5.66	9.51	4.47	5.12	6.01	10.54	7.26	8.37
Ke (1/h)	0.05	0.07	0.07	0.03	0.12	0.07	0.16	0.14	0.12	0.07	0.10	0.08

	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
Tempo (h)	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0:30	606	862	2130	323	2260	114	32.5	1210	214	913	310	0
1:00	926	834	1670	1480	1030	1030	194	1450	1220	1230	1130	0
1:30	1700	993	1160	1020	800	644	162	980	2250	1990	823	34.2
2:00	1200	835	986	887	883	541	157	853	1500	1210	849	124
2:30	1230	1410	920	929	661	644	2310	860	903	980	671	3930
3:00	902	1360	535	544	513	509	1610	551	811	756	786	2700
3:30	821	923	363	384	474	386	1310	452	622	593	701	1800
4:00	578	764	282	258	468	308	926	458	479	466	670	1440
4:30	603	600	232	226	378	234	681	326	254	298	562	1210
5:00	433	360	167	229	299	202	461	227	322	226	465	843
5:30	353	352	169	223	328	198	484	286	280	250	358	550
6:00	257	296	161	168	256	226	353	216	231	203	406	417
7:00	160	240	236	291	196	254	208	215	174	157	311	239
8:00	109	163	322	196	206	260	141	146	119	94.3	199	185
10:00	106	122	154	151	192	294	87.4	94.5	127	78	128	119
12:00	70.5	116	128	113	169	279	72.4	77.2	99	60.5	103	86.5
14:00	77.4	87.4	74.6	80	112	193	56.1	62.4	82.1	56.1	87.7	80.7
16:00	73.3	85.7	59.9	74.7	82.1	144	54	68.7	62.9	60.1	73.9	74
18:00	58.8	75.8	66.2	51	67.5	109	42.9	52.5	57.6	51.2	65.3	60.5
24:00	39.2	39.5	41.1	40.5	37.7	43	24.6	27.4	43.3	23.4	45.1	36.9
48:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
T paired (h)	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00
AUC 0-Tlast(paired)	6185	6563	6303	5086	6171	5551	5585	5285	6014	5648	5728	8144
AUC0-inf	6738	6959	6649	5483	6559	5837	5838	5526	6938	5843	6459	8573
% AUC 0-inf	8.20	5.70	5.20	7.23	5.91	4.90	4.34	4.37	13.31	3.33	11.31	5.01
Tlast (h)	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.02	24.00	24.00
AUC 0-Tlast	6185	6563	6303	5086	6171	5551	5585	5285	6014	5649	5728	8144
% AUC 0-inf	8.20	5.70	5.20	7.23	5.91	4.90	4.34	4.37	13.31	3.32	11.31	5.01
AUC 0-all	6656	7037	6796	5572	6624	6067	5880	5613	6534	5929	6269	8587
C _{max}	1700	1410	2130	1480	2260	1030	2310	1450	2250	1990	1130	3930
T _{max} (h)	1.50	2.50	0.50	1.00	0.50	1.00	2.50	1.00	1.50	1.52	1.02	2.50
T _{1/2} (h)	9.76	6.96	5.84	6.79	7.13	4.61	7.15	6.11	14.79	5.75	11.23	8.07
Ke (1/h)	0.07	0.10	0.12	0.10	0.10	0.15	0.10	0.11	0.05	0.12	0.06	0.09

	13	13	14	14	15	15	16	16	19	19	20	20
Tempo (h)	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0:30	711	34.4	886	267	874	2250	22.6	827	2400	2760	2200	45.8
1:00	860	57.7	2090	2010	2630	2980	527	1900	4570	5000	1410	501
1:30	1140	127	1910	1700	2760	2370	422	1410	3700	3790	1550	545
2:00	727	612	1360	1460	2570	1690	354	1100	3410	2430	1660	1260
2:30	626	1580	1130	1360	2340	1240	3810	1430	1730	1470	916	2770
3:00	461	1260	818	911	1640	961	2100	902	949	824	928	2200
3:30	395	783	510	645	941	614	1480	690	604	486	480	1330
4:00	405	560	460	409	637	406	1390	691	357	335	367	810
4:30	272	374	335	519	489	343	1180	395	217	236	339	587
5:00	220	351	315	558	374	310	869	410	256	181	269	516
5:30	247	351	315	415	400	263	639	350	216	207	370	469
6:00	195	333	233	262	334	244	444	231	159	148	288	347
7:00	209	263	199	197	235	224	217	172	182	137	200	206
8:00	182	194	115	174	195	184	164	148	142	116	172	169
10:00	123	110	84	153	141	182	130	127	79.9	80.3	137	114
12:00	85.1	87.1	75	115	117	214	116	107	137	77.8	139	99.8
14:00	79.4	74.5	56.7	87	112	166	99.5	73.9	67.6	58.4	79.2	82.4
16:00	58.3	59.2	47.4	71	89.1	130	72.3	72.5	65	50.7	84.6	69.8
18:00	58	64.7	38.4	60.8	81.2	121	68.2	59	63.8	35.5	66.4	78.7
24:00	28	38.7	29.3	39.5	70.9	79.3	43.3	45.3	53.6	36	50	52.2
48:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	128	0
96:00	0	0	0	0	0	0	N/A	0	0	0	0	0
	13	13	14	14	15	15	16	16	19	19	20	20
	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
T paired (h)	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.03	24.03
AUC 0-Tlast(paired)	4635	4847	6346	6959	10016	9499	8345	6711	10725	9974	7186	7386
AUC0-inf	4876	5399	6686	7504	12655	10742	8863	7269	13010	10323	12951	8376
% AUC 0-inf	4.94	10.23	5.08	7.26	20.85	11.57	5.85	7.68	17.56	3.38	44.51	11.82
Tlast (h)	24.02	24.00	24.00	24.03	24.07	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	72.00	24.03
AUC 0-Tlast	4636	4847	6346	6960	10021	9499	8345	6711	10725	9974	9321	7386
% AUC 0-inf	4.93	10.23	5.08	7.24	20.81	11.57	5.85	7.68	17.56	3.38	28.03	11.82
AUC 0-all	4972	5311	6698	7434	10870	10450	8864	7254	11368	10406	10857	8012
C _{max}	1140	1580	2090	2010	2760	2980	3810	1900	4570	5000	2200	2770
T _{max} (h)	1.50	2.50	1.00	1.00	1.50	1.00	2.50	1.00	1.00	1.00	0.50	2.50
T _{1/2} (h)	5.95	9.89	8.04	9.54	25.75	10.87	8.31	8.54	29.54	6.72	19.66	13.15
Ke (1/h)	0.12	0.07	0.09	0.07	0.03	0.06	0.08	0.08	0.02	0.10	0.04	0.05

	21	21	22	22	23	23	24	24	25	25	26	26
Tempo (h)	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0:30	971	527	832	1590	1150	3350	0	0	3260	420	2670	1010
1:00	2040	1440	2700	2510	1670	1630	1390	417	3750	1030	2680	3770
1:30	1570	984	2000	2570	1680	1580	972	770	2880	1240	1750	3010
2:00	1240	563	2910	1890	1340	1140	541	849	1910	991	1010	1470
2:30	1240	1090	2200	1560	1680	949	1670	1300	1420	2640	606	734
3:00	1130	1680	1190	977	972	707	861	627	751	2060	322	393
3:30	725	1600	738	405	623	601	590	502	492	1230	215	296
4:00	548	1230	530	422	480	535	346	327	330	1050	152	190
4:30	449	909	388	343	350	397	282	276	268	737	127	131
5:00	334	699	310	261	266	358	217	204	206	582	95.1	111
5:30	408	732	348	288	210	308	303	222	196	495	98.4	84.2
6:00	306	438	291	160	142	249	217	177	170	308	74.7	56.3
7:00	239	301	179	156	165	192	170	106	162	191	86.3	62.9
8:00	209	198	148	133	153	167	168	85.6	139	138	59.4	61
10:00	157	120	106	125	133	130	125	154	140	111	66.1	69.9
12:00	130	101	104	125	102	115	108	103	125	75	48.9	52.3
14:00	93.3	69.3	84.4	89	79.9	84.1	96.7	86.7	95.5	67.3	41.8	48.4
16:00	72.6	54	62.6	76.5	60.6	58.4	75.1	71.8	62.3	54.6	30.7	45.2
18:00	69.8	57.3	51.3	61	69.2	62.1	63.6	49.7	55.6	53.2	33.8	37.9
24:00	45.8	36.7	47.7	60.6	42.6	38.3	37.3	23.8	57.6	39.1	0	28.8
48:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/A
96:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/A
	21	21	22	22	23	23	24	24	25	25	26	26
	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
T paired (h)	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	18.00	18.00
AUC 0-Tlast(paired)	7397	7642	8696	8104	6820	7469	5301	4164	9407	7765	5448	6178
AUC0-inf	8077	8081	9286	9079	7335	7863	5726	4344	10161	8498	5836	6939
% AUC 0-inf	8.43	5.43	6.35	10.74	7.02	5.01	7.42	4.16	7.41	8.62	6.65	10.96
Tlast (h)	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.03	18.00	24.00
AUC 0-Tlast	7397	7642	8696	8104	6820	7469	5301	4164	9407	7766	5448	6377
% AUC 0-inf	8.43	5.43	6.35	10.74	7.02	5.01	7.42	4.16	7.41	8.61	6.65	8.09
AUC 0-all	7946	8083	9268	8831	7331	7929	5749	4449	10099	8235	5549	6723
C _{max}	2040	1680	2910	2570	1680	3350	1670	1300	3750	2640	2680	3770
T _{max} (h)	1.00	3.00	2.00	1.50	1.50	0.50	2.50	2.50	1.00	2.50	1.00	1.00
T _{1/2} (h)	10.30	8.29	8.57	11.16	8.38	7.12	7.89	5.26	9.06	12.97	7.95	13.52
Ke (1/h)	0.07	0.08	0.08	0.06	0.08	0.10	0.09	0.13	0.08	0.05	0.09	0.05

Oh-carbamazepina

	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
Tempo (h)	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0:30	2060	80.5	1370	2310	2230	2480	678	790	0	398	658	170
1:00	4690	1290	2730	3460	3800	3740	1590	2330	364	3560	1050	1830
1:30	5560	2890	3980	4970	4620	4010	2310	3200	1880	4210	1420	2380
2:00	6680	4660	4850	6440	4970	4170	3070	3780	4080	5580	2440	2530
2:30	7870	5290	5660	7340	4840	4540	3360	4810	5140	7100	3990	3300
3:00	8750	5670	5320	7010	5200	4270	3670	4930	4820	7640	4890	3580
3:30	8530	6600	5740	7090	5200	4470	3640	5120	5480	7470	4740	3700
4:00	8780	7050	5620	6630	5300	5250	4130	5130	5330	7710	5920	3920
4:30	8550	6950	5950	7080	5300	5060	4330	5270	5620	7390	5980	3610
5:00	8290	7430	5430	7410	5210	5140	4490	5650	5850	7300	5850	4100
5:30	9400	7980	5770	7400	5260	5140	4550	5610	6240	7430	6150	3930
6:00	8180	7710	5790	7090	5040	5540	4650	5070	5620	7300	5400	3760
7:00	7930	7810	6310	6630	5400	5510	4720	5210	5630	6190	5820	3660
8:00	7180	7840	5720	6660	5520	5710	4980	5040	5770	6460	5880	3760
10:00	6860	6720	5580	5980	5980	5420	5060	5000	5350	5340	4950	3950
12:00	5980	5740	5040	5410	5460	5250	4390	4260	5440	5020	4740	3970
14:00	5490	5170	5520	4970	4470	4990	4160	4050	4090	4340	4460	4060
16:00	4820	4590	5360	4430	3690	4460	3900	3330	4340	2900	4090	3960
18:00	4090	4270	4910	4140	3990	4090	3490	2970	4100	3250	3980	3810
24:00	3130	2790	3960	3540	2930	3150	2400	2000	2580	2370	3000	2850
48:00	364	338	1240	955	737	1520	260	201	374	374	393	544
72:00	73	N/A	255	168	118	177	0	0	0	45.2	40.6	50.9
96:00	0	0	44.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
T paired (h)	48.00	48.00	72.00	72.00	72.00	72.00	48.00	48.00	48.00	48.00	72.00	72.00
AUC 0-Tlast(paired)	167112	150674	190967	182398	153386	176944	112676	109588	130468	135190	135947	122585
AUC0-inf	172429	154626	194520	185481	155206	180415	115619	111860	135142	139472	136400	123223
% AUC 0-inf	3.08	2.56	1.83	1.66	1.17	1.92	2.55	2.03	3.46	3.07	0.33	0.52
Tlast (h)	72.00	48.00	96.00	72.00	72.00	72.00	48.00	48.00	48.00	72.00	72.00	72.00
AUC 0-Tlast	171458	150674	193871	182398	153386	176944	112676	109588	130468	138924	135947	122585
% AUC 0-inf	0.56	2.56	0.33	1.66	1.17	1.92	2.55	2.03	3.46	0.39	0.33	0.52
AUC 0-all	172334	158786	193871	184414	154802	179068	115796	112000	134956	139466	136434	123195
C _{max}	9400	7980	6310	7410	5980	5710	5060	5650	6240	7710	6150	4100
T _{max} (h)	5.50	5.50	7.00	5.00	10.00	8.00	10.00	5.00	5.50	4.00	5.50	5.00
T _{1/2} (h)	9.22	8.11	10.03	12.72	10.69	13.59	7.85	7.84	8.66	8.40	7.73	8.69
Ke (1/h)	0.08	0.09	0.07	0.05	0.06	0.05	0.09	0.09	0.08	0.08	0.09	0.08

	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
Tempo (h)	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0:30	758	850	1420	273	2340	278	85.2	1340	559	1270	354	0
1:00	1550	1470	2570	1760	2670	1790	561	2750	2580	2930	1640	0
1:30	3120	2280	3070	2130	3450	2340	864	3780	4380	4990	2150	65.5
2:00	3950	2700	3910	3340	4550	2850	1060	4150	5300	5290	2770	219
2:30	4360	3780	4720	4130	4900	3360	2870	5060	6670	6270	3690	2330
3:00	4720	4660	4700	4260	4870	3660	3830	5290	7020	6700	3430	3280
3:30	5420	4750	4910	4540	5060	3820	4640	5140	7080	6890	4610	4320
4:00	5280	5010	4920	4400	5250	4070	5290	6480	7400	7200	5020	5280
4:30	5870	5380	5210	4670	5250	3970	5770	5850	5630	7000	5170	6200
5:00	5140	5360	4840	4580	5370	3920	5470	5510	7470	6510	5460	6430
5:30	5710	5700	4970	5080	5780	3950	5540	6100	7660	7040	5320	5090
6:00	5470	5710	4710	4250	5560	3970	6080	5260	7040	7000	5650	6610
7:00	5440	5390	4860	4650	5230	3840	6040	6050	6380	6500	5570	6040
8:00	5020	5280	5370	4490	4860	4200	6050	5450	6330	6230	5470	5870
10:00	4700	4850	5070	4340	5120	4510	5330	4980	6060	5340	4860	5730
12:00	4140	4750	4570	4220	4890	4990	5160	4890	5480	4820	4600	5150
14:00	3310	4390	3630	3730	4390	4300	4220	4170	4990	4340	4470	4670
16:00	3630	3780	3540	3590	3930	4010	4050	4070	4410	4300	4020	4410
18:00	3100	3380	3500	3080	3390	3560	3610	3770	3760	3450	3860	3840
24:00	2420	2320	2730	2330	2520	2480	2680	2850	2750	2460	3120	2880
48:00	635	561	414	484	362	310	616	638	642	493	750	674
72:00	76.3	93.1	77.2	71.8	48.9	40.9	83.8	102	94.6	83.8	119	136
96:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
T paired (h)	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00
AUC 0-Tlast(paired)	129413	130338	129016	118460	129493	115417	137557	146046	158619	145596	146500	144675
AUC0-inf	130645	131773	130055	119499	130088	115895	138811	147597	160049	146805	148249	146813
% AUC 0-inf	0.94	1.09	0.80	0.87	0.46	0.41	0.90	1.05	0.89	0.82	1.18	1.46
Tlast (h)	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00	72.00
AUC 0-Tlast	129413	130338	129016	118460	129493	115417	137557	146046	158619	145596	146500	144675
% AUC 0-inf	0.94	1.09	0.80	0.87	0.46	0.41	0.90	1.05	0.89	0.82	1.18	1.46
AUC 0-all	130329	131455	129942	119322	130079	115908	138563	147270	159754	146601	147928	146307
C _{max}	5870	5710	5370	5080	5780	4990	6080	6480	7660	7200	5650	6610
T _{max} (h)	4.50	6.00	8.00	5.50	5.50	12.00	6.00	4.00	5.50	4.00	6.00	6.00
T _{1/2} (h)	11.19	10.69	9.33	10.02	8.44	8.11	10.37	10.54	10.48	10.00	10.19	10.90
Ke (1/h)	0.06	0.06	0.07	0.07	0.08	0.09	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06

	13	13	14	14	15	15	16	16	19	19	20	20
Tempo (h)	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0:30	1220	74	1130	440	809	1440	52.9	1310	1430	1770	1420	77.4
1:00	2590	262	3580	2710	2900	3710	806	3650	4420	4990	2630	952
1:30	4230	571	5880	4880	4590	5340	1640	5190	5990	7220	4030	1750
2:00	4630	1890	8020	6240	6000	6480	1850	6220	8110	8630	5460	3230
2:30	5120	3710	8660	7810	8950	6760	4490	7200	8770	9210	4250	4830
3:00	5540	5580	8680	8120	8430	9520	6120	7900	8290	9360	6160	6080
3:30	5600	5770	9450	9110	8340	9290	7540	8480	8790	9060	6540	7070
4:00	6600	6140	9420	7270	9740	9390	8810	9440	8440	9080	6220	6950
4:30	6170	5220	9760	9240	8150	9300	9690	6330	8570	8840	6990	7200
5:00	6110	6140	9040	9400	8420	9050	9960	9750	8310	7500	6330	8000
5:30	6660	6660	8640	9760	8800	9020	9150	8990	8310	8440	7230	7970
6:00	5710	6650	8110	7830	8000	8850	9490	8970	7840	7390	6780	7620
7:00	5840	6480	8250	8050	8590	8260	9170	8620	7560	7090	6250	7430
8:00	5810	7350	6910	7790	8380	7930	8380	8260	7100	6590	5710	6880
10:00	5220	5980	6400	7140	9280	7060	7610	7120	5450	5930	5900	5870
12:00	4790	5460	5180	5980	7810	6740	6820	6350	5660	5330	5080	5390
14:00	4330	4750	4660	5350	8090	6120	6030	5240	4840	4380	3840	4650
16:00	3730	4100	3930	4470	6730	5930	5170	5150	4270	3910	4130	3370
18:00	3560	3920	3170	3900	6200	5930	4720	4280	3600	3540	3680	3140
24:00	2190	2770	1880	2530	4210	4590	3080	3240	2850	2310	2260	2290
48:00	343	263	140	247	1290	1330	616	559	484	349	284	334
72:00	0	0	0	0	268	286	105	79.1	61.1	0	125	43.5
96:00	0	0	0	0	51.6	46.1	N/A	0	98.4	0	0	0
	13	13	14	14	15	15	16	16	19	19	20	20
	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
T paired (h)	48.00	48.00	48.00	48.00	96.00	96.00	72.00	72.00	48.00	48.00	72.00	72.00
AUC 0-Tlast(paired)	126591	133338	140099	155374	243659	237949	181536	181780	159005	149306	134914	136122
AUC0-inf	131000	136186	141449	158094	244428	238607	183057	182803	167503	153799	136864	136648
% AUC 0-inf	3.37	2.09	0.95	1.72	0.31	0.28	0.83	0.56	5.07	2.92	1.42	0.39
Tlast (h)	48.00	48.00	48.00	48.00	96.00	96.00	72.00	72.00	96.00	48.00	72.00	72.00
AUC 0-Tlast	126591	133338	140099	155374	243659	237949	181536	181780	165788	149306	134914	136122
% AUC 0-inf	3.37	2.09	0.95	1.72	0.31	0.28	0.83	0.56	1.02	2.92	1.42	0.39
AUC 0-all	130707	136494	141779	158338	243659	237949	181536	182729	165788	153494	136414	136644
C _{max}	6660	7350	9760	9760	9740	9520	9960	9750	8790	9360	7230	8000
T _{max} (h)	5.50	8.00	4.50	5.50	4.00	3.00	5.00	5.00	3.50	3.00	5.53	5.00
T _{1/2} (h)	8.91	7.51	6.69	7.63	10.34	9.90	10.04	8.96	12.08	8.93	10.81	8.39
Ke (1/h)	0.08	0.09	0.10	0.09	0.07	0.07	0.07	0.08	0.06	0.08	0.06	0.08

	21	21	22	22	23	23	24	24	25	25	26	26
Tempo (h)	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
0:00	0	0	0	175	0	0	0	0	0	0	0	0
0:30	718	456	1020	1710	1810	3750	0	0	2570	383	1490	1060
1:00	2600	1880	3410	3550	3940	4530	1630	734	6140	1740	3580	4730
1:30	3830	3210	5210	5470	5390	6150	3490	2740	8130	3320	4860	6720
2:00	5080	3640	7420	7180	6990	7020	3840	4260	9220	3830	5060	6320
2:30	5930	4310	8440	8940	9430	7860	6020	5490	9580	5500	6070	6050
3:00	6770	5530	8660	9110	9730	8080	6610	6330	9740	6930	5650	6000
3:30	7250	7180	9700	5440	9340	8430	7070	6260	9470	6840	5520	7490
4:00	7530	7650	9460	9100	9400	9000	5580	5830	9310	8240	5690	6480
4:30	7050	7770	9510	9470	8970	8570	6470	6820	9040	8000	5780	5500
5:00	6250	8290	9310	8830	9740	9310	5480	6710	8840	7900	5060	5650
5:30	7310	8360	9760	9460	8740	8990	7200	6810	8310	8340	6300	5650
6:00	7200	7160	9650	7190	7720	8740	6930	7290	8260	7720	5350	4670
7:00	7260	8680	8640	8550	6770	8310	6630	5340	7350	7380	5980	4760
8:00	6950	8400	8390	7470	7950	8100	6400	6240	7580	6880	4370	4730
10:00	5970	6580	7380	7130	7150	7480	6170	5860	6880	6100	5340	4850
12:00	5320	6080	6920	7100	6230	6690	5990	5240	6020	5510	3610	3680
14:00	4840	5110	6490	6320	5770	5960	5170	4830	5230	4540	3360	3430
16:00	4330	4120	5680	5370	4950	4600	4620	4200	4670	3960	2680	3240
18:00	3840	3930	4870	4550	4780	4460	3980	4010	4020	3560	2290	2690
24:00	2300	2440	3100	3620	2960	2890	2880	2930	3280	2270	1820	2540
48:00	197	187	834	661	451	384	259	360	642	277	225	190
72:00	0	0	54.7	91.1	82.6	41.9	0	0	46.5	0	0	N/A
96:00	0	0	83.7	0	0	0	0	0	0	0	0	N/A
	21	21	22	22	23	23	24	24	25	25	26	26
	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste	Referência	Teste
T paired (h)	48.00	48.00	72.00	72.00	72.00	72.00	48.00	48.00	48.00	48.00	48.00	48.00
AUC 0-Tlast(paired)	136492	143159	198941	193608	178949	176931	142496	140399	180265	137695	106725	116633
AUC0-inf	138462	144973	201967	194795	180062	177406	145329	144771	186316	140921	109631	118921
% AUC 0-inf	1.42	1.25	1.50	0.61	0.62	0.27	1.95	3.02	3.25	2.29	2.65	1.92
Tlast (h)	48.00	48.00	96.00	72.00	72.00	72.00	48.00	48.00	72.00	48.00	48.00	48.00
AUC 0-Tlast	136492	143159	200578	193608	178949	176931	142496	140399	185709	137695	106725	116633
% AUC 0-inf	1.42	1.25	0.69	0.61	0.62	0.27	1.95	3.02	0.33	2.29	2.65	1.92
AUC 0-all	138856	145403	200578	194701	179941	177434	145604	144719	186267	141019	109425	116633
C _{max}	7530	8680	9760	9470	9740	9310	7200	7290	9740	8340	6300	7490
T _{max} (h)	4.00	7.00	5.50	4.50	5.00	5.00	5.50	6.00	3.00	5.50	5.50	3.50
T _{1/2} (h)	6.93	6.72	11.50	9.04	9.33	7.86	7.58	8.42	9.04	8.07	8.95	8.35
Ke (1/h)	0.10	0.10	0.06	0.08	0.07	0.09	0.09	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08

9- PUBLICAÇÃO

Ticlopidine quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study

Ney Carter do Carmo Borges,¹ Gustavo Duarte Mendes,^{2,3} André Borges,^{2,3} Sandro Evandir de Oliveira,^{2,3} Rafael Eliseo Barrientos-Astigarraga² and Gilberto De Nucci^{1,2,3*}

¹ Department of Pharmacology, State University of Campinas, P.O. Box 6111 Campinas, SP, Brazil

² Cartesius Development of Clinical Research, Jesuino Marcondes Machado Ave. 415, 13092-320 Campinas, SP, Brazil

³ Department of Internal Medicine, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Received 26 April 2004; Accepted 13 August 2004

A rapid, sensitive and specific method to quantify ticlopidine in human plasma using clopidogrel as the internal standard (IS) is described. The analyte and the IS were extracted from acidified plasma by liquid–liquid extraction using diethyl ether–hexane (80:20, v/v). The extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS). Chromatography was performed isocratically on a Jones Genesis C₈ 4 µm analytical column (150 × 4.1 mm i.d.). The method had a chromatographic run time of 3.0 min and a linear calibration curve over the range 1.0–1000 ng ml⁻¹ ($r^2 > 0.999427$). The limit of quantification was 1.0 ng ml⁻¹. This HPLC/MS/MS procedure was used to assess the bioequivalence of two ticlopidine 250 mg tablet formulations (ticlopidine test formulation from Apotex do Brasil, Brazil, and Ticlid from Sanofi-Synthelabo, standard reference formulation). A single 250 mg dose of each formulation was administered to healthy volunteers. The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with a 2 week washout interval. Since the 90% confidence interval for $C_{\max}$ and area under the curve ratios were all inside the 80–125% interval proposed by the US Food and Drug Administration, it was concluded that ticlopidine formulation from Apotex do Brasil is bioequivalent to Ticlid formulation with respect to both the rate and the extent of absorption. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: ticlopidine; bioequivalence; plasma; pharmacokinetics

INTRODUCTION

Ticlopidine, 5-[(2-chlorophenyl)methyl]-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridine hydrochloride, an inhibitor of platelet aggregation, proved to be endowed with potent antithrombotic activity in several animal models, and is used therapeutically in the prevention of stroke and myocardial infarction in high-risk patients.^{1–4} Ticlopidine acts primarily by selectively blocking ADP-induced platelet aggregation.⁵

Here we present a fast, sensitive and selective method for measuring plasma ticlopidine by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) to quantify ticlopidine in human plasma using clopidogrel as the internal standard (IS, Fig. 1). This method was employed in a bioequivalence study of two ticlopidine 250 mg tablet formulations: ticlopidine

test formulation from Apotex do Brasil, Brazil, and Ticlid from Sanofi-Synthelabo, standard reference formulation. The bioequivalence study was conducted as a single-dose, two-way, open, randomized crossover design with a 2 week washout period between the doses and 54 healthy volunteers were included.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

Ticlopidine was provided by Apotex do Brasil, Brazil, lot number 08BH0BBI. Clopidogrel was obtained from Bristol-Myers-Squibb, Brazil, lot number 01/03. Acetonitrile and methanol (HPLC grade), ammonium acetate, diethyl ether, hexane and deionized water (analysis grade) were purchased from Mallinckrodt (Paris, KY, USA). Ultrapure water was obtained from an Elga UHQ system (Elga, UK). Blank human blood was collected from healthy, drug-free volunteers. Plasma was obtained by centrifugation of blood treated

*Correspondence to: Gilberto De Nucci, Cartesius Development of Clinical Research, Jesuino Marcondes Machado Ave. 415, 13092-320 Campinas, SP, Brazil. E-mail: denucci@dglnet.com.br

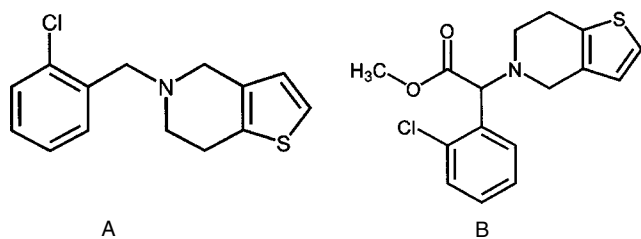


Figure 1. Structures of (A) ticlopidine and (B) clopidogrel.

with the anticoagulant sodium heparin. Pooled plasma was prepared and stored at approximately -20°C until needed.

Calibration standards and quality control

Stock solutions of ticlopidine and the IS (clopidogrel) were prepared in methanol–water (50:50, v/v) at concentrations of 1 mg mL^{-1} . Calibration curves for ticlopidine were prepared by spiking blank plasma at concentrations of 1.0, 2.0, 5.0, 20.0, 50.0, 100.0, 200.0, 500.0 and 1000.0 ng mL^{-1} . The analyses were carried out in duplicate for each concentration. Quality control samples were prepared in blank plasma at concentrations of 3.0, 60.0 and 800.0 ng mL^{-1} (QCA, QCB and QCC, respectively). The spiked plasma samples (standards and quality controls) were extracted in each analytical batch along with the unknown samples.

Sample preparation

All frozen human plasma samples were previously thawed at ambient temperature and centrifuged at 2000 g for 1 min at 4°C to precipitate solids. A $200\text{ }\mu\text{L}$ volume of sample human plasma was introduced into a glass tube followed by $50\text{ }\mu\text{L}$ of the IS solution (80 ng mL^{-1} of clopidogrel in methanol–water (50:50, v/v)) and the samples were vortex mixed for $\sim 10\text{ s}$. Diethyl ether–hexane (80:20, v/v) was added (4 mL) to all the tubes and extraction was performed by vortex mixing for 40 s. The tubes were frozen for 15 min at -70°C . The upper organic phase was transferred to another set of clean glass tubes and evaporated to dryness under N_2 at 50°C . The dry residues were dissolved in 0.200 mL of acetonitrile–water (90:10, v/v) + 1 mM ammonium acetate solution, vortex mixed for 15 s to reconstitute the residue and transferred to 96-well plates using an automatic pipette with a disposable plastic tip.

Chromatographic conditions

A $10\text{ }\mu\text{L}$ aliquot of each plasma extract was injected into a Jones Genesis C_8 $4\text{ }\mu\text{m}$ analytical column, ($150 \times 4.1\text{ mm i.d.}$) operating at room temperature. The compounds were eluted by pumping the mobile phase (acetonitrile–water (90:10, v/v) containing 1 mM ammonium acetate at a flow-rate of 1.5 mL min^{-1} . Under these conditions, typical standard retention times were 1.8 min for ticlopidine and 2.1 min for clopidogrel, and back-pressure values of $\sim 60\text{ bar}$ were observed.

The column eluate was split 1:15 so that only $10\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ entered the mass spectrometer. The temperature of the autosampler was kept at 8°C and the run time was 3.0 min.

Mass spectrometric conditions

The mass spectrometer (Micromass Quattro Ultima) equipped with an electrospray source run in the positive ion mode (ES+) was set up in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, monitoring the transitions $m/z\ 264.1 \rightarrow 153.9$ and $322.1 \rightarrow 212.0$ for ticlopidine and the IS, respectively. Figure 2 shows the full-scan spectra (upper trace) and the product ion spectra (lower trace) obtained for ticlopidine (A) and clopidogrel (B). The proposed fragmentation pathways for ticlopidine and clopidogrel (Fig. 3) show in both cases a simple proton abstraction from the methylene atom yielding the most abundant fragments of $m/z\ 154$ for ticlopidine and $m/z\ 212$ for clopidogrel and a neutral loss of chlorobenzene under the conditions of the experiment (collision energy). In order to optimize all the MS parameters, a standard solution of the analyte and IS was infused into the mass spectrometer. For both ticlopidine and clopidogrel, the optimized parameters obtained were dwell time 0.3 s, cone voltage 35 V and collision energy 15 eV. Data acquisition and analysis were performed using the software MassLynx (version 3.5) running under Windows NT (version 4.0) on a Pentium III PC.

Bioequivalence study

Fifty-four healthy volunteers of both sexes aged between 18 and 50 years and within 15% of the ideal body weight were selected for the study after assessment of their health status by clinical evaluation (physical examination, ECG) and the following laboratory tests: blood glucose, urea, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase, γ -GT, total bilirubin, albumin and total protein, triglyceride, total cholesterol, hemoglobin, hematocrit, total and differential white cell counts and routine urinalysis. All subjects were negative for HIV, HCV and HBV (except for serological scar). All subjects gave written informed consent and the Institute of Biomedical Sciences Ethics Committee of the University of São Paulo approved the clinical protocol. The study was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (1964), Tokyo (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996) and Edinburgh (2000) revisions.

The study was begun with 48 healthy volunteers. Three volunteers dropped out of the study for personal reasons and three volunteers dropped out of the study on the decision of the clinical investigator (adverse effects). The six volunteers who dropped out of the study were replaced by another six volunteers and the same corresponding sequence was applied as defined in the clinical protocol.

The volunteers had the following clinical characteristics, according to gender and expressed as mean $\pm$ SD (range): males: age 29.6 ± 5.6 years (21–43), height $180.0 \pm 0.1\text{ cm}$ (170.0–190.0), body weight $75.2 \pm 7.8\text{ kg}$ (60.5–97.1); females: age 29.4 ± 4.9 years (22–40), height $160.0 \pm 3.3\text{ cm}$ (150.0–170.0), body weight $59.1 \pm 6.0\text{ kg}$ (47.3–72.0). The study was a single-dose, two-way randomized crossover design with a 2 week washout period between the doses.

During each period, the volunteers were hospitalized at 3 p.m. and had a normal evening meal, and after an overnight

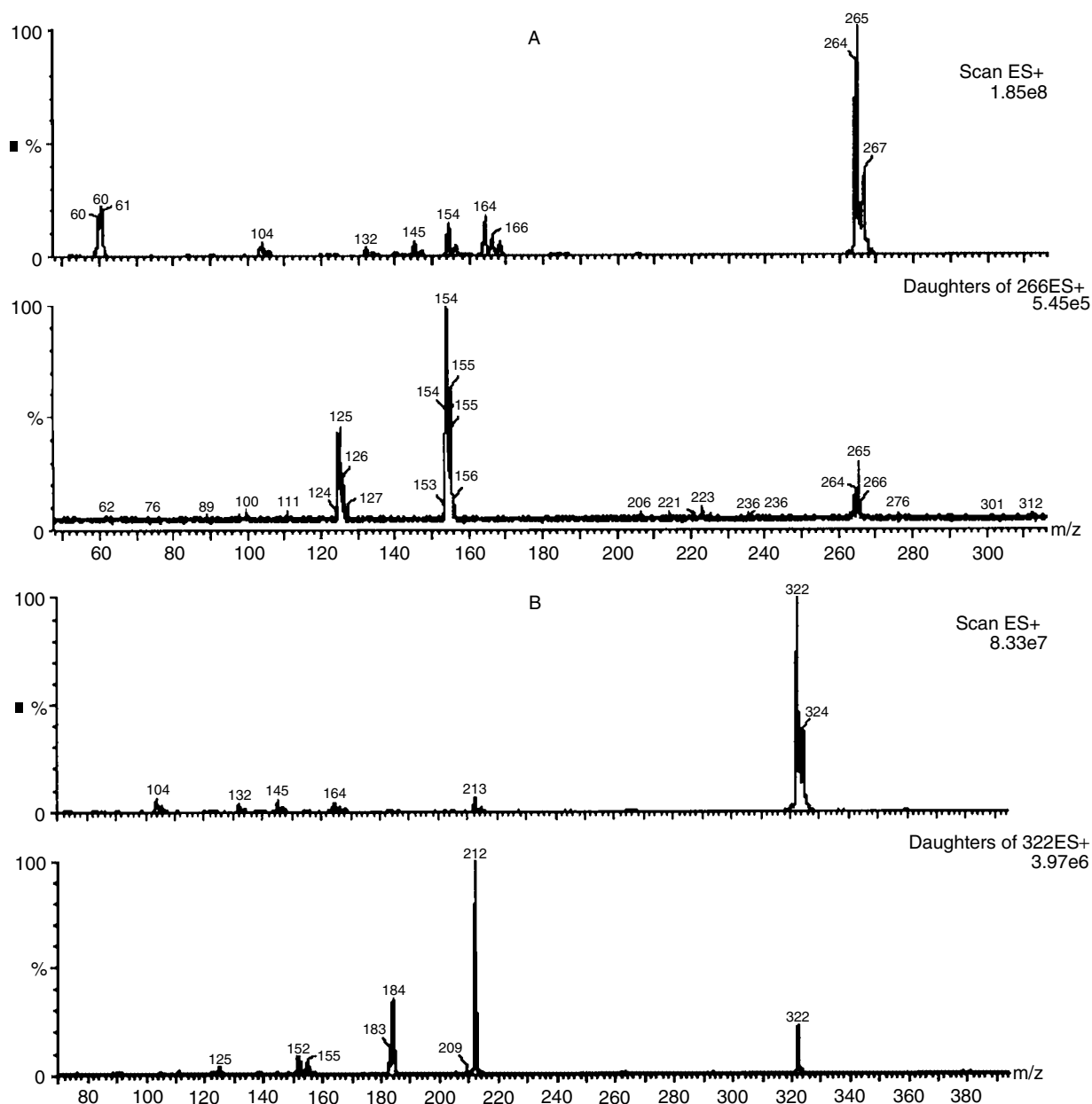


Figure 2. Full-scan mass spectra (upper traces) and product ion spectra (lower traces) of (A) ticlopidine and (B) clopidogrel.

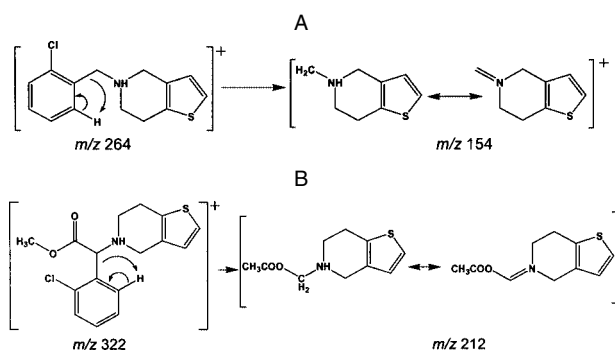


Figure 3. Proposed fragmentation pathways for (A) ticlopidine and (B) clopidogrel.

fast they received (at ~7 a.m.) a single dose of ticlopidine (250 mg of either tablet formulation). Water (200 ml) was

given immediately after the drug administration and the volunteers were then fasted for 4 h, after which period a standard lunch was served; an evening meal was provided 11 h after dosing. A standard meal consisted of rice, beans, vegetables and fried chicken meat plus a fruit as dessert. No other food was permitted during the 'in-house' period and liquid consumption was allowed *ad libitum* after lunch (with the exception of xanthine-containing drinks, including tea, coffee and cola). At 0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 h, systolic and diastolic arterial pressure (measured non-invasively with a sphygmomanometer), heart rate and temperature were recorded.

The following formulations were employed: ticlopidine (test formulation from Apotex do Brasil, Brazil, lot No. GF6662, expiry 09/2004) and Ticlid (standard reference formulation from Sanofi-Synthelabo, lot No. 2083363, expiry date 10/2004).

Blood samples (4 ml) from a suitable antecubital vein were collected by indwelling catheter into heparin-containing tubes before and 0.83, 1, 1.33, 1.67, 2.0, 2.33, 2.67, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 and 96 h post-dosing. The blood samples were centrifuged at ~ 2000 g for 10 min at room temperature and the plasma was stored at -20°C until assayed for ticlopidine content.

Pharmacokinetics and statistical analysis

The first-order terminal elimination rate constant (k_e) was estimated by linear regression from the points describing the elimination phase in a log-linear plot. The half-life ($t_{1/2}$) was derived from this rate constant ($t_{1/2} = \ln 2/k_e$).

Bioequivalence between the two formulations was assessed by calculating individual test/reference ratios for the peak of concentration ($C_{\max}$), area under the curve (AUC) of plasma concentration until the last concentration observed (AUC_{last}) and the area under the curve between the first sample (pre-dosage) and infinite ($\text{AUC}_{0-\infty}$). $C_{\max}$ and the time taken to achieve this concentration ($T_{\max}$) were obtained directly from the curves. The areas under the ticlopidine plasma concentration vs time curves from 0 to the last detectable concentration (AUC_{last}) were calculated by applying the linear trapezoid rule. Extrapolation of these areas to infinity ($\text{AUC}_{0-\infty}$) was done by adding the value C_{last}/k_e to the calculated AUC_{last} (where C_{last} = the last detectable concentration). The AUC and $C_{\max}$ data for the two formulations were analyzed by ANOVA to establish whether the 90% confidence interval (CI) of the ratios was within the 80–125% interval indicating bioequivalence as proposed by the US Food and Drug Administration. Parametric analyses of ln-transformed arithmetic means between test and reference formulations were also performed.

The software used included WinNonLin Professional Network Edition (Scientific Consulting, version 1.5). Bioequivalence Program for Two-Period Crossover Studies (Herman P. Wijnand, version 3.4), Microsoft Excel (version 7.0) and GraphPad Prism (version 3.02).

Assay performance

Linearity

Linearity was determined to assess the performance of the method. A quadratic regression with a weighting index of $1/x$ and second order was performed on the peak area ratios of ticlopidine and IS vs ticlopidine concentrations of the nine plasma standards (1.0, 2.0, 5.0, 20.0, 50.0, 100.0, 200.0, 500.0 and 1000.0 ng ml $^{-1}$) in duplicate to generate a calibration curve.

Recovery

The recovery was evaluated by calculating the mean of the response of each concentration and dividing the extracted sample mean response by the unextracted (spiked blank plasma extract) sample mean of the corresponding concentration. Comparison with the unextracted samples, spiked on plasma residues, was done in order to eliminate matrix effects, giving a true recovery. The matrix effect experiments were carried out using the ratio between spiked mobile phase solutions and unextracted samples, spiked in plasma residues.

Precision and accuracy

Within- and between-run precision were determined as the relative standard deviation, $\text{RSD} (\%) = 100(\text{SD}/M)$, and the accuracy as the percentage relative error, $\text{RE} (\%) = (E - T)(100/T)$, where M is the mean, SD is the standard deviation of M , E is the experimentally determined concentration and T is the theoretical concentration.

Stability

Stability quality control plasma samples (3.0, 60.0 and 800.0 ng ml $^{-1}$) were subjected to short-term (8 h) room temperature, three freeze–thaw (-20 to 25°C) cycles, 24 h autosampler stability (12°C) and long-term stability at -20°C (269 days) tests. Subsequently, the ticlopidine concentrations were measured compared with freshly prepared samples. The significance of the results obtained was analyzed by Student's t -test ($p < 0.05$).

Ion suppression

A procedure to assess the effect of ion suppression on MS/MS was performed. The experimental set-up consisted of an infusion pump connected to the system by a 'zero volume tee' before the split and the HPLC system pumping the mobile phase, which was the same as that used in the routine analysis of ticlopidine, i.e. acetonitrile–water (90:10, v/v) + 1 mM ammonium acetate at 1.5 ml min $^{-1}$. The infusion pump was set to transfer (50 μl min $^{-1}$) of a mixture of analyte and IS in mobile phase (both 50 μg ml $^{-1}$). A sample of human pooled blank plasma was extracted by the extraction procedure. The reconstituted extract was injected into the HPLC system while the standard mixture was being infused. In this system, any ion suppression would be observed as a depression of the MS signal.

RESULTS

Assay performance

The simplest regression method for the calibration curves of the ticlopidine was $Y = A + Bx + Cx^2$ from 1.0 to 1000 ng ml $^{-1}$ (calibration curve $-8.40596 \times 10^{-6} x^2 + 0.0724485x + 0.000467302$, $r^2 > 0.999427$). A quadratic regression with a $1/x$ weighting and second order was carried out on the peak area ratios of ticlopidine and IS versus ticlopidine concentrations of the nine human plasma standards (in duplicate) to generate a calibration curve. In the case of ticlopidine and its IS, clopidogrel, there was no significant ion suppression in the region where the analyte and internal standard are eluted, as shown in Fig. 4.

The recovery of ticlopidine was 91.8% ($\pm\text{CV}$ 3.5), 85.0% ($\pm\text{CV}$ 9.5) and 90.3% ($\pm\text{CV}$ 5.5) for the 3.0, 60.0 and 800.0 ng ml $^{-1}$ standard concentrations, respectively. The recoveries of the IS were 102.4% ($\pm\text{CV}$ 3.7), 96.0% ($\pm\text{CV}$ 3.5) and 100.5% ($\pm\text{CV}$ 3.7) for the 3.0, 60.0 and 800.0 ng ml $^{-1}$ standard concentrations, respectively. No significant matrix effect was observed. The limit of quantification (LOQ) validated was 1.0 ng ml $^{-1}$, defined as the lowest concentration at which both the precision and accuracy were $<20\%$. Stability tests performed indicated that there was no significant degradation under the conditions described. The within- and

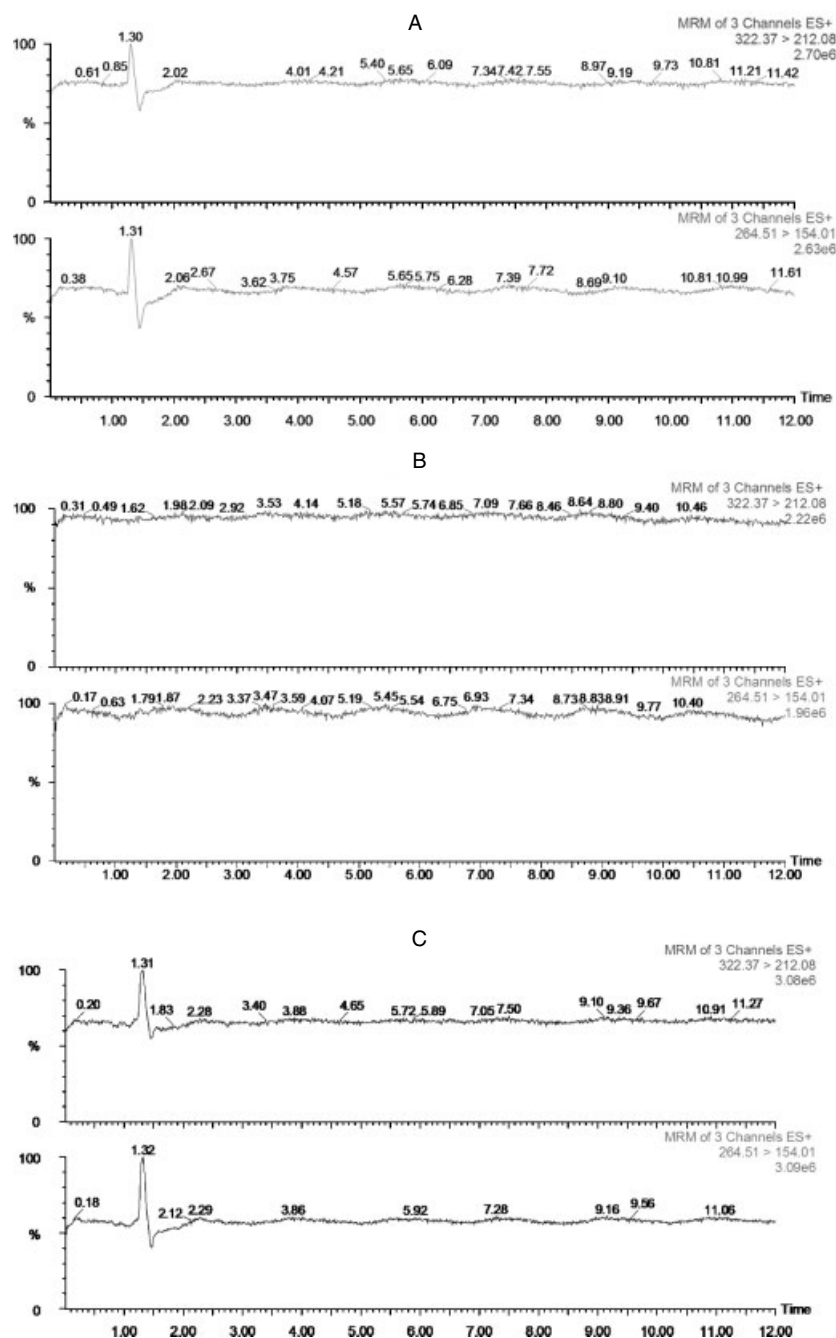


Figure 4. Ion suppression procedure: (A) mobile phase infusion; (B) analyte ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) infusion and (C) blank sample injection.

between-run precision and accuracy for the LOQ and QCs are summarized in Table 1.

As shown in Fig. 5, no endogenous peak was observed in the mass chromatogram of blank plasma. The chromatogram for the standard LOQ sample is shown in Fig. 5, in which the retention times for ticlopidine and IS were 1.8 and 2.1 min, respectively.

Bioequivalence study

Ticlopidine was well tolerated at the administered doses and no significant adverse reactions were observed or reported. No clinically relevant change was observed in any measured biochemical parameter.

Table 2 shows the values of the pharmacokinetic parameters. Table 3 summarizes the bioequivalence analysis for

ticlopidine formulations. No period effect was observed for the pharmacokinetic parameters studied (data not shown). The mean ticlopidine plasma concentration vs time curves obtained after a single oral dose of each ticlopidine formulation are shown in Fig. 6.

DISCUSSION

The HPLC/MS/MS method described here for drug quantification conforms to the requirements for high sensitivity, specificity and high sample throughput for pharmacokinetic studies. Ticlopidine has been determined in plasma and other biological fluids by using HPLC coupled to spectrophotometric detection,⁶ HPLC coupled to gas chromatography

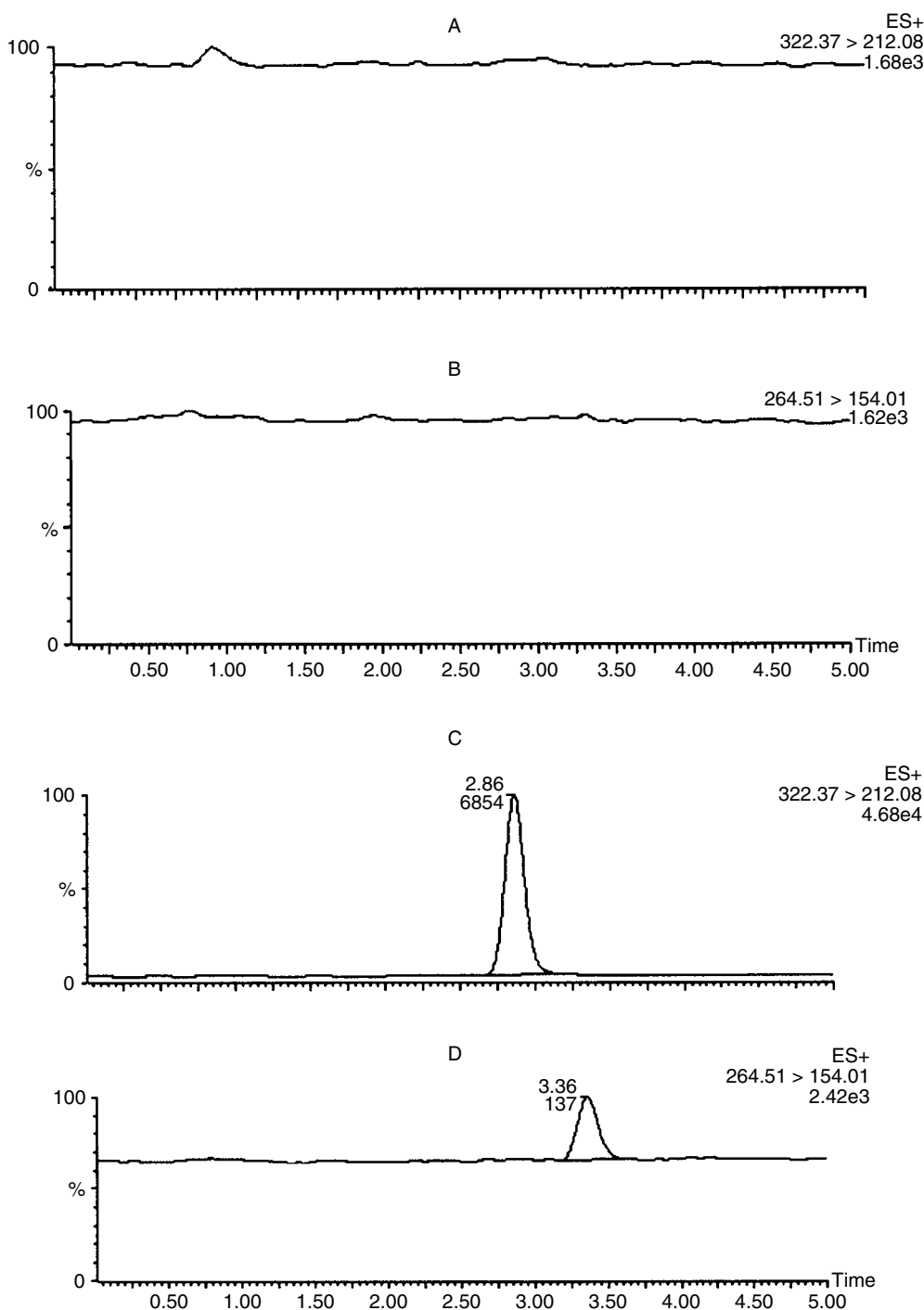


Figure 5. MRM chromatogram of the LOQ (1 ng ml⁻¹): (A) clopidogrel and (B) ticlopidine. MRM chromatograms of blank normal human plasma: (C) clopidogrel and (D) ticlopidine.

(GC)/MS,⁷ GC with thermoionic detection,⁸ GC with nitrogen-phosphorus detection (GC/NPD),^{9,10} GC/MS,^{7,9} HPLC coupled to UV detection^{11–15} and LC coupled with positive ion electrospray MS (LC/(+)ES-MS).¹⁶

This is the first reported study of plasma measurement of ticlopidine using HPLC/MS/MS. Our method allows a suitable sensitivity (LOQ 1.0 ng ml⁻¹) and can be carried out in a shorter time (retention time 1.8 min for ticlopidine compared with 4.8 min for GC/NPD, 9.5 min for GC/MS and 10.5 min for LC/(+)ES-MS.^{7,9,10,16} The last method as described by Langana *et al.*¹⁶ also shows good

sensitivity but a longer retention time (10.5 min) for the measurement of ticlopidine in human plasma. Furthermore, our method involves a simple liquid–liquid extraction as opposed to the solid-phase extraction described by Langana *et al.*

As demonstrated here, this method is well suited for routine high-throughput analyses, such as in a bioequivalence study. It was developed in order to make the extraction step as simple as possible. Other ionization process could have been applied in this assay (e.g. atmospheric pressure chemical ionization). However, the best results in

Table 1. Accuracy and precision data for ticlopidine from the pre-study validation in human plasma

Intra-batch	Nominal concentration (ng mL ⁻¹)	1.0	3.0	60.0	800.0
	Mean	1.14	3.16	63.5	890
	Range	0.93–1.34	2.82–3.24	57.0–65.0	787–925
	Accuracy (%)	113.8	105.3	105.8	111.3
	Precision (%)	5.5	1.7	2.3	2.4
Inter-batch	Nominal concentration (ng mL ⁻¹)	1.0	3.0	60.0	800.0
	Mean	1.11	3.06	60.9	843
	Range	0.91–1.34	1.31–1.67	14.2–16.2	136–163
	Accuracy (%)	110.7	101.8	101.6	105.3
	Precision (%)	8.0	3.7	3.8	4.8

Table 2. Mean pharmacokinetic parameters obtained from 48 volunteers after administration of a 250 mg ticlopidine tablet formulation

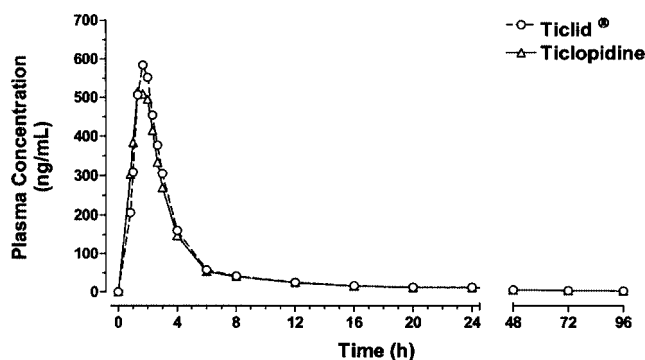
Pharmacokinetic parameter	Ticlid	Ticlopidine
AUC _{last} (ng h mL ⁻¹)		
Geometric mean	2248	2168
SD	1092	1180
AUC _{inf} (ng h mL ⁻¹)		
Geometric mean	2393	2311
SD	1158	1241
% AUC _{0–inf} extrapolated		
Median	5.85	6.14
Range	1.97–12.94	2.00–15.17
C _{max} (ng mL ⁻¹)		
Geometric mean	727	693
SD	356	357
K (h ⁻¹)		
Median	0.021	0.020
Range	0.010–0.068	0.010–0.126
T _{1/2} (h)		
Median	33.11	34.08
Range	10.12–67.69	5.52–71.84
T _{max} (h)		
Median	1.67	1.67
Range	1.00–3.00	0.83–3.00

Table 3. Geometric mean of the individual AUC_{last}, AUC_{0–inf} and C_{max} ratios (test/reference formulation), the respective 90% CIs and power

Ticlid/ticlopidine	96 h		
	Geometric mean	90% CI	Power
AUC _{last} % ratio	94.12	87.17–101.62	1.00
AUC _{0–inf} % ratio	94.40	87.55–101.77	1.00
C _{max} % ratio	93.09	84.84–102.12	0.98

terms of sensitivity and reproducibility were obtained using electrospray ionization and a 4.6 mm i.d. HPLC column.

Although it is well known that ticlopidine and clopidogrel are not stable at low pH, no perceivable degradation of

**Figure 6.** Ticlopidine plasma mean concentration vs time profiles obtained after the single oral administration of 250 mg of ticlopidine formulation.

either was observed under the described conditions. Therefore, we conclude that the time was insufficient for the decomposition of the analyte and IS.

Ticlopidine peak plasma concentration (C_{max}) values and the times taken for them to be achieved (T_{max}) were similar to those reported in the literature^{10,15} and equivalent between the formulations (Tables 2 and 3).

For future studies, we propose collection for 0–48 h instead of 0–96 h, since the AUC_{last} for the former period represents >90% of the latter.

CONCLUSION

The HPLC/MS/MS method described here for ticlopidine quantification in human plasma agrees with the requirements for high sensitivity, specificity and high sample throughput in pharmacokinetic assays such as bioequivalence studies.

Since the 90% CI for C_{max} and AUC ratios were all inside the 80–125% interval proposed by the US Food and Drug Administration,^{17,18} it was concluded that the ticlopidine formulation from Apotex do Brasil, Brazil, is bioequivalent to Ticlid formulation with respect to both the rate and the extent of absorption.

REFERENCES

- Bruno JJ. The mechanisms of action of ticlopidine. *Thromb. Res. Suppl.* 1983; 4: 59.
- Saltiel E, Ward A. Ticlopidine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in platelet-dependent disease states. *Drugs* 1987; 2: 222.

3. Gent M, Blakely JA, Easton JD, Ellis DJ, Hachinski VC, Harbison JW, Panak E, Roberts RS, Sicurella J, Turpie AG. The Canadian American ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet* 1989; **8649**(1): 1215.
4. Knudsen JB, Gormsen J. The effect of ticlopidine on platelet function in normal volunteers and in patients with platelet hyperaggregability *in vitro*. *Thromb. Res.* 1979; **16**: 663.
5. Feliste R, Delebassee D, Simon MF, Chap H, Defreyn G, Vallee E, Douste-Blazy L, Maffrand JP. Broad spectrum anti-platelet activity of ticlopidine and PCR 4099 involves the suppression of the effects of released ADP. *Thromb. Res.* 1987; **4**: 403.
6. Knudsen JB, Bastain W, Sefton CM, Allen JG, Dickinson JP. Pharmacokinetics of ticlopidine during chronic oral administration to healthy volunteers and its effects on antipyrine pharmacokinetics. *Xenobiotica* 1992; **5**: 579.
7. DiPerri T, Pasini FL, Frigerio C, Bardi P, Centini F, Messa GL, Ghezzi A, Volpi L. Pharmacodynamics of ticlopidine in man in relation to plasma and blood cell concentration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1991; **5**: 429.
8. Shah J, Fratis A, Ellis D, Murakami S, Teitelbaum P. Effect of food and antacid on absorption of orally administered ticlopidine hydrochloride. *J. Clin. Pharmacol.* 1990; **8**: 733.
9. Arnoux P, Sales Y, Mandray M, Lechat P, Berger Y, Cano JP. Quantitative high-performance liquid chromatographic, gas chromatographic, and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of ticlopidine in baboon plasma after solid-phase extraction. *J. Pharm. Sci.* 1991; **11**: 1092.
10. Shah J, Teitelbaum P, Molony B, Gabuzda T, Massey I. Single and multiple dose pharmacokinetics of ticlopidine in young and elderly subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1991; **6**: 761.
11. Itoh S, Suzuki S, Ando S, Funatsu Y, Yamazaki M, Tanabe K, Sawanoi M. Determination of ticlopidine in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 1987; **3**: 1304.
12. Dal Bo L, Verga F, Marzo A, Ambrosoli L, Poli A. Determination of ticlopidine in human plasma by high-performance liquid chromatography and ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B* 1995; **2**(665): 404.
13. Furlan G, Malusa N, Strohmayer A, Klugmann FB, Decorti G, Candussio L, Klugmann S. Optimised method for determination of ticlopidine in serum by high performance liquid chromatography. *Farmaco* 1996; **11**: 747.
14. Róna K, Ary K, Gachályi B, Klebovich I. Liquid chromatographic method for the determination of ticlopidine in human plasma. *J. Chromatogr. B* 1996; **693**: 393.
15. Desager JP, van Nieuwenhuyze Y, Dricot J, Berger Y, Harvenge C. Pharmacokinetic profile and bioavailability of a new galenic formulation of ticlopidine. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 1990; **4**: 247.
16. Lagana A, Bellagamba G, Ascenzo D, Gentili A, Marino A. Evaluation of ticlopidine in human serum and plaque by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 1997; **354**: 87.
17. US Food and Drug Administration. *Federal Register Part 320: Bioavailability and Bioequivalence Requirements*. FDA: Washington, DC, 1985; 154.
18. US Food and Drug Administration. *In vivo* bioequivalence guidances. *Pharmacopeial Forum* 1993; **19**: 6501.