



UNICAMP

Roberto Fernandes Moreira

DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE
MEDICAMENTOS CONTENDO FÁRMACOS DE AÇÃO CENTRAL

Campinas
2014



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ROBERTO FERNANDES MOREIRA

DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE
MEDICAMENTOS CONTENDO FÁRMACOS DE AÇÃO CENTRAL

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências na
área de concentração Clínica Médica.

ORIENTAÇÃO: PROF. DR. NEY CARTER DO CARMO BORGES

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR ROBERTO FERNANDES
MOREIRA, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. NEY CARTER DO CARMOS
BORGES.


Assinatura do Orientador


Ney Carter do C. Borges M.S., Ph.D.
FACC, FEBC, FACP, FAHA
Cardiologista - CRM 50.535

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

M813d Moreira, Roberto Fernandes, 1979-
Determinação do perfil farmacocinético de
medicamentos contendo fármacos de ação central /
Roberto Fernandes Moreira. -- Campinas, SP : [s.n.],
2015.

Orientador : Ney Carter do Carmo Borges.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Farmacocinética. 2. Equivalência terapêutica. 3.
Clorpromazina. 4. Imipramina. I. Borges, Ney Carter do
Carmo. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma:

Determination of drug pharmacokinetic profile containing drugs of central action

Palavras-chave em inglês:

Pharmacokinetics

Therapeutic equivalency

Chlorpromazine

Imipramine

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Ney Carter do Carmo Borges [Orientador]

José Pedrazzoli Junior

Francisco Hideo Aoki

Danilo Cesar Galindo Bedor

Wellington Ribeiro

Data de defesa: 18-12-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ROBERTO FERNANDES MOREIRA

ORIENTADOR(A): PROF(A). DR(A). NEY CARTER DO CARMO BORGES

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). NEY CARTER DO CARMO BORGES

2. PROF(A). DR(A). FRANCISCO HIDEO AOKI

3. PROF(A). DR(A). JOSÉ PEDRAZZOLI JUNIOR

4. PROF(A). DR(A). DANILO CESAR GALINDO BEDOR

5. PROF(A). DR(A). WELLINGTON RIBEIRO



The image shows five handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal line corresponding to a member of the board. The signatures are: 1. A signature that appears to be 'Ney Carter do Carmo Borges'. 2. A signature that appears to be 'Francisco Hideo Aoki'. 3. A signature that appears to be 'José Pedrazzoli Junior'. 4. A signature that appears to be 'Danilo Cesar Galindo Bedor'. 5. A signature that appears to be 'Wellington Ribeiro'.

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

**Data: 18 de dezembro de
2014**

Abstract

In the last decade, the evolution of the technical aspects of the Brazilian regulations in the area of medications, based on scientific principles, is unquestionable. The implementation of the specific laws and regulations have contributed to the improvement of manufacturing and quality assurance of medicines in the country, introducing concepts such as pharmaceutical equivalence, bioequivalence and bioavailability. Bioequivalence testing is critical to ensure that the two medications that have proved pharmaceutical equivalence will have the same bioavailability in the body, expressed in terms of the amount of absorbed drug and the speed of absorption using the dosage form provided. Analytical procedures described in this work are in accordance with the requirements of the FDA and ANVISA for the quantitation of drugs in pharmacokinetic studies in humans.

Here we describe the first method for the quantitation of chlorpromazine in human plasma using an ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled to an electrospray tandem triple quadrupole mass spectrometer in positive mode (UPLC-ES(+)-MS/MS). The analyte and the internal standard (IS) were extracted from human plasma by a liquid-liquid extraction with diethyl ether/dichloromethane (70/30, v/v) and chromatography was performed isocratically on an Aquity UPLC BEH C18 1.7 μm (50 mm x 2.1 mm i.d.) operating at 40°C. The mobile phase was a mixture of 65% water+1% formic acid and 35% of acetonitrile at a flow-rate of 0.5 mL/min. The lowest concentration quantified was 0.5ng/mL and a linear calibration curve over the range 0.5-200 ng/mL was obtained, showing intra-assay precisions from 2.4 to 5.8%, and inter-assay precisions from 3.6 to 9.9%. The intra-assay accuracies ranged from 96.9 to 102.5%, while the inter-assay accuracies ranged from 94.1 to 100.3%. This analytical method was applied in a relative bioavailability study in order to compare a test chlorpromazine 100 mg simple dose formulation versus a reference in 57 volunteers of both sexes.

The analytical method for quantification of ondansetron in human plasma described here offers advantages over previously reported using HPLC-MS/MS,

associated with shorter chromatographic analysis described and low plasma volume for extracting active. Human plasma samples were extracted by liquid-liquid extraction (LLE) using methyl tert-butyl ether and analyzed by LC-ESI-MS/MS. The limit of quantification was 0.2 ng/mL and the method was linear in the range 0.2-60 ng/mL. The intra-assay precisions ranged from 1.6 to 7.7%, while inter-assay precisions ranged from 2.1 to 5.1%. The intra-assay accuracies ranged from 97.5 to 108.2%, and the inter-assay accuracies ranged from 97.3 to 107.0%. The analytical method was applied to evaluate the relative bioavailability of two pharmaceutical formulations containing 8 mg of ondansetron each in 25 healthy volunteers using a randomized, two-period crossover design.

In addition, the analytical method for the quantification of imipramine in human plasma described here offers advantages over previously reported using UPLC-MS/MS, HPLC-MS/MS and HPLC-MS, with low limit of quantification associated with shorter chromatographic analysis described in the literature.

The analyte and the IS were extracted from human plasma by a liquid-liquid extraction with diethyl ether/dichloromethane (60/40, V/V) and analyzed by UPLC-ES+-MS/MS. Chromatography was performed isocratically on an UPLC BEH C18 1.7 Aquity One (100 mm ×2.1 mm i.d.) operating at 40°C. The mobile phase was a mixture of 65% water + 1% formic acid and 35% of acetonitrile at a flow-rate of 0.5 mL/min. The lowest concentration quantified was 0.1 ng/mL and a linear calibration curve over the range 0.1–20 ng/mL was obtained, showing intra-assay precisions from 0.8 to 5.8%, and inter-assay precisions from 2.1 to 5.1%. The intra-assay accuracies ranged from 95.0 to 105.4%, while the inter-assay accuracies ranged from 98.2 to 108.2%. This analytical method was applied in a relative bioavailability study in order to compare a test imipramine 25 mg simple dose formulation versus a reference tablet in 35 volunteers of both sexes. The study was conducted in an open randomized two-period crossover design and with a fourteen days washout period.

Since the 90% CI for ASC and C_{max} ratios were within the range of 80-125% for all studies, it was concluded that the test formulations of chlorpromazine,

imipramine and ondansetron are bioequivalent to the respective reference formulations with respect to both rate and extent of absorption.

Resumo

Na última década, a evolução dos aspectos técnicos da regulamentação brasileira na área de medicamentos, tendo como base princípios científicos, é inquestionável. A implantação das legislações contribuiu para o aprimoramento da fabricação e garantia de qualidade dos medicamentos no país, introduzindo conceitos tais como equivalência farmacêutica, biodisponibilidade e bioequivalência. O teste de bioequivalência é fundamental para garantir que dois medicamentos que comprovaram a equivalência farmacêutica apresentará o mesmo desempenho no organismo em relação à biodisponibilidade, expressa em termos da quantidade absorvida do fármaco, a partir da forma farmacêutica ministrada, e da velocidade do processo de absorção.

Os procedimentos analíticos descritos neste trabalho estão em conformidade com os requisitos do FDA e da ANVISA para a quantificação de drogas em estudos farmacocinéticos em humanos. Neste trabalho, descrevemos o primeiro método desenvolvido para a quantificação de clorpromazina em plasma humano utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo em tandem e electrospray em modo positivo (CLUE-ES(+)-EM/EM). O analito e o padrão interno (IS) foram extraídos do plasma humano pela técnica líquido-líquido com éter dietílico/diclorometano (70/30, V/V). A cromatografia foi conduzida isocriticamente num Aquity UPLC BEH C18 1,7 mm (50 mm x 2,1 mm di) operando a 40°C. A fase móvel foi uma mistura de 65% de água + 1% de ácido fórmico e 35% de acetonitrilo a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O limite de quantificação foi de 0,5ng/ml e uma curva de calibração linear 0,5-200ng/ml, mostrando precisão intra-ensaio de 2,4 a 5,8%, e precisão inter-ensaio foi de 3,6 a 9,9%. A exatidão intra-ensaio variou de 96,9 a 102,5%, enquanto a exatidão inter-ensaio variou de 94,1 a 100,3%. Este método de análise foi aplicado em um estudo de biodisponibilidade relativa, a fim de comparar uma formulação teste na dose de 100mg de clorpromazina contra uma formulação referência em 57 voluntários de ambos os sexos.

Além disso, descrevemos o método analítico para quantificação de ondansetrona em plasma humano utilizando CLAE-EM/EM, associado ao menor tempo de análise cromatográfica descrita e baixo volume de plasma para extração do ativo. Amostras de plasma humano foram extraídas com éter metil-terc-butílico e analisadas por CLAE-ES-EM/EM. O limite de quantificação foi de 0,2ng/mL e o método foi linear no intervalo de 0,2-60ng/ml. A precisão intra-ensaio ficou entre 1,6 a 7,7%, enquanto que a precisão inter-ensaio variou de 2,1 a 5,1%. As exatidões intra-ensaio variaram de 97,5 a 108,2% e a exatidão inter-ensaio variaram de 97,3 a 107,0%. Este método analítico foi utilizado em um estudo de biodisponibilidade relativa de duas formulações farmacêuticas contendo 8 mg de ondansetrona cada em 25 voluntários saudáveis, usando, o delineamento cruzado em dois períodos.

Finalmente, o método analítico para quantificação de imipramina utiliza CLUE-EM/EM, apresentando baixo limite de quantificação associado ao menor tempo de análise cromatográfica em comparação aos trabalhos descritos na literatura. A imipramina e o IS foram extraídos a partir de plasma humano utilizando éter dietílico/diclorometano (60/40, V/V) e analisadas por CLUE-ES+EM/EM. A cromatografia foi realizada em modo isocrático em um CLUE BEH C18 1.7 Aquity One (100 mm x 2,1 mm di) operando a 40°C. A fase móvel era composta de uma mistura de 65% de água, 1% de ácido fórmico e 35% de acetonitrilo bombeada a uma taxa de fluxo de 0,5mL/min. O limite de quantificação foi de 0,1ng/ml com linearidade no intervalo de 0,1 a 20ng/mL. O método mostrou precisão intra-ensaio de 0,8 a 5,8% e precisão inter-ensaio de 2,1 a 5,1%. As exatidões intra-ensaio variaram de 95,0 a 105,4%, enquanto a exatidão inter-ensaio variou de 98,2 a 108,2%. Este método de análise foi aplicada em um estudo de biodisponibilidade relativa entre uma formulação teste com 25mg de imipamine contra um comprimido da formulação referência em 35 voluntários de ambos os sexos.

Este trabalho descreve três estudos de bioequivalência dos ativos clorpromazina, ondansetrona e imipramina, sendo cada um dos estudos com delineamento aberto, aleatorizado, cruzado de dois períodos. Uma vez que o IC

de 90% para as razões de C_{max} e ASC ficaram dentro do intervalo de 80-125% em todos os estudos, concluiu-se que as formulações em teste de clorpromazina, ondansetrona e imipramina são bioequivalentes às respectivas formulações de referência no que diz respeito tanto à taxa e extensão como de absorção.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais da Indústria Farmacêutica	1
1.2 A infraestrutura da Indústria Farmacêutica no Brasil	2
1.3 Classificação dos medicamentos segundo sua forma de comercialização	3
1.4 Os medicamentos genéricos	5
1.5 Venda de genéricos	8
1.6 Fármacos estudados	12
1.6.1. Clorpromazina	12
1.6.2. Ondansetrona	18
1.6.3. Imipramina	21
1.7 Estudos de Bioequivalência	24
1.7.1. Número de voluntários	27
1.7.2. Sexo dos voluntários	27
1.7.3. Tempos de coleta	28
1.7.4. Forma farmacêutica	29
1.7.5. Efeito da alimentação	29
1.7.6. O intervalo entre as administrações	29
1.7.7. Metodologia analítica	30
1.7.8. Fármaco e/ou metabólito ativo	31
1.7.9. Etapas de um estudo de bioequivalência	32
1.7.10. Medidas farmacocinéticas	32
2. OBJETIVO	35
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. CAPÍTULO 1 - CLORPROMAZINA	37
3.1 EXPERIMENTAL	37
3.1.1. Materiais	37
3.1.2. Padrões da curva de calibração e controles de qualidade	37
3.1.3. Preparo das amostras	38
3.1.4. Condições cromatográficas	38

3.1.5.	Condições da Análise por Espectrometria de Massas.....	39
3.1.6.	Linearidade.....	39
3.1.7.	Supressão Iônica.....	41
3.1.8.	Recuperação.....	41
3.1.9.	Precisão e Exatidão.....	42
3.1.10.	Sensibilidade.....	42
3.1.11.	Estabilidade.....	42
3.1.12.	Estudo Farmacocinético.....	43
3.1.13.	Análise Estatística.....	45
3.2	RESULTADOS.....	46
3.2.1.	Linearidade e Especificidade.....	46
3.2.2.	Recuperação.....	50
3.2.3.	Precisão e Exatidão.....	50
3.2.4.	Estabilidade.....	51
3.2.5.	Estudo Farmacocinético.....	53
3.3	DISCUSSÃO.....	56
3.4	CONCLUSÃO.....	57
4.	CAPÍTULO 2 - ONDANSETRONA.....	59
4.1	EXPRIMENTAL.....	59
4.1.1.	Materiais.....	59
4.1.2.	Padrões de calibração e controles de qualidade.....	59
4.1.3.	Preparação de amostras.....	60
4.1.4.	Condições cromatográficas.....	60
4.1.5.	Condições da Análise por Espectrometria de Massas.....	61
4.1.6.	Linearidade.....	61
4.1.7.	Supressão Iônica.....	63
4.1.8.	Recuperação.....	64
4.1.9.	Precisão e exatidão.....	64
4.1.10.	Sensibilidade.....	65
4.1.11.	Estabilidade.....	65
4.1.12.	Estudo Farmacocinético.....	66
4.1.13.	Análise Estatística.....	67
4.2	RESULTADOS.....	68
4.2.1.	Linearidade e especificidade.....	68

4.2.2.	Recuperação	68
4.2.3.	Precisão e Exatidão	70
4.2.4.	Estabilidade	70
4.2.5.	Estudo Farmacocinético	73
4.3	DISCUSSÃO	76
4.4	CONCLUSÃO	78
5.	CAPÍTULO 3 - IMIPRAMINA	79
5.1	EXPRIMENTAL	79
5.1.1.	Materiais	79
5.1.2.	Padrões de calibração e controles de qualidade	79
5.1.3.	Preparação de amostras.	80
5.1.4.	Condições cromatográficas	80
5.1.5.	Condições da Análise por Espectrometria de Massas.....	81
5.1.6.	Linearidade	81
5.1.7.	Supressão Iônica	83
5.1.8.	Recuperação	83
5.1.9.	Precisão e exatidão	84
5.1.10.	Sensibilidade	84
5.1.11.	Estabilidade.....	84
5.1.12.	Estudo Farmacocinético	85
5.1.13.	Análise Estatística	87
5.2	RESULTADOS	87
5.2.1.	Linearidade e Especificidade	87
5.2.2.	Recuperação	93
5.2.3.	Precisão e Exatidão	93
5.2.4.	Estabilidade	94
5.2.5.	Estudo Farmacocinético	95
5.3	DISCUSSÃO	98
5.4	CONCLUSÃO	102
6.	DISCUSSÃO GERAL	103
7.	CONCLUSÃO GERAL	109
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
9.	ANEXOS	125
9.1	APROVAÇÕES DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	125

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha Família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e saúde para realizar mais essa gratificante experiência.

Ao meu filho Pedro, por me fazer muito feliz, com a certeza que lhe farei o melhor desta vida, ensinando e dando exemplo de como ser um homem educado e do bem.

A minha esposa Daniela pelo amor, confiança e companheirismo.

Aos meus pais Roberto e Teresa pelo apoio incondicional ao longo da vida.

A minha grande família pela compreensão de algumas ausências.

Ao Dr. Ney Carter, pela orientação neste trabalho, crédito e oportunidade.

Aos membros titulares da banca examinadora, Prof. Dr. Francisco Aoki, Prof. Dr. José Pedrazzoli Junior, Prof. Dr. Danilo Bedor e Prof. Dr. Wellington Ribeiro pela presença e pelos ensinamentos compartilhados na defesa.

A Equipe da Synchronphar, em especial ao Dr. Ney Carter e ao Sandro Evandir de Oliveira pelo suporte e disponibilidade.

Ao amigo José Luiz Donato pelo conhecimento compartilhado para realização deste trabalho.

Ao Laboratório Cristália, em especial ao Dr. Ogari Pacheco pela permissão e uso dos dados.

A todos os meus amigos pela amizade e todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Você erra todo arremesso que não tenta!”
Michael Jordan

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura química do cloridrato de clorpromazina. Fórmula molecular $C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$ e massa molecular de 355.33 g/mol.....13
- Figura 2. Estrutura química da ondansetrona. Fórmula molecular $C_{18}H_{19}N_3O$ e massa molecular de 293.4 g/mol.....19
- Figura 3. Estrutura química da imipramina. Fórmula molecular $C_{18}H_{19}N_3O$ e massa molecular de 293.4 g/mol.22
- Figura 4. Espectro da varredura das massas de clorpromazina (A) e ciclobenzaprina (B).....40
- Figura 5. Cromatogramas do Monitoramento de Respostas Múltiplas (MRM) das amostras de plasma humano enriquecidas com clorpromazina ou ciclobenzaprina. Os painéis superiores mostram o canal de controle para a transição clorpromazina (m/z 319,1 > 85,9) na concentração do LIQ (0,5 ng/mL) e os painéis inferiores mostram o canal de controle para a transição da ciclobenzaprina (m/z 276,2 > 57,9). (A) amostras de plasma branco enriquecidas com ciclobenzaprina, (B) amostras de plasma branco enriquecidas com clorpromazina e ciclobenzaprina.....47
- Figura 6. Especificidade da resposta e avaliação da presença de picos de resultantes de interferência no tempo de retenção para a clorpromazina e ciclobenzaprina após corrida cromatográfica em CLUE. Cromatogramas MRM de amostras de plasma branco para os canais de clorpromazina (painel superior) e ciclobenzaprina (painel inferior) utilizando os seguintes lotes de plasma: (A) hiperlipêmicos e (B) da amostra de plasma hemolisado. .48
- Figura 7. Cromatograma representativo de amostras de um mesmo voluntário mostrando a análise da amostra coletada antes da administração (A) e da amostra coletada 20 minutos após a administração de formulação referência (B). Painéis superiores mostram o canal de monitoramento para a transição de clorpromazina e os painéis inferiores mostram o canal de monitoramento para a transição da ciclobenzaprina.....49
- Figura 8. Gráfico da média das concentrações plasmáticas de clorpromazina versus tempo de coleta das amostras após administração das formulações teste ou referência contendo 100 mg de clorpromazina.54
- Figura 9. Espectro da varredura das massas de ondansetrona (A) e ondansetrona-D3 (B).....62
- Figura 10. Rotas de fragmentação de ondansetrona e ondansetrona-D3. As rotas de fragmentação foram propostas de acordo com os resultados das transições obtidas: m/z 294.2 → 170.0 e m/z 294.2 → 184.0 para ondansetrona; m/z 297.2 → 173.2 e 297.2 → 187.0 para ondansetrona-D3.....63
- Figura 11. Cromatogramas do Monitoramento de Respostas Múltiplas (MRM) das amostras de plasma humano enriquecidas com ondansetrona ou ondansetrona-D3. Os painéis superiores mostram o canal de controle para a transição ondansetrona (m/z 294.2 → 170.0 e m/z 294.2 → 184.0) e os painéis inferiores mostram o canal de controle para a transição da ondansetrona-D3 (m/z 297.2 → 173.2 e 297.2 → 187.0). (A) amostras de plasma branco

enriquecidas com ondansetrona-D3, (B) amostras de plasma branco enriquecidas com ondansetrona na concentração do LIQ (0,2 ng/mL) e ondansetrona-D3.....	69
Figura 12. Gráfico da média das concentrações plasmáticas de ondansetrona versus tempo de coleta das amostras após administração das formulações teste ou referência contendo 8 mg de ondansetrona. O painel interno mostra a representação dos resultados em escala semi-log.....	74
Figura 13. Espectro da varredura das massas de imipramina (A) e ciclobenzaprina (B).....	82
Figura 14. Cromatogramas do Monitoramento de Respostas Múltiplas (MRM) das amostras de plasma humano enriquecidas com (A) imipramina na concentração do LIQ (0,5 ng/mL) (m/z 281,1 > 85,8, painel superior) ou (B) ciclobenzaprina (m/z 276,2 > 57,9, painel inferior)..	89
Figura 15. Supressão iônica da imipramina (A) ou ciclobenzaprina (B). A imipramina foi monitorada na transição m/z 281,1 > 85,8 e a ciclobenzaprina na transição m/z 276,2 > 57,9.	90
Figura 16. Especificidade da resposta após corrida cromatográfica em CLUE. MRM para os canais de imipramina (painel superior) e ciclobenzaprina (painel inferior) utilizando os seguintes lotes de plasma: (A) hiperlipêmicos e (B) da amostra de plasma hemolisado.	91
Figura 17. Cromatograma representativo de um mesmo voluntário mostrando amostra coletada antes (A) e 20 minutos após a administração de formulação referência (B). Painéis superiores mostram o monitoramento para a transição de imipramina e os painéis inferiores para a transição da ciclobenzaprina.....	92
Figura 18. Gráfico da média das concentrações plasmáticas de imipramina versus tempo de coleta das amostras após administração das formulações teste ou referência contendo 25 mg de imipramina.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais produtos genéricos aprovados entre 2002-2010 no mundo.....	10
Tabela 2. Os medicamentos genéricos mais vendidos no Brasil entre fevereiro de 2013 e de 2014	12
Tabela 3. grupos de antipsicóticos fenotiazínicos.....	14
Tabela 4. Precisão e exatidão da quantificação de clorpromazina em plasma humano. Os resultados foram obtidos durante os ensaios de validação do método analítico com as amostras de controle de qualidade (CQ) incluindo o limite inferior de quantificação (LIQ).	51
Tabela 5. Teste de estabilidade da clorpromazina em plasma humano	52
Tabela 6. Média aritmética dos parâmetros farmacocinéticos obtidas após administração das formulações teste e referência em comprimido com 100 mg de clorpromazina em 57 voluntários.....	55
Tabela 7. Média geométrica das razões individuais de ASC ₀ -t, ASC ₀ -inf e C _{max} (teste/referência) e os IC 90% correspondentes.....	55
Tabela 8. Precisão e exatidão da quantificação de ondansetrona em plasma humano. Os resultados foram obtidos durante os ensaios de validação do método analítico com as amostras de controle de qualidade (CQ) incluindo o limite inferior de quantificação (LIQ).	71
Tabela 9. Teste de estabilidade da ondansetrona em plasma humano	72
Tabela 10. Média aritmética dos parâmetros farmacocinéticos obtidas após administração das formulações teste e referência em comprimido com 8 mg de ondansetrona em 25 voluntários.....	75
Tabela 11. Média geométrica das razões individuais de ASC ₀ -t, ASC ₀ -inf e C _{max} (teste/referência) e os IC 90% correspondentes.....	75
Tabela 12. Precisão e exatidão da quantificação de imipramina em plasma humano. Os resultados foram obtidos durante os ensaios de validação do método analítico com as amostras de controle de qualidade (CQ) incluindo o limite inferior de quantificação (LIQ).....	94
Tabela 13. Teste de estabilidade da imipramina em plasma humano.....	95
Tabela 14. Média aritmética dos parâmetros farmacocinéticos obtidas após administração das formulações teste e referência em comprimido com 25 mg de imipramina em 35 voluntários.....	97
Tabela 15. Média geométrica das razões individuais de ASC ₀ -t, ASC ₀ -inf e C _{max} (teste/referência) e os IC 90% correspondentes.....	98

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ASC0-INF	Área sob a curva de concentração da droga versus tempo do tempo 0 (zero) extrapolada ao infinito, calculada pelo método linear-log trapezoidal. $ASC[0-\infty] = ASC[0-t] + Ct/Ke$, onde Ct é a última concentração quantificável;
ASC0-t	Área sob a curva de concentração da droga versus tempo do tempo 0 (zero) ao tempo da última concentração acima do Limite Inferior de Quantificação (LIQ) comum a todos os períodos, calculada pelo método linear-log trapezoidal;
BLIQ	Abaixo do limite de quantificação
CI	Intervalo de confiança
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.
CLUE-EM/EM	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas.
Cmax	Concentração correspondente ao T_{max} .
Ct	Última concentração mensurável
CV	Coeficiente variação
EMA	European Medicines Agency - Agência Europeia de Medicamentos

FDA	Food and Drug Administration - Agência regulatória de medicamentos dos EUA
IFA	Insumo farmacêutico ativo
Ke	Constante de taxa de eliminação terminal determinada por análise de regressão log-linear
Ln	Logaritmo natural
LIQ	Limite inferior de quantificação
Média	Média aritmética
MIP	Medicamento isento de prescrição
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
N	Número (tamanho amostral)
OTC	“Over the counter” – medicamento isento de prescrição
P	Período
RMN	Ressonância magnética nuclear
DP	Desvio padrão
T1/2	Meia vida de eliminação plasmática= $\ln(2)/K_e$
Tmax	Tempo da concentração máxima
Washout	Período necessário para que a concentração de um medicamento seja negligenciável, depois de suspensa a terapêutica. Em estudos farmacocinéticos é o período entre as duas administrações.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais da Indústria Farmacêutica

A cadeia farmacêutica é responsável pela transformação de intermediários químicos e extratos vegetais em princípios ativos farmacêuticos, também denominados de Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), os quais, em seguida, são convertidos em medicamentos para tratamento, prevenção de doenças e para fins de diagnóstico no ser humano. As transformações ao longo dessa cadeia ocorrem por meio de processos físicos e químicos, notadamente pela síntese química orgânica. Contudo, também é possível a obtenção de medicamentos pela rota biotecnológica, alternativa que tem ganhado destaque no mercado farmacêutico mundial (1).

A Comissão Econômica para a América Latina e o Caribe (Cepal) elaborou uma proposta de classificação dos estágios evolutivos de uma indústria farmacêutica, tornando mais claro o entendimento da estrutura da cadeia produtiva destas indústrias. Nesta proposta, a cadeia produtiva é dividida em quatro estágios (1):

- Pesquisa e desenvolvimento
- Produção de IFAs
- Produção de medicamentos
- Marketing e comercialização

As grandes multinacionais da indústria farmacêutica operam nos quatro estágios e estão distribuídas pelos mais diversos países, de acordo com a infraestrutura existente e com suas estratégias globais (2). No Brasil, a maioria das subsidiárias das multinacionais opera apenas nos terceiro e quarto estágios e apenas algumas possuem operações no segundo (3). Nos últimos anos, houve poucas tentativas de desenvolvimento de projetos referentes ao primeiro estágio, motivadas pelos benefícios associados ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico Industrial (PDTI) (3). As empresas de capital exclusivamente nacional, na sua grande maioria, também operam apenas nos terceiro e quarto

estágios, existindo algumas no segundo e são raras as que atuam no primeiro estágio (1).

1.2 A infraestrutura da Indústria Farmacêutica no Brasil

O forte crescimento do mercado farmacêutico em conjunto com melhoria dos padrões da legislação específica tornou o Brasil um foco de investimentos provenientes de empresas multinacionais e nacionais. O Brasil representa um mercado emergente chave para as empresas farmacêuticas interessados para compensar desaceleração de vendas nos diversos outros mercados ocidentais. Normalmente, a estratégia para aumentar a presença no mercado envolve o lançamento de novos produtos (4).

Várias empresas do mercado ocidental estão fazendo atualmente um esforço para cortar custos, reduzindo rapidamente sua força de trabalho ou encerramento a atividade de diversas fábricas em muitos países. No entanto, no mercado brasileiro a maioria das empresas farmacêuticas tem investido consideravelmente na ampliação da sua infraestrutura. De fato, das 10 melhores empresas do país, apenas a Merck & Co. anunciou recentemente o encerramento de uma fábrica, mas isso foi consequência do seu plano de integração após sua fusão com a Schering-Plough (4).

Dentre as 10 maiores empresas no Brasil, destacam-se os investimentos realizados para aumentar a presença da francesa Sanofi que em abril de 2009 comprou a paulista Medley, então líder do mercado de genéricos, por 1,5 bilhão de reais (4). A Novartis também injetou mais de um bilhão de reais em suas operações no país para estabelecer uma fábrica de vacina próxima à cidade do Recife. A empresa japonesa Takeda anunciou em fevereiro de 2010 que tinha criado uma nova subsidiária no Brasil, com sede em São Paulo, representando a sua primeira incursão direta na América Latina (5).

Ilustrando ainda o desejo de algumas indústrias farmacêuticas de diversificar seu portfólio em áreas de alto crescimento como OTC (do inglês *Over The Counter*) e genéricos, a Amgen, gigante americana e uma das principais empresas de biotecnologia do mundo, adquiriu a empresa farmacêutica Bergamo em abril de

2011. A Bergamo possuía um parque industrial no Estado de São Paulo e havia se consolidado como uma importante fornecedora de medicamentos para o setor hospitalar no Brasil, principalmente em medicamentos oncológicos. A receita bruta da Bergamo em 2010 foi de US\$80 milhões e desde 2007 vem crescendo a uma taxa anual de 19%. De acordo com os termos da operação, a Amgen adquiriu a propriedade total da Bergamo pelo valor aproximado de US\$215 milhões (6).

Outras farmacêuticas internacionais intensificaram suas aquisições no Brasil, como a aquisição da fabricante de medicamentos genéricos Multilab pela Takeda em março 2012 e a compra da Meizler pela UCB (*Union chimique belge*) em maio de 2012 (4). A Takeda pagou R\$ 540 milhões pela aquisição da Multilab e tornou-se uma das dez maiores companhias farmacêuticas que atuam no Brasil. A UCB adquiriu, inicialmente, 51% do comando da Meizler e anunciou que pretende incorporar ao portfólio de produtos da Meizler UCB, parte de seus medicamentos dedicados a doenças severas dos sistemas imunológico e nervoso central.

1.3 Classificação dos medicamentos segundo sua forma de comercialização

Os medicamentos podem ser agrupados segundo a forma que são vendidos diretamente ao consumidor final nas farmácias, ou seja, existem aqueles que necessitam de prescrição médica para sua aquisição e aqueles que são vendidos livremente, sem a necessidade de prescrição. Pela força da lei, os medicamentos que necessitam de prescrição médica não podem ter seu *marketing* voltado para a população em geral. No Brasil, esses medicamentos são controlados por tarjas vermelha ou preta e a propaganda é voltada para publicações especializadas, focando apenas o médico, através de profissionais do *marketing* dos laboratórios farmacêuticos (3).

Já os ditos de venda livre, também conhecidos como OTC, ou medicamentos isentos de prescrição (MIP's), têm seu *marketing* livre na mídia. Esses medicamentos tratam de sintomas leves como febre, tosse, dor de cabeça, aftas, dores de garganta, assaduras, hemorroidas, congestão nasal e azia (7).

Ainda é possível dividir os medicamentos em categorias segundo as normas sanitárias às quais estão sujeitos. Atualmente, a legislação vigente no Brasil permite a existência de três classes de medicamentos submetidas a normas específicas, conforme apresentado a seguir (3, 8).

Medicamento de referência: é, ou foi, um medicamento inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no país, cujas eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente pelo órgão federal competente, por ocasião do registro. Pode ter patente ainda válida ou já expirada (3, 8).

Medicamento similar: é aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica do medicamento de referência, como registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária. Pode diferir somente em características relativas a tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca (3). Em 2014, por meio da RDC 58/2014, que definiu as medidas a serem adotadas junto à Anvisa pelos titulares de registro de medicamentos para a intercambialidade de medicamentos similares com o medicamento de referência (3, 8, 9).

Medicamento genérico: é um medicamento similar a um produto de referência, que pretende ser intercambiável com este. Normalmente, é produzido e lançado no mercado após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade do medicamento de referência. A condição de intercambiabilidade é assegurada através da obrigatoriedade da execução de testes de bioequivalência, ou biodisponibilidade relativa, efetuado em entidades certificadas pelo órgão federal responsável pela vigilância sanitária (3, 8).

Medicamentos biológicos: são moléculas complexas de alto peso molecular obtidas a partir de fluidos biológicos, tecidos de origem animal ou procedimentos biotecnológicos por meio de manipulação ou inserção de outro material genético (tecnologia do DNA recombinante) ou alteração dos genes que ocorre devido à irradiação, produtos químicos ou seleção forçada.

Medicamentos específicos: esta categoria é composta por:

- As soluções parenterais de grande e pequeno volume, parenterais ou não, tais como: água para injeção, soluções de glicose, cloreto de sódio, demais compostos eletrolíticos ou açúcares;
- Opoterápicos;
- Os medicamentos à base de vitaminas e/ou minerais e/ou aminoácidos, isoladas ou associadas entre si, com pelo menos um dos componentes acima dos limites nutricionais estabelecidos pela Resolução - RDC nº269, de 22 de setembro de 2005 (10).

1.4 Os medicamentos genéricos

Quando um medicamento de referência perde sua patente, os laboratórios e as indústrias farmacêuticas que produzem genéricos submetem processos solicitando autorização para produzirem cópias desse medicamento de referência denominadas de medicamentos genéricos. Cabe ressaltar que nenhum genérico pode ser comercializado antes que o órgão regulador – *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) no Brasil – aprove os testes que demonstrem que este medicamento tem o mesmo desempenho que o medicamento de referência, possibilitando assumir que eles são intercambiáveis e terão efeitos terapêuticos equivalentes (11).

Durante muito tempo a indústria farmacêutica deixou de perceber a importância da disponibilidade biológica das substâncias a partir das formas farmacêuticas. Para os profissionais responsáveis pelas formulações bastava que fossem cumpridas as especificações pré-determinadas nos testes físico-químicos tradicionais (12).

Com o intuito de assegurar a oferta de medicamentos de qualidade e de baixo custo ao mercado e de fomentar o acesso da população a esses produtos, foram estabelecidos, em 1999, os medicamentos genéricos (8). A regulamentação da Lei dos Genéricos por meio de uma Resolução da Diretoria Colegiada da

ANVISA em 1999 possibilitou a introdução de conceitos nunca antes empregados para o registro de um medicamento no Brasil, como por exemplo, a equivalência farmacêutica (comprovada por ensaios *in vitro*) e a bioequivalência (comprovada por ensaios *in vivo*). Desta forma, a intercambiabilidade entre o genérico com o medicamento de referência é assegurada através dos testes de equivalência farmacêutica e de bioequivalência (13) e podemos afirmar que, devido a estas exigências e o rigor exigido nos estudos citados acima, a Lei dos Genéricos estabeleceu um novo padrão para o desenvolvimento e o registro de medicamentos no país.

O amplo intervalo entre a primeira legislação sobre a obrigatoriedade da utilização da denominação genérica e a efetiva implementação da política de medicamentos genéricos no Brasil (de 1993 a 1999) deveu-se, em parte, à existência no mercado brasileiro de inúmeros medicamentos similares ao medicamento de referência, comercializados por diferentes laboratórios. Essas empresas, buscando a manutenção de seus produtos no mercado, só passariam a investir no desenvolvimento de produtos genéricos após o vencimento de seus registros, retardando assim a efetiva implantação dos genéricos.

Os casos de falsificação de medicamentos no mercado nacional, notadamente em 1998 e 1999, geraram um clamor pela segurança e qualidade de produtos relacionados à saúde. Nesse cenário, contribuindo efetivamente para estabelecer um contexto social e político favorável às mudanças causadas pelas regulamentações técnicas já mencionadas, foi criada a ANVISA, com a missão de proteger e promover a saúde da população (14), sendo que uma de suas primeiras ações foi a publicação da Lei dos Genéricos, como parte da Política Nacional de Medicamentos, voltada ao estímulo da concorrência e da variedade de oferta de medicamentos no mercado, à melhoria da qualidade de todos os medicamentos, à redução dos preços e, especialmente, à facilitação do acesso aos tratamentos terapêuticos por parte da população (8, 14).

Cabe ressaltar que, no período compreendido entre os anos de 1976 e 1999, a legislação brasileira permitia às empresas fabricantes definirem elas próprias qual seria o medicamento de referência para o registro de seus similares.

Entretanto, não havia exigência de comprovação da equivalência terapêutica do similar em relação ao medicamento considerado como referência. Era também permitido o registro de formas farmacêuticas e dosagens diferentes em relação ao suposto medicamento de referência, havendo, ainda, casos de formulações distintas, o que deu origem ao registro de muitas alternativas farmacêuticas (medicamentos que diferem do medicamento de referência em relação a um ou mais dos seguintes itens: base, sal ou éster do fármaco, dosagem, forma farmacêutica). Em consequência, até a publicação de uma lei que regulou os direitos e as obrigações relativos à propriedade industrial (15), foram registradas inúmeras especialidades contendo o mesmo fármaco, comercializadas com diversos nomes comerciais por diferentes laboratórios (14-16).

Além disso, após a publicação da regulamentação técnica para o registro de medicamentos genéricos, tornou-se inconcebível a existência de critérios distintos para o registro de medicamentos similares no país. Isso acelerou o processo de criação da regulamentação técnica que exige comprovação da equivalência terapêutica entre o medicamento similar e o medicamento de referência indicado pela ANVISA, tanto para as novas solicitações de registro (RDC 133/ 2003) (17), como para os similares já registrados (RDC 134/ 2003) (18). De fato, a experiência adquirida com o registro dos medicamentos genéricos tornou viável a publicação da RDC 134/ 2003, segundo a qual os fabricantes de similares são obrigados a cumprir os requisitos de equivalência farmacêutica e de biodisponibilidade relativa, de acordo com um cronograma elaborado considerando-se o conceito de risco sanitário (cronograma de adequação) (18).

Atualmente, existem dois tipos de similares no mercado brasileiro de medicamentos: aqueles cujos registros já estão de acordo com a nova legislação e aqueles que ainda estão no processo de adequação, que ocorre por ocasião da renovação do registro sanitário. Segundo o referido cronograma, estima-se que até o final de 2014 todos os fabricantes de medicamentos similares já terão atendido aos critérios de adequação (14).

No Brasil, como na Europa e nos Estados Unidos, a política de incentivo ao registro e ao uso de genéricos tem-se mostrado eficaz na regulação do preço dos medicamentos, favorecendo o direito de escolha do consumidor. Ao mesmo tempo, fornece uma alternativa aos profissionais de não prescreverem apenas pelos nomes comerciais.

1.5 Venda de genéricos

Medicamentos genéricos são obrigados a entrar no mercado com preço 35% menor do que o medicamento de referência. No entanto, devido a pressões do mercado os preços podem ser em média de 52% menor do que os seus homólogos de marca.

A venda de medicamentos genéricos no Brasil é responsável por 25,2% do mercado total de prescrições e exibiu crescimento anual de 42,5% em comparação com 18,8% para os similares, que responderam por 33,8% do mercado de prescrição em 2011. Medicamentos de marca, que representaram 40,8% do mercado de prescrição, mostrou a menor taxa de crescimento observada de apenas 7,6% no mesmo ano (4). Uma pesquisa recente da Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos (Pró Genéricos) mostrou que a maioria dos medicamentos prescritos no País já são genéricos. O estudo gerou um ranking dos 20 medicamentos mais prescritos entre fevereiro de 2013 e o mesmo mês de 2014, sendo 13 genéricos, ou seja, 65% do total (19).

Com um crescimento bastante acima de outros setores da economia, o mercado farmacêutico brasileiro pelo canal farmácia saltou de R\$ 27,7 bilhões em 2010 para R\$ 40,3 bilhões em 2014, considerando o período de 12 meses móveis até setembro. Cerca de 76,30 bilhões de doses foram comercializadas em 2010, número que cresceu para 121,63 bilhões em 2014.

Em 2005 a venda de genéricos nos EUA aumentou mais de 20% devido as cópias do Allegra (fexofenadina) e Duragesic (fentanilo). Já em 2010, as vendas foram alavancadas pelo lançamento das versões genéricas do Aricept (donepezil), Flomax (tansulosina), Lovenox (enoxaparina) e Effexor XR (venlafaxina) (20).

O mercado farmacêutico brasileiro é o segundo maior na América Latina, ficando atrás apenas do México (21). A demanda crescente e a moeda local forte têm inflado o setor farmacêutico local em dólar. Em termos de genéricos, o Brasil tem o maior mercado dentro da América Latina, se posicionando entre os dez maiores do mercado mundial de produtos farmacêuticos. O crescente estímulo para o uso de genéricos em hospitais tem sido outro fator que tem impulsionado o crescimento de genéricos no Brasil, principalmente para o tratamento de doenças crônicas (21).

Estimativas do tamanho do mercado de genéricos no Brasil são pouco precisas, mas o mercado de genéricos em 2011 foi estimado em US\$ 5,2 bilhões (aproximadamente 11 bilhões de reais), de acordo com a associação da indústria Pró Genéricos. De acordo com a ANVISA, foram registradas 3.300 formulações de genéricos no Brasil. A Tabela 1 apresenta os principais medicamentos genéricos aprovados no mundo.

O mercado de genéricos brasileiro é dominado por empresas nacionais, sendo que 80% do mercado estão nas mãos dos quatro mais importantes: EMS, Medley (adquirida pela Sanofi em 2009), Aché e Eurofarma (Relatórios Foco, 2007). Historicamente, a melhor estratégia para as empresas internacionais entrarem no mercado de genéricos brasileiro é através da aquisição de uma empresa nacional, exemplificada pela aquisição recente da de uma das maiores fabricantes de medicamentos do Brasil pela Sanofi. Como consequência desta aquisição, a Sanofi tornou-se a maior indústria farmacêutica do Brasil em vendas.

Tabela 1. Principais produtos genéricos aprovados entre 2002-2010 no mundo.

Generico	Nome/Marca	Detentor da Patente	Ano
Isotretinoína	Accutane®	Roche	2002
Metformina	Glucophage®	Bristol-Myers Squibb	2002
Cefuroxime	Ceftin®	GlaxoSmithKline (GSK)	2002
Paroxetina	Paxil®	GSK	2003
Gabapentina	Neurontin®	Pfizer	2003
Mirtazapina	Remeron®	Organon	2003
Quinapril	Accupril®	Pfizer	2003
Fluconazol	Diflucan®	Pfizer	2004
Benazepril	Lotensin®	Novartis	2004
Ciprofloxacina	Cipro®	Bayer	2004
Ribavirina	Rebetol®	Schering Plough	2004
Metformina ER	Glucophage XR®	Bristol-Myers Squibb	2004
Azitromicina	Zithromax®	Pfizer	2005
Fentanila	Duragesic®	Ortho-McNeill	2005
Fexofenadina	Allegra®	Sanofi-Aventis	2005
Levofloxacina	Levaquin®	Ortho-McNeill	2005
Ramipril	Altace®	King Pharmaceuticals	2005
Zidovudina	Retrovir®	GSK	2005
Gabapentina	Neurontin®	Pfizer	2006
Meloxicam	Mobic®	Boehringer-Ingelheim	2006
Ondansetrona	Zofran®	GSK	2006
Pravastatina	Pravachol®	Bristol-Myers Squibb	2006
Simvastatina	Zocor®	Merck & Co	2006
Zonisamida	Zonegran®	Dainippon	2006
Amlodipina	Norvasc®	Pfizer	2007
Carvedilol	Coreg®	GSK	2007
Granisetrona	Kytril®	Roche	2007
Setralina	Zoloft®	Pfizer	2007
Terbinafina	Lamisil®	Novartis	2007
Zolpidem	Ambien®	Sanofi-Aventis	2007
Divalproato	Depakote®	Abbott Laboratories	2008
Stavudina	Zerit®	Bristol-Myers Squibb	2008
Zaleplona	Sonata®	King Pharmaceuticals	2008
Sumatriptana	Imitrex®	GSK	2009
Topiramato	Topamax®	Ortho-McNeil	2009
Bicalutamida	Casodex®	AstraZeneca	2009
Nateglinida	Starlix®	Novartis	2009
Amlodipina & benazepril	Lotrel®	Novartis	2010
Anastrozol	Arimidex®	AstraZeneca	2010
Atomoxetina	Strattera®	Eli Lilly	2010
Enoxaparina sódica	Lovenox®	Sanofi-Aventis	2010
Losartana potássica	Cozaar/Hyzaar®	Merck & Co	2010
Naratriptana	Amerge®	GSK	2010
Tansulosina	Flomax®	Boehringer Ingelheim	2010
Venlafaxina	Effexor XR®	Pfizer	2010

Fonte: CDER, Report to the Nation to 2010, Espico

O perfil dos medicamentos genéricos mais consumidos no Brasil aos poucos começa a mudar. Os analgésicos e antibióticos, embora ainda sejam os campeões em volume de vendas, começam a ceder espaço para produtos voltados para tratamentos de doenças mais complexas. Devido a queda de sua patente, o citrato de sildenafil entrou pela primeira vez na lista em 2011, ocupando o quarto lugar em receita e quinto em volume. Segundo Odnir Finotti, presidente da Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos (Pró Genéricos), medicamentos que tratam hipertensão, problemas cardíacos, colesterol alto e câncer deverão figurar no topo desse ranking à medida que a patente desses medicamentos expirar (22).

Além do citrato de sildenafil outros importantes medicamentos considerados "blockbusters" (campeões de venda) tiveram a patente vencida nos últimos dois anos, casos da atorvastatina, princípio ativo do Lipitor®, também da americana Pfizer. A expectativa é de que nos próximos anos, outros medicamentos importantes tenham suas versões genéricas no mercado.

Dados do IMS Health, que audita as vendas do setor no varejo, apontam que os genéricos atingiram participação de mercado de 28,2% em fevereiro de 2014. Nos dois primeiros meses de 2014, os genéricos registraram crescimento de 18% nas vendas em volume, somando 130,8 milhões de unidades vendidas, contra 112,5 milhões no ano passado. Em valores, as vendas da categoria atingiram a marca acumulada de R\$ 2,3 bilhões entre janeiro e fevereiro de 2014, acumulando crescimento de 21,7%. Na Tabela 2 podemos observar quais são os medicamentos genéricos mais vendidos em unidades farmacotécnicas (19).

Tabela 2. Os medicamentos genéricos mais vendidos no Brasil entre fevereiro de 2013 e de 2014

Nome	Unidades vendidas
Losartana potássica	1.373.369
Amoxicilina	729.028
Hidroclorotiazida	727.332
Cefalexina	670.381
Atenolol	663.235
Metformina	591.534
Ciprofloxacino	513.497
Alprazolam	512.140
Clonazepam	511.172
Sinvastatina	508.292
Enalapril	498.368
Azitromicina	486.384
Sertralina	342.252

Fonte: Pró-Genéricos 30/04/2014

1.6 Fármacos estudados

1.6.1. *Clorpromazina*

Clorpromazina pertence à classe das fenotiazinas (fenotiazina mococloreto de 2-Cloro-10-[3-(dimetilamino)propil]) (Figura 1), sintetizada pela primeira vez pelo químico Paul Charpentier em 11 de dezembro de 1950. A clorpromazina, normalmente utilizada na forma de cloridrato, é um antagonista de dopamina pertencente a classe de medicamentos antipsicóticos típicos com propriedade antiadrenérgica, antiserotonérgica, anticolinérgica e antihistaminérgica, utilizado no tratamento da esquizofrenia (23, 24).

A dopamina é sintetizada por neurônios cujos corpos localizam-se no tronco cerebral e se projetam por diferentes vias. A via meso-límbico-cortical origina-se da área tegmental ventral e se projeta para um núcleo do estriado ventral chamado acúmbens (via meso-límbica). Ela também envia projeções para o lobo pré-frontal do córtex cerebral (via meso-cortical), sendo parte do chamado “feixe prosencefálico medial” (25). Segundo a teoria dopaminérgica da esquizofrenia, os sintomas positivos seriam decorrentes de uma atividade excessiva de dopamina em receptores D2 no núcleo acúmbens, enquanto os sintomas negativos seriam decorrentes de uma redução na ativação de receptores dopaminérgicos no córtex pré-frontal (26, 27). De acordo com essa teoria, um antipsicótico ideal deveria reduzir a atividade dopaminérgica no núcleo acúmbens, atenuando os sintomas positivos (delírios, alucinações), mas intensificá-la no córtex pré-frontal, atenuando sintomas negativos (embotamento afetivo, déficits cognitivos) (25-28).

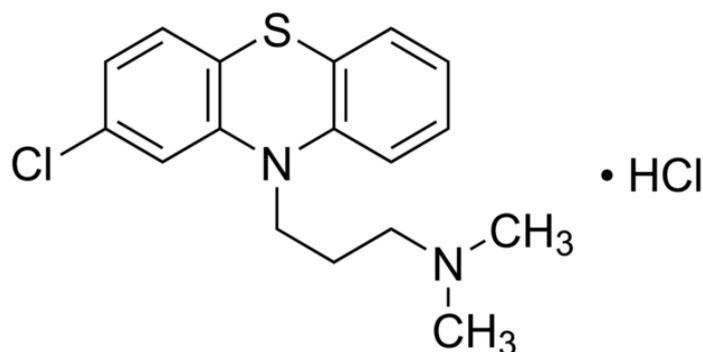


Figura 1. Estrutura química do cloridrato de clorpromazina. Fórmula molecular $C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$ e massa molecular de 355.33 g/mol.

A clorpromazina foi o primeiro medicamento desenvolvido com ação antipsicótica específica, e serviu como protótipo para o desenvolvimento da classe das fenotiazinas, incluindo, posteriormente, várias outras moléculas. Existem três grupos de antipsicóticos fenotiazínicos, os quais diferem entre si na estrutura química e atividade farmacológica: alifáticos, piperidinas e piperazinas (Tabela 3).

Como mostrado na Tabela 3, são adicionados à molécula grupos funcionais com o propósito de melhorar a absorção e biodisponibilidade do fármaco (29, 30).

O marco inicial na história dos antipsicóticos foi a descoberta casual dos efeitos da clorpromazina. Essa descoberta remonta da busca, pelo cirurgião francês Henry-Marie Laborit, de compostos capazes de atenuar o “choque” relacionado aos procedimentos cirúrgicos (30). Acreditava-se que essa reação seria o resultado de uma ativação autonômica devida ao estresse excessivo (30, 31). Para atenuar essa reação, Laborit administrava aos pacientes um conjunto de substâncias que ele denominava de “Coquetel Lítico”, que continha um anti-histamínico (Prometazina), dentre outras substâncias (32). Na busca de novos anti-histamínicos que pudessem ser utilizados com esse fim, foi enviado a Laborit um composto denominado Clorpromazina, sintetizado em 1950 por Paul Charpentier e testado farmacologicamente por Simone Courvoisier (30, 31). Ao administrar esse composto, Laborit observou que os pacientes se declaravam “mais relaxados e calmos”, mostrando “desinteresse” frente ao estresse do período pré-operatório (32).

Tabela 3. grupos de antipsicóticos fenotiazínicos.

Grupo	Exemplo	Efeito Sedativo	Efeito autonômico
Alifáticos	Clorpromazina	Intenso	Moderado
	Promazina	Moderado	
	Triflupromazina	Intenso	
	Metotrimeprazina	Muito intenso	
Piperidinas	Mesoridazina	Intenso	Intenso
	Tioridazina	Intenso	
Piperazinas	Flufenazina	Fraco/moderado	Fraco
	Perfenazina	Fraco/moderado	
	Proclorperazina	ND	
	Trifluoperazina	Moderado	

ND = Não determinado

Os primeiros estudos clínicos com esse medicamento foram realizados por Jean Delay e a Pierre Deniker, em Paris, com resultados bastante positivos, pois o novo fármaco restaurava significativamente a qualidade de vida dos pacientes psiquiátricos (33). Na década de 1950, enquanto iniciava-se a utilização da Clorpromazina na Europa, a Reserpina era introduzida na clínica na América do Norte (30, 32). Porém, à reserpina restaria “apenas” o interesse histórico e a utilidade como ferramenta farmacológica, sendo a Clorpromazina considerada o primeiro dos antipsicóticos . Poucos anos após o início de sua utilização, uma nova classe foi introduzida, a das butirofenonas, tendo como protótipo o haloperidol (30, 32). Esses fármacos foram inicialmente denominados “neurolépticos”, curiosamente, não devido aos seus efeitos terapêuticos, mas sim devido aos seus efeitos colaterais de “natureza neurológica” (34, 35).

A Clorpromazina tem como principal ação devido o bloqueio dos receptores de dopamina D2 pós-sinápticos. Considera-se que o bloqueio dos receptores de dopamina na área mesolímbica seja responsável pelo efeito antipsicótico, enquanto que o bloqueio no sistema nigroestriatal produz os efeitos extrapiramidais. Os efeitos antieméticos da clorpromazina resultam do antagonismo da dopamina. A clorpromazina também possui propriedades antimuscarínicas e de antagonista dos receptores de histamina (H1), serotonina e alfa-1-adrenérgicos (36, 37) e possui também propriedades ansiolíticas. Devido as suas propriedades antidopaminérgicas, pode causar sintomas extrapiramidais, tais como acatisia (inquietação, também conhecidos como “shuffle Thorazine”) e distonia.

Os primeiros estudos propondo um mecanismo para os antipsicóticos foram conduzidos por Arvid Carlsson, agraciado com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina no ano 2000 (35, 38). Sabia-se que a reserpina, que também apresenta ação antipsicótica, depletava monoaminas do encéfalo. Portanto, Carlsson e Lindqvist estudaram os efeitos dos “neurolépticos” sobre as monoaminas (mais precisamente das catecolaminas noradrenalina e dopamina). Em estudo publicado em 1963, estes autores verificaram que injeções agudas de clorpromazina ou

haloperidol aumentavam significativamente a formação dos metabólitos de catecolaminas (38).

Baseado no conhecimento que os neurolépticos eram capazes de bloquear os efeitos de drogas que potencializam a dopamina, como os psicoestimulantes (Anfetamina e Cocaína) e a L-DOPA, a proposta de Carlsson foi que os antipsicóticos atuariam bloqueando o efeito das monoaminas. Sua hipótese foi que esses compostos aumentariam os níveis dos metabólitos de catecolaminas por bloquearem os respectivos receptores, o que ocasionaria uma ativação compensatória dos neurônios noradrenérgicos e dopaminérgicos, com aumento na taxa de renovação desses neurotransmissores. No entanto, os autores não propuseram neste trabalho o antagonismo de dopamina, limitando-se ao “antagonismo de receptores de monoaminas” (38).

A menção mais direta à dopamina viria somente em 1970, quando Anden e colaboradores observaram que a dopamina e, não a noradrenalina, figurava como o neurotransmissor cujo metabolismo era aumentado pelos antipsicóticos (39). Em seguida, consolidou-se a proposta de que os antipsicóticos tinham por mecanismo comum o antagonismo de receptores de dopamina, sendo esta uma hipótese baseada também na similaridade das estruturas químicas das fenotiazinas, como a clorpromazina, à da dopamina (40, 41). Mais evidências foram obtidas com experimentos *in vitro*, avaliando como os antipsicóticos marcados radiativamente se ligavam a membranas biológicas e foi sugerido que vários antipsicóticos deveriam competir pelo mesmo sítio de ligação (42, 43).

Finalmente, foi determinado que as propriedades tóxicas extrapiramidais, anticolinérgicas, sedativas, e hipotensora da clorpromazina resultam do bloqueio de receptores dopaminérgicos, muscarínicos, histamínicos e alfa-adrenérgicos, respectivamente. A hipotensão ocorre, em parte, devido ao bloqueio alfa-adrenérgico periférico e em parte devido à ação central, levando ao desenvolvimento de taquicardia reflexa (44). Os efeitos cardiopatóxos de fenotiazinas em superdosagem são semelhantes à dos anti-depressivos tricíclicos (45). Arritmia cardíaca e "morte súbita" têm sido associadas a doses terapêuticas

de clorpromazina, sendo que o súbito colapso cardiovascular é atribuído a arritmia ventricular (46, 47).

As concentrações plasmáticas máximas ocorrem, em média, 1-4 horas (intervalo de 1,5-8 horas) após uma dose oral (37, 48, 49). Após a administração intramuscular, a clorpromazina é lentamente absorvida a partir do local de injeção, com a concentração máxima no plasma ocorrendo entre 6 a 24 horas após a administração (50). Logo após sua absorção, é metabolizada extensivamente no fígado pela ação das enzimas do complexo citocromo P450 (CYP), especialmente a CYP2D6, e excretada na urina e biliar na forma de numerosos metabólitos ativos e inativos. Menos de 1% da clorpromazina inalterada é excretada através dos rins na urina, 20 a 70% é excretada como metabólitos conjugados ou não e 5 a 6% da clorpromazina é excretada nas fezes (37).

Embora sua meia-vida de eliminação seja entre 16 a 30 horas, a eliminação dos metabólitos pode ser muito mais prolongada (37). Devido ao metabolismo sistêmico, a biodisponibilidade de clorpromazina por via oral é de cerca de 30% das doses intramusculares (50) e cerca de 10% das doses intravenosas (37).

A clorpromazina é altamente solúvel em lipídios e a ligação às proteínas plasmáticas é de 85 a 98% (36, 37). É amplamente distribuída por todo o corpo e tem um volume médio de distribuição de 17 L/ kg (37).

A introdução da clorpromazina na clínica médica é considerada o maior avanço individual na rotina de hospitais psiquiátricos, melhorando drasticamente o prognóstico de pacientes nesses hospitais em todo o mundo e reduzindo consideravelmente o uso indiscriminado de eletroconvulsoterapia e psicocirurgia (51). No entanto, nos últimos anos, a clorpromazina tem sido substituída pelos novos antipsicóticos atípicos, os quais são geralmente bem tolerados (52, 53).

Com o objetivo de monitorar as concentrações terapêuticas ótimas e controlar os seus efeitos secundários, métodos bioanalíticos sensíveis e precisos são necessários para quantificar a clorpromazina em fluidos biológicos. Entre os métodos mais utilizados, há relatos na literatura da determinação de clorpromazina em plasma utilizando cromatografia gasosa (CG) (54-56), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por UV (57-61),

CLAE com detecção por fluorescência (62), detecção electroquímica (63) e radioimunoensaio (64, 65).

Embora alguns destes métodos ofereçam boa sensibilidade em concentrações na ordem de ng/mL, muitos deles requerem tempo muito longo de cromatográfica, preparação da amostra trabalhosa e interferência de compostos co-extraídos. Uma desvantagem adicional da maior parte desses métodos é que, pelo menos, 1 mL de plasma é necessário para obter o limite de detecção relatados, limitando o número de amostras coletadas durante um estudo farmacocinético. De fato, a maior parte destes métodos não é adequada para o estudo de farmacocinética de clorpromazina em plasma humano obtido a partir de ensaios clínicos. A utilidade da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por electrospray (CLAE-ESI-EM/EM) foi demonstrada para um grande número de aplicações nas áreas de bioanálise, monitoramento ambiental e avaliações farmacêuticas, oferecendo várias vantagens significativas quando comparado com os métodos anteriores, tais como maior seletividade e sensibilidade. A CLAE-EM/EM é o método de escolha para a bioanálise de moléculas orgânicas a partir de matrizes biológicas complexas desde meados dos anos 90 (66-71). Até o momento, poucos métodos CLAE- EM/EM foram relatados para a quantificação de clorpromazina em plasma (72-74).

1.6.2. **Ondansetrona**

Ondansetrona (Figura 2) (\pm)1,2,3,9 tetrahydro-9-metil-3-[(2-metil-1H-imidazo-1-il)metil] 4H-carbazol-4-ona com fórmula molecular $C_{18}H_{19}N_3O.HCl.2H_2O$ e massa molecular de 293.4 g/mol, é um potente antagonista seletivo de receptores tipo 3 pós-sinápticos da 5-hidroxitriptamina (5-HT₃, serotonina).

Os receptores 5-HT₃ estão presentes na periferia dos terminais nervosos vagais e no nível central da zona quimiorreceptora disparadora da área postrema. Acredita-se que o efeito antiemético da ondansetrona se deve a inibição de receptores 5-HT₃ presentes em neurônios a nível central e periféricos. Os agentes quimioterápicos e a radioterapia podem causar liberação de 5-HT no intestino

delgado, iniciando um reflexo de vômitos pela ativação dos aferentes vagais nos receptores 5-HT₃. A ativação dos aferentes vagais pode também causar uma liberação de 5-HT na área postrema e isto, por sua vez, pode promover vômitos através de um mecanismo central. Desse modo, o efeito da ondansetrona no controle das náuseas e dos vômitos, induzidos por anestésias, cirurgias, quimioterapia e radioterapia ocorre devido ao seu antagonismo dos receptores 5-HT₃ nos neurônios localizados tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central (75-83). O controle dos efeitos emetogênicos é um fator importante para o sucesso da quimioterapia. Sendo assim, a ondansetrona é comumente indicada para o tratamento de prevenção das náuseas e dos vômitos associados com os ciclos iniciais e repetidos de quimioterapia anticancerígena emética, incluindo as altas doses de cisplatina (84).

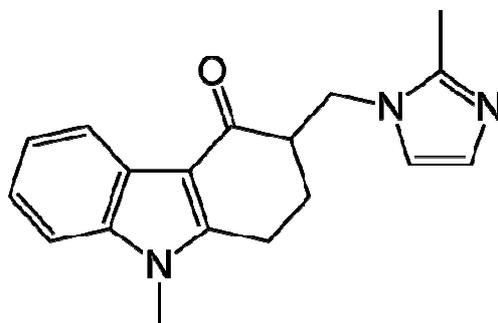


Figura 2. Estrutura química da ondansetrona. Fórmula molecular C₁₈H₁₉N₃O e massa molecular de 293.4 g/mol.

A ondansetrona é também utilizada nos seguintes casos: como antidepressivo, para melhorar o prurido, no tratamento da diarreia associada com Criptosporidiose ou diabetes, tratamento da diarreia crônica refratária, tratamento na dependência ao álcool, privação de opiáceos, vertigem, tremor cerebelar e doença de Parkinson (84).

Após administração oral de 8 mg, as concentrações plasmáticas máximas de ondansetrona ocorrem em aproximadamente 1,5 horas, e aproximadamente 6 horas depois de uma dose retal. Sua biodisponibilidade absoluta é de aproximadamente 60%, devido, principalmente, à sua metabolização.

É um fármaco com alta absorção sendo extensamente distribuído no corpo, mostrando biodisponibilidade de 60 a 70% e ligação a proteínas plasmáticas medida *in vitro* de aproximadamente 70 a 76%. É extensivamente metabolizado no fígado por enzimas do complexo citocromo P450 (85, 86), incluindo CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4, sem predominância clara da atividade de uma dessas enzimas (87, 88). As reações da fase I do metabolismo resultam na N-demetilização e hidroxilação. O extenso metabolismo da ondansetrona resulta em excreção inalterada na urina de no máximo 5% da dose (84, 85). A ondansetrona tem uma meia-vida de eliminação de 2 a 4 horas quando administrado pelas vias oral ou parenteral e aproximadamente 6 horas após administração retal. A velocidade de eliminação é mais lenta em mulheres e idosos, mas essas diferenças não apresentam relevância clínica (89). Em indivíduos com complicações hepáticas moderadas a severas, sua biodisponibilidade pode chegar 100% e sua eliminação será reduzida. Conseqüentemente, a sua meia-vida de eliminação pode variar de 15 a 32 horas. Em geral, as crianças têm uma liberação mais alta comparada com adultos (90).

As principais reações adversas referentes ao uso da ondansetrona são: constipação (11% de incidência em pacientes em quimioterapia que recebam ondansetrona diariamente); erupção cutânea (1%), aumentos ocasionais e transitórios da aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), cefaleias, reações extrapiramidais, visão turva transitória, hipotassemia e rubor facial.

De acordo com a ANVISA, a administração de ondansetrona deve ser feita preferivelmente em jejum e a dosagem do fármaco deve ser realizada com a molécula na sua forma inalterada.

Além do radioimunoensaio (RIA) (91) e da electroforese capilar quiral (CE) (92), outros métodos para a quantificação de ondansetrona em plasma humano foram

descritos na literatura especializada, incluindo técnicas de cromatografia aquiral (93-96) e CLAE quiral (97, 98). Normalmente, os métodos de CLAE utilizam amostras biológicas extraídas por fase sólida (SPE), juntamente com os técnicas tradicionais à base de colunas em sílica e detecção por ultravioleta (UV). Apesar do uso de processos dispendiosos para extração e separação do analito, os limites de quantificação foram validados no intervalo de 10 a 15 ng/mL.

Mais recentemente, alguns métodos foram baseados em CLAE-ESI-EM/EM para determinar a ondansetrona no plasma humano (99-102). Apesar da obtenção de limites de quantificação abaixo dos descritos anteriormente, o tempo de execução da análise ainda foi muito longo em alguns destes métodos ou o volume de plasma utilizado para a extração da droga era muito alto.

1.6.3. *Imipramina*

A Imipramina (Figura 3) é um antidepressivo tricíclico, inibidor da recaptção de noradrenalina e serotonina (103). Esta molécula é descrita quimicamente como 5-(3-dimetilaminopropil)-10-11-dihidro-5H-dibenz-[b,f] azepina, tem um peso molecular de 316.87 e sua fórmula empírica é C₁₉H₂₄N·HCl.

O mecanismo de ação da Imipramina não é totalmente conhecido, porém, seus efeitos farmacológicos incluem as atividades: alfadrenolítica, anti-histamínica, anticolinérgica e bloqueadora do receptor serotoninérgico (5-HT). Contudo, acredita-se que a principal atividade terapêutica da Imipramina seja devido a inibição da recaptção neuronal de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) (103-105).

O Cloridrato de Imipramina é rapidamente e quase que completamente absorvido a partir do trato gastrointestinal. A ingestão de alimentos não afeta sua absorção e sua biodisponibilidade. Durante sua primeira passagem pelo fígado, a Imipramina administrada por via oral é parcialmente convertida em desmetilimipramina, um metabólito que também exibe atividade antidepressiva (106). Em menor extensão do que a demetilação, a imipramina é convertida

também por hidroxilação, sendo que ambas as rotas metabólicas estão sob controle genético (106).

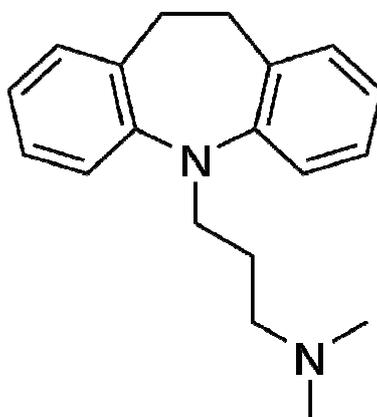


Figura 3. Estrutura química da imipramina. Fórmula molecular C₁₈H₁₉N₃O e massa molecular de 293.4 g/mol.

Após administração oral de imipramina 50mg, seu pico de concentração plasmática ocorre em aproximadamente $3,3 \pm 0,5$ horas. Aproximadamente 86% da imipramina permanecem ligados a proteínas plasmáticas e seu volume aparente de distribuição é de aproximadamente 21L/kg de peso corpóreo, podendo variar de 12 a 28 L/kg (107-110). Tanto a imipramina, como seu metabólito desmetilimipramina, passam para o leite materno em concentrações análogas às encontradas no plasma (109, 110).

A imipramina tem uma meia-vida de aproximadamente $19,64 \pm 5,53$ horas. Aproximadamente 80% do fármaco são excretados através da urina e cerca de 20% nas fezes, principalmente na forma de metabólitos inativos (107, 108, 111).

A farmacocinética da imipramina e do seu metabólito ativo desipramina foram extensivamente investigados em estudos concebidos para avaliar as fontes de variabilidade inter-indivíduo e estudar populações clínicas discretas, além de voluntários saudáveis (111). Fontes de variabilidade inter-individual na farmacocinética foram identificadas como de origem genética (fenótipo oxidativo) e

ambientais. O fenótipo oxidativo tem um impacto importante no metabolismo de primeira passagem (111).

Em indivíduos com metabolismo deficiente, a disponibilidade sistêmica para a imipramina é aumentada, o que tem sido demonstrado em estudos sobre a farmacocinética da imipramina em populações diversas, como os idosos, crianças e etilistas crônicos. Estes estudos revelaram que o *clearance* da imipramina é diminuído em idosos, enquanto que em etilistas crônicos o *clearance* da imipramina é maior do que o de indivíduos saudáveis (111).

A Imipramina é indicada para tratamento de todas as formas de depressão, incluindo-se as formas endógenas, orgânicas, psicogênicas, depressão associada com distúrbios de personalidade ou com alcoolismo crônico, pânico, condições dolorosas crônicas, terror noturno e enurese noturna (112, 113).

Os efeitos colaterais mais frequentemente relatados são: sonolência, fadiga, sensação de inquietação, confusão, delírios, desorientação, alucinações, estados de ansiedade, agitação, distúrbios do sono, oscilação de depressão a hipomania ou a mania, tremores, vertigens, cefaleia e parestesia.

Devido aos seus efeitos colinérgicos, os pacientes podem apresentar também: boca seca, sudorese, constipação, alterações da acomodação visual, visão borrada, ondas de calor e distúrbios da micção.

No sistema cardiovascular ocorrem mais frequentemente: taquicardia sinusal, hipotensão postural e alterações clinicamente irrelevantes do ECG. Ocasionalmente, a imipramina pode ainda causar distúrbios nos sistemas gastrointestinal e endócrino. Finalmente, os antidepressivos tricíclicos podem potencializar o efeito anticoagulante de fármacos cumarínicos, graças à inibição de seu metabolismo hepático. O monitoramento cuidadoso da protrombina plasmática é, portanto, recomendada (114).

De acordo com a ANVISA, a administração da imipramina deve ser feita preferivelmente em jejum, assim como a dosagem do fármaco em estudos farmacocinéticos deve ser realizada com a molécula na sua forma inalterado. Na literatura foram encontrados métodos para quantificação da imipramina com limite de quantificação variando de 0,26 ng/mL (115) até 2,5 ng/mL (116).

Normalmente, estes e outros métodos descrevem uma análise cromatográfica significativamente mais longa, com tempos de corrida de 7 e 5,5 minutos (115-117). No entanto, vale ressaltar que estes métodos foram desenvolvidos para a quantificação de vários compostos simultaneamente.

Há trabalhos na literatura (107, 111, 115) que avaliam a bioequivalência entre formulações de imipramina. Em trabalho de 2001, foram comparadas as formulações fornecidas pela Novartis: Tofranil 25mg, Tofranil mite com 10 mg e pós branco contendo 25 mg de imipramina-HCl em frasco de vidro para reconstituição com água. As três formulações apresentaram biodisponibilidade relativas semelhantes (115).

1.7 Estudos de Bioequivalência

Para a indústria farmacêutica, o custo de desenvolvimento de uma formulação genérica é bem menor, quando comparado ao investimento necessário para a pesquisa e desenvolvimento de um medicamento inovador, visto que para o medicamento inovador é necessário realizar estudos não clínicos e estudos clínicos fase I, II e III para garantir eficácia e segurança da formulação. Já o medicamento genérico necessita somente comprovar a equivalência terapêutica através de estudos *in vitro* (equivalência farmacêutica) e *in vivo* (bioequivalência), após o término do período de patente, assumindo os resultados de estudos de eficácia e segurança, realizados durante o desenvolvimento do medicamento inovador (118).

Para que um medicamento genérico possa ser comercializado, ele deve passar por testes de biodisponibilidade/bioequivalência. Biodisponibilidade é um termo farmacocinético que descreve a velocidade e o grau com que uma substância é absorvida a partir da ingestão de um fármaco e se torna disponível sistemicamente. Um estudo de bioequivalência tem por objetivo comparar as biodisponibilidades de duas ou mais formulações de um mesmo fármaco consideradas equivalentes farmacêuticamente e que tenham sido administradas na mesma dose molar de maneira que as formulações possam ser consideradas intercambiáveis. Em farmacologia, a intercambialidade indica a possibilidade de

substituição de um medicamento por outro equivalente terapêutico receitado pelo prescritor (118, 119). Adicionalmente, os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência têm por objetivo demonstrar evidências *in vivo* da qualidade farmacêutica dos produtos (119).

Estudos de bioequivalência são geralmente realizados em voluntários sadios que são recrutados segundo critérios que garantam homogeneidade e são confinados em condições padronizadas de alimentação, acomodações, ingestão de líquidos e demais rotinas permitidas durante um estudo. Durante o confinamento são coletadas amostras em algum líquido biológico segundo um cronograma pré-estabelecido por profissionais treinados para garantir as mesmas condições de coleta em todos os tempos e para todos os voluntários. A análise é feita considerando algumas medidas farmacocinéticas tais como, a área sob a curva da concentração da substância no plasma versus tempo (*ASC*) e a concentração máxima (*C_{max}*) atingida pela substância. Há três tipos de estudos de bioequivalência: média (a mais comum e exigida pela ANVISA), individual e populacional que serão abordados durante o texto.

A ANVISA recomenda e exige apenas assegurar bioequivalência utilizando o método de bioequivalência média. Este método considera apenas as médias das medidas farmacocinéticas estudadas para os medicamentos testados. Assim, segundo *Chow and Liu* (2000) (120), não é possível assegurar a intercambialidade entre os medicamentos teste em termos de eficácia e segurança, ou seja, se dois medicamentos teste foram comparados com o mesmo medicamento referência através do método de bioequivalência média não podemos afirmar que estes dois medicamentos sejam intercambiáveis apesar de serem bioequivalentes ao medicamento referência.

Entre os delineamentos mais comuns em estudos clínicos, temos o delineamento paralelo em que cada indivíduo recebe ao acaso somente uma das formulações e o *cross-over* em que cada indivíduo recebe mais de uma formulação de um mesmo medicamento em períodos diferentes, respeitando-se o tempo de *washout* entre cada período. Os delineamentos *cross-over* são os mais recomendados em estudos de bioequivalência, devido à grande variabilidade

metabólica dos voluntários estudados. Eles possuem vantagens em termos de precisão estatística e custo quando comparados ao delineamento paralelo, pois cada indivíduo serve como o seu próprio controle (121).

Quando o fármaco apresenta meia-vida muito longa, ou seja, a substância permanece no organismo por muito tempo e/ou é eliminada muito lentamente, o delineamento paralelo passa a ser o mais apropriado. De acordo com a ANVISA o *washout* deve ser no mínimo equivalente a sete meias-vidas de eliminação do fármaco. Por exemplo, se a meia-vida de um fármaco for igual a 10 dias, o período de *washout* deve ser de pelo menos 70 dias, o que pode ser inviável para a realização do estudo (121).

A análise estatística de bioequivalência é estabelecida de forma a demonstrar a equivalência das formulações, através da avaliação dos parâmetros farmacocinéticos de ASC (extensão de absorção) e C_{max} (velocidade de absorção). As formulações são consideradas com biodisponibilidade equivalente quando o intervalo de confiança (IC) de 90% das médias geométricas da ASC e C_{max} está dentro do intervalo de 80-125% estabelecidos pelo FDA e ANVISA (122-124). Os parâmetros a serem considerados no planejamento de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência são:

- Número de voluntários;
- Sexo dos voluntários;
- Tempos de coleta para caracterização do perfil farmacocinético;
- Forma farmacêutica;
- Intervalo entre as administrações (“*washout*”);
- Condição de administração: alimentação/jejum;
- Metodologia analítica a ser utilizada para o doseamento das amostras;
- Fármaco e/ou metabólito ativo na circulação a ser quantificado

1.7.1. **Número de voluntários**

O número de voluntários a ser empregado em um estudo de biodisponibilidade/bioequivalência é geralmente estabelecido através de estudos anteriormente realizados para o mesmo fármaco, dados de revisão de literatura e estudo piloto quando não há dado disponível na literatura, sendo que, o número adequado de voluntários deve assegurar poder estatístico (> 0.8) suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de biodisponibilidade/bioequivalência (121).

Com relação ao coeficiente de variabilidade intra-sujeito, quanto menor o coeficiente, menor o número de voluntários a ser empregado para a avaliação estatística de bioequivalência. Os fármacos considerados de alta variabilidade têm um coeficiente de variabilidade intra-sujeito acima de 30% (125, 126) e os fármacos considerados com baixa variabilidade tem um coeficiente de variabilidade intra-sujeito entre 5-15% (125, 126).

Adicionalmente, devemos levar em consideração os seguintes critérios estabelecidos pela legislação (ANVISA, 2006): número mínimo de 12 voluntários para qualquer estudo de biodisponibilidade/bioequivalência e 24 voluntários na falta de dados de estudos anteriores e de revisão de literatura para o coeficiente de variação do fármaco.

1.7.2. **Sexo dos voluntários**

A grande maioria dos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência é realizada em voluntários de ambos os sexos e balanceados. Em casos específicos, os estudos podem ser realizados em homens ou em mulheres somente. Por exemplo, o estudo de bioequivalência do retinóide isotretinoína, que inibe a função das glândulas sebáceas e a queratinização (127, 128), é realizado em homens, devido ao potencial risco teratogênico da droga. A legislação atual (123) para estudos de contraceptivos exige que os estudos sejam realizados com mulheres em idade fértil. Da mesma forma, para medicamentos com

características específicas ao sexo e idade, a ANVISA exige que os estudos sejam realizados em voluntários com essas características.

1.7.3. **Tempos de coleta**

Tempos de coleta adequados devem garantir a caracterização do perfil farmacocinético do fármaco, sendo desta forma, necessário assegurar:

- determinação mais eficiente possível do C_{max} através das coletas de amostras suficientemente próximas a região do intervalo de tempo previsto para a ocorrência do T_{max} ;
- coletas de amostras na fase de eliminação. A ANVISA determina que a coleta das amostras contemple um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou do metabólito, para garantir a adequada caracterização do perfil plasmático dos mesmos (concentração versus tempo);
- % ASC_{0-inf} extrapolada menor que 20% para mais de 90% dos voluntários;
- coletas de amostras que possuam níveis quantificáveis por razões de ordem ética;

Para fármacos que apresentam meia-vida de eliminação longa (superior a 24 horas) pode ser utilizado cronograma de coleta de amostras de até 72 horas (ASC truncada), visto que permite a caracterização farmacocinética de C_{max} e ASC relacionada à fase de absorção do fármaco, objetivos estes da avaliação de bioequivalência, e permite, adicionalmente, um menor número de coleta de amostras dos voluntários. Alternativamente, poderá ser utilizado um delineamento paralelo.

1.7.4. **Forma farmacêutica**

Os diferentes tipos (comprimido, cápsula, solução, suspensão, etc.) de formas farmacêuticas devem ser considerados no planejamento dos tempos de coleta, pois implicam em variação dos parâmetros farmacocinéticos para uma mesma dose de determinado fármaco.

1.7.5. **Efeito da alimentação**

Durante o planejamento do protocolo clínico deve ser levada em consideração a influência da alimentação na absorção dos fármacos. A alimentação pode seguramente influenciar a dissolução da forma farmacêutica utilizada (129) e efetivamente comprometer a eficácia terapêutica, principalmente dos produtos de índice terapêutico estreito. Regulatoriamente (123) é exigido estudo de bioequivalência com os voluntários alimentados nos seguintes casos:

- formas de liberação prolongada ou controlada (adicionalmente ao estudo em jejum);
- formas de liberação retardada, que apresentam revestimento gastro-resistente;
- formas de liberação imediata cujos fármacos tenham a absorção influenciada pela presença de alimentos, resultando em alterações clinicamente significativas e indicação de administração do medicamento com alimentos.

1.7.6. **O intervalo entre as administrações**

O intervalo entre as administrações (*washout*) deve ser de 7 meias vidas para garantir que não haja efeito residual do primeiro período no segundo período de administração.

Se a droga tem uma meia-vida longa ou se o intervalo entre os períodos é muito curto, o efeito da formulação, aquele observado durante o período no qual ela é

administrada, pode persistir mesmo após o *washout*. Neste caso, é necessário distinguir a diferença entre o efeito direto da formulação e o efeito residual (*carry-over*).

O efeito residual, em inglês *carry-over*, é o efeito do fármaco que eventualmente persiste depois do fim do período de dosagem. *Jones and Kenward* (2003) (130) apresentaram algumas razões que podem contribuir para a presença de efeitos *carry-over*:

- O verdadeiro efeito *carry-over* pode aparecer quando o período de *washout* entre dois períodos de tratamento não foi suficiente para os voluntários eliminarem os efeitos das formulações administradas no período anterior;
- A interação entre formulação e período pode surgir quando o efeito da formulação depende do período em que foi administrada;
- Os grupos de voluntários das sequencias podem apresentar características, por exemplo, idade ou sexo, as quais os tornam significativamente diferentes. Isto pode ocorrer quando o processo de aleatorização para a alocação dos voluntários nas sequencias não foi feito adequadamente. A inexistência do efeito residual não implica necessariamente que tais efeitos sejam nulos, mas que se existirem, tem a mesma intensidade em ambas as sequencias de formulações.

1.7.7. **Metodologia analítica**

A quantificação de amostras em fluídos biológicos é realizada por diferentes metodologias analíticas, entre elas destacam-se:

- Radioimunoensaio;
- Elisa;
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a diferentes sistemas de detecção:
 - Espectrometria de massas
 - Ultravioleta
 - Fluorescência

- Cromatografia gasosa acoplada é espectrometria de massas
- Absorção atômica

A técnica de CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) é atualmente a mais utilizada para quantificação de amostras biológicas provenientes de estudos de biodisponibilidade/bioequivalência. Isto se deve principalmente aos seguintes fatores:

- Alta sensibilidade e seletividade proporcionadas pela associação das técnicas;
- Diminuição do tempo de análise das amostras, um fator importante a ser considerado em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência, visto que envolvem a quantificação em um grande número de amostras;

Em um estudo de BD/BE, a sensibilidade e seletividade da técnica CLAE-EM/EM permitem a quantificação de amostras com baixas concentrações, principalmente em estudos que envolvem a administrações de fármacos em baixa dose, como por exemplo, os contraceptivos e hormônios utilizados no climatério que possuem níveis plasmáticos baixos (131, 132).

O limite de quantificação inferior normalmente aceito é 10% do C_{max} médio esperado. A técnica CLAE-EM/EM permite a validação de metodologias analíticas com limite de quantificação inferior (LIQ) menores. Dependendo do analito a ser quantificado, é possível um LIQ de até 0.2% do C_{max} médio esperado, o que permite uma melhor caracterização do perfil farmacocinético.

1.7.8. **Fármaco e/ou metabólito ativo**

Normalmente, a determinação dos parâmetros farmacocinéticos em uma avaliação de BD/BE é realizada através da quantificação do fármaco na forma inalterada e/ou do metabólito ativo na circulação.

A quantificação de metabólitos leva em consideração se: (a) o fármaco na forma inalterada é um pró-droga inativa; (b) a concentração plasmática do fármaco na forma inalterada é muito baixa para ser quantificada, devido à baixa sensibilidade analítica; (c) o fármaco na forma inalterada é metabolizado

rapidamente para o metabólito ativo; (d) tanto o fármaco na forma inalterada como o metabólito tem atividades terapêuticas, mas somente o metabólito é quantificado em altas concentrações (125).

1.7.9. ***Etapas de um estudo de bioequivalência***

Os estudos de biodisponibilidade/bioequivalência são compostos pelas seguintes etapas:

Etapa Clínica: triagem de voluntários sadios que fazem exames clínicos que comprovem sua aptidão para participação no estudo. Em seguida os voluntários são internados, recebendo sempre acompanhamento e tratamento padronizado e é feita a coleta das amostras em tempos pré-determinados.

Etapa Analítica: análise das amostras coletadas na etapa clínica e quantificação do fármaco utilizando metodologia específica.

Etapa Estatística: determinação do delineamento e número de voluntários que participarão do estudo de acordo com os métodos estatísticos apropriados, o poder exigido pela agência reguladora e a variabilidade do fármaco, além da análise dos dados obtidos na etapa analítica com o cálculo das medidas farmacocinéticas e avaliação de bioequivalência através de intervalos de confiança e testes de hipóteses.

1.7.10. ***Medidas farmacocinéticas***

Para quantificar a biodisponibilidade de um medicamento em estudos de bioequivalência algumas medidas farmacocinéticas são utilizadas. A estimativa destas medidas pode ser obtida a partir da concentração observada do fármaco em algum líquido biológico, geralmente sangue ou plasma e em alguns casos urina ou outros que são coletados na etapa clínica. A seguir descrevemos cada uma dessas medidas.

C_{max}: é a maior concentração observada do fármaco e/ou metabólito nas amostras observadas;

T_{max}: é o instante em que *C_{max}* é atingida;

ASC_{0-t}: área sob a curva de concentração plasmática do medicamento desde o instante inicial até o último tempo quantificável;

ASC_{0-INF}: área sob a curva de concentração plasmática do medicamento desde o instante inicial até o tempo relativo à completa eliminação do fármaco. É calculada como $ASC_{0-INF} = ASC_{0-t} + C_t/Ke$, sendo *C_t* a última concentração medida e *Ke* é a constante de eliminação. A estimativa de *Ke* é obtida pelo coeficiente de inclinação da reta de regressão ajustada utilizando-se as últimas concentrações transformadas na escala logarítmica e multiplicada por -2,303;

t_{1/2}: meia vida de eliminação do fármaco calculada como $\ln 2/Ke$, sendo *Ke* definido acima.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Realizar 3 estudos de bioequivalência contendo fármacos de ação central para avaliação da biodisponibilidade relativa, utilizando-se os critérios de bioequivalência;

2.2 Objetivos específicos

Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos, rápidos, sensíveis e robustos para quantificar os fármacos de interesse presentes no plasma humano, respeitando os requisitos do FDA e ANVISA de alta sensibilidade, especificidade e alto rendimento da amostra em ensaios farmacocinéticos comparativos de bioequivalência para fins de registro como medicamentos genéricos e/ou similar:

Capítulo 1: Estudo de bioequivalência de duas formulações de Clorpromazina comprimido revestido de 100 mg em voluntários sadios de ambos os sexos.

Capítulo 2: Estudo de bioequivalência de duas formulações de Ondansetrona comprimido revestido de 8 mg em voluntários sadios de ambos os sexos.

Capítulo 3: Estudo de bioequivalência de duas formulações de Imipramina comprimido revestido de 25 mg em voluntários sadios de ambos os sexos.

3. CAPÍTULO 1 - CLORPROMAZINA

3.1 EXPERIMENTAL

3.1.1. *Materiais*

Padrão de referência para clorpromazina foi obtida diretamente da United States Farmacopeia (USP, Lote # j) (Rockville, Maryland, EUA). O padrão de ciclobenzaprina foi adquirido da Sigma-Aldrich Corp (St. Louis, MO, EUA). Metanol (grau CLAE), acetonitrila, éter dietílico e diclorometano foram adquiridos da JT Baker (Jundiaí, SP, Brasil). Água ultra pura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). Sangue humano branco foi coletado de voluntários saudáveis que não tenham tomado os medicamentos em estudo. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue tratado com o anticoagulante EDTA (BD Vacutainer ®, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). As amostras de plasma humano (normal, hiperlipêmico e hemolisado) foram obtidos de grupo distinto de doadores saudáveis. O *pool* de cada tipo de plasma foi armazenado a -70°C até que sua utilização nos ensaios.

3.1.2. *Padrões da curva de calibração e controles de qualidade*

Todas as análises foram realizadas em conformidade com os requisitos atuais da ANVISA e do FDA, descritos nas orientações para validação de métodos bioanalíticos.

As soluções estoque de clorpromazina e ciclobenzaprina (padrão interno) foram pesados e dissolvidos em uma solução composta pela mistura metanol/água (50/50, v/v) para se obter a concentração final de 0,5 mg/mL, tanto para a clorpromazina como para a ciclobenzaprina. As soluções de trabalho de clorpromazina foram preparadas por diluições em série das soluções estoque também em metanol/água (50/50, v/v) para se obter as concentrações finais de 5,

10, 20, 50, 100, 200, 500, 1.000 e 2.000 ng/mL. A solução de trabalho de ciclobenzaprina foi preparada por diluição da solução estoque em metanol/água (50/50, v/v) para se obter a concentração final de 50 ng/mL. As soluções estoque e de trabalho foram armazenadas a 4°C até à sua utilização. As curvas de calibração para a clorpromazina foram preparadas pela fortificação do plasma branco com as soluções de trabalho para se obter uma diluição de dez vezes, a fim de se obter as concentrações finais de 0,5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100,0 e 200,0 ng/ml. Durante a preparação da curva as análises foram realizadas em duplicada para cada concentração.

As amostras de controle de qualidade foram preparadas em plasma branco nas concentrações de 0,5 (limite inferior de quantificação, LIQ), 1,5 (controle de qualidade baixo, CQB), 60.0 (controle de qualidade médio, CQM) e 160,0 ng/mL (controle de qualidade alto, CQA).

3.1.3. **Preparo das amostras**

As amostras de plasma foram descongeladas à temperatura ambiente e 200 µL foram transferidos para um tubo de microcentrífuga e misturado com 50 µL da solução de trabalho de ciclobenzaprina e 2,0 ml de éter dietílico/diclorometano (70/30, v/v). Após agitação no vórtex durante 1 min, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g durante 1 min a 4°C. A mistura foi congelada em banho de metanol com gelo seco e a fase orgânica foi transferida para um tubo de vidro limpo e evaporado com fluxo de nitrogênio a 40°C. Os resíduos foram reconstituídos em 100 µL de metanol/água (50/50 v/v) e 1% de ácido fórmico. Após agitação no vórtex durante 20s, a solução foi transferida para o frasco de CLUE para posterior injeção no sistema cromatográfico.

3.1.4. **Condições cromatográficas**

Após a extração, as amostras foram injetadas (5,0 µL) em uma coluna Aquity CLUE BEH C18 1,7 um (50 x 2,1 mm de diâmetro interno), operando a 40°C. A fase móvel utilizada era composta de uma mistura de 65% de água com

1% de ácido fórmico e 35% de acetonitrila a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O sistema de amostragem automática foi mantido a 12°C e o tempo total de corrida cromatográfica foi de 2,0 min.

3.1.5. **Condições da Análise por Espectrometria de Massas**

A detecção foi realizada utilizando espectrômetro de massas Waters Q-Premier XE em série, equipado com ionização por electrospray (ES) e fonte operando no modo de positivo (ES+). Parâmetros de interface foram otimizados durante a infusão da clorpromazina e ciclobenzaprina através da interface de controle com o sistema CLUE. As configurações de MS selecionadas foram: tensão capilar de 3.5kV, tensão de cone de 30 V, temperatura da fonte de 110°C, temperatura de dissolvatação de 400°C, energia de colisão de 20 eV e tempo de permanência (dwell time) de 0,075s para cada transição. Com base na verificação do espectro MS/MS completo de cada fármaco, os íons mais abundantes foram selecionados. O espectrômetro de massa foi então ajustado para monitorar as transições dos íons precursores que deram origem aos respectivos produtos. As transições selecionadas foram: transição 319,1 > 85,9 m/z monitorada para clorpromazina (Figura 4a) e transição 276,2 > 57,9 m/z para ciclobenzaprina (Figura 4b). Aquisição de dados e análise foram realizadas com o software Analyst (versão 1.4.2).

3.1.6. **Linearidade**

As curvas de calibração foram construídas utilizando as razões das áreas entre os picos de clorpromazina e do padrão interno. A concentração de cada ponto da curva foi recalculada e comparada com a concentração nominal de clorpromazina adicionada a cada um dos oito padrões de plasma (0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0, 100,0 e 200,0 ng/mL) em duplicada. Análise de regressão linear dos quadrados mínimos (*Linear least-square regression analysis*), com fator de ponderação de $1/x^2$, foi efetuada para avaliar a linearidade da curva obtida. Além disso, uma amostra de plasma branco (amostra não fortificada) e uma

amostra de plasma zero (plasma branco acrescido do PI) foram utilizadas para demonstrar a ausência de interferência em cada ensaio.

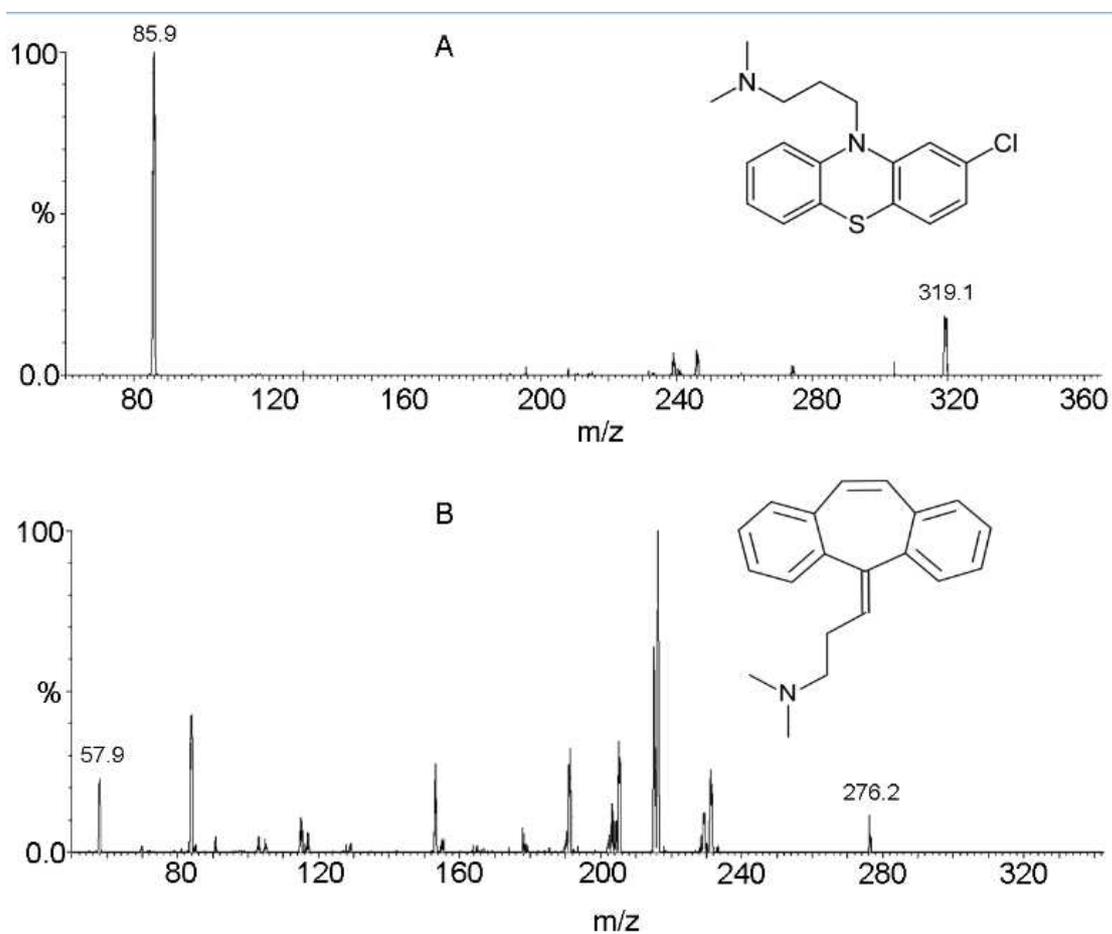


Figura 4. Espectro da varredura das massas de clorpromazina (A) e ciclobenzaprina (B).

3.1.7. **Supressão Iônica**

Um procedimento para determinar o efeito de supressão iônica durante a análise MS/MS foi realizada através de um protocolo de infusão contínua do composto no detector MS. O delineamento experimental consistiu de uma bomba de infusão ligado ao sistema por um "tee volume zero" antes do splitter e o sistema CLUE bombeando a mesma fase móvel utilizada na análise de rotina de clorpromazina. A bomba de infusão foi ajustada para transferir a mistura do analito e do PI diluídos em fase móvel para o tubo de ligação entre a coluna de CLUE e a fonte de ionização do espectrômetro de massas. As concentrações do analito e do PI foram selecionadas de modo a atingir, pelo menos, 5 vezes a linha de base. O extrato reconstituído a partir de plasma em branco foi injetado no sistema CLUE enquanto a mistura padrão estava sendo infundida. A supressão de íons foi avaliado em três diferentes matrizes: plasma normal, hiperlipêmico e hemolisado. Estas amostras de plasma humano branco (*pool*) foram extraídas seguindo o mesmo procedimento de extração aplicado para as amostras do estudo. Neste sistema, qualquer supressão iônica resulta em uma depressão do sinal de MS.

3.1.8. **Recuperação**

As recuperações das extrações de clorpromazina e PI foram avaliadas pela comparação das proporções das áreas dos picos obtidas a partir de amostras de plasma extraídas com aquelas fortificadas após a extração de amostras brancas nas mesmas concentrações de cada nível de CQ (Recuperação Relativa). Este procedimento foi realizado utilizando-se cinco alíquotas de três fontes diferentes de plasma humano fortificados nas concentrações CQB (1,5 ng/mL), CQM (60 ng/mL) e CQA (160 ng/mL).

3.1.9. **Precisão e Exatidão**

Durante o processo de validação, os parâmetros de precisão e exatidão do método foram avaliados utilizando três diferentes lotes de amostras de plasma branco fortificados nas concentrações de clorpromazina equivalente aos controles de qualidade (CQB, CQM e CQA). Além disso, a precisão e exatidão intra-lote também foram calculadas com a concentração equivalente ao LIQ. Para se determinar os parâmetros intra-ensaio, seis repetições de amostras de cada concentração mencionada acima foram analisadas simultaneamente para se obter os valores de CV (%) e de precisão. A precisão e exatidão inter-ensaio (entre lotes) foram determinadas através da análise de valores médios das amostras de controle de qualidade a partir de três lotes de plasma analisadas em dias distintos.

3.1.10. **Sensibilidade**

O LIQ foi determinado para a clorpromazina com base em dois critérios: (a) a resposta do analito nesta concentração tinha que ser pelo menos cinco vezes maior que o ruído da linha de base e (b) a resposta de analito no LIQ poderia ser determinada com precisão igual ou inferior a 20% e exatidão entre 80-120%. Os cálculos basearam-se na análise de seis réplicas de amostras fortificadas na concentração do LIQ, obtendo-se precisão e exatidão intra- e interdia.

3.1.11. **Estabilidade**

A estabilidade de clorpromazina durante a validação do método foi avaliada em cinco repetições de plasma fortificado com clorpromazina nas concentrações CQB (1,5 ng/mL) e o CQA (160 ng/mL) submetidas a diferentes condições. A concentração de clorpromazina foi comparada com aquela obtida a partir de amostras preparadas imediatamente antes do ensaio, possibilitando expressar os resultados como percentagem de degradação.

Inicialmente, a estabilidade foi avaliada depois de três ciclos de congelamento e descongelamento. Após cada ciclo de congelamento a -20°C por 24h, as amostras foram deixadas descongelar à temperatura ambiente com

temperatura mantida a 22°C e foram, a seguir, congelados novamente para um novo ciclo de 24h. Alíquotas de todas as amostras foram quantificadas no final do terceiro ciclo de congelamento/descongelamento.

A estabilidade pós-processamento foi avaliada durante um período de 95h. Amostras plasmáticas fortificadas nas concentrações dos CQs foram submetidas à extração líquido-líquido e armazenadas à temperatura ambiente por 95h. Posteriormente, as amostras foram analisadas por CLUE-EM/EM.

Para avaliar as amostras de estabilidade de curto prazo, as amostras foram inicialmente descongeladas à temperatura ambiente (22°C) e mantidas sobre a bancada de trabalho durante um tempo superior ao tempo máximo esperado para a preparação de amostras de rotina (17h).

Estabilidade de longo prazo foi avaliada usando amostras congeladas a -20°C durante um período de 195 dias, suficiente para cobrir todo o tempo do estudo de bioequivalência.

Para a avaliação da estabilidade das soluções padrão, as soluções estoque de clorpromazina foram preparadas como descrito, armazenadas a 4°C e cinco repetições foram avaliados após 90 dias. Além disso, as soluções de trabalho foram armazenadas à temperatura ambiente e avaliadas após 17h. As soluções estoque e de trabalho do PI foram preparadas como descrito, armazenadas a 4°C ou à temperatura ambiente e cinco repetições foram avaliados após 88 dias ou 18 horas, respectivamente.

3.1.12. ***Estudo Farmacocinético***

O método analítico desenvolvido neste trabalho foi aplicado para avaliar comparativamente a concentração plasmática da clorpromazina após administração, em de duas formulações em comprimido de clorpromazina (100 mg) em voluntários saudáveis.

Setenta e dois voluntários saudáveis de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos e índice de massa corporal dentro do intervalo de 18,50 a 29,90, foram selecionados para o estudo após avaliação do seu estado de saúde por meio de avaliação clínica (exame físico, ECG) e dos testes laboratoriais: glicose

sanguínea, ureia, creatinina, TGO, TGP, fosfatase alcalina, γ -GT, bilirrubina total, albumina e proteínas totais, triglicérides, colesterol total, ácido úrico, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células brancas, exame de urina e teste de gravidez β HCG. Todos os indivíduos foram negativos para HIV, HCV e HBV.

Todos os indivíduos assinaram termo de consentimento informado e o estudo foi realizado em conformidade com: Declaração revisada de Helsinki, as regras de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP) e as Resoluções No.196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, Brasil. O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Campinas - UNICAMP, São Paulo, Brasil.

O estudo foi delineado como dose única, cruzado, aleatorizado, com um período de 14 dias de *washout* entre as doses. Os voluntários entraram na unidade de Farmacologia Clínica 10 h antes da administração do fármaco e saíram da unidade 14 h após o início da coleta de amostras. Para a coleta das amostras com tempos mais longos, os voluntários retornaram para a instalação clínica após o intervalo de 24 horas até a última coleta definida no protocolo clínico. Após a coleta da amostra de sangue pré-dose, cada voluntário recebeu uma única dose de clorpromazina (100 mg de uma formulação de comprimidos) acompanhado da ingestão de 200 ml de água. Os voluntários foram então mantidos em jejum durante 4 horas, período após o qual um almoço padrão foi servido. Nenhum outro alimento foi permitido durante o período de internação e o consumo de líquido foi permitido à vontade somente após o almoço (com a exceção de bebidas contendo xantina, incluindo chá, café e refrigerantes).

Os sujeitos foram monitorados ao longo do estudo e as formulações foram consideradas como sendo bem toleradas. As amostras de sangue foram recolhidas por cateter em tubos contendo EDTA nos tempos 20, 40 min e também 1, 1,33, 1,67, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96 e 144 horas após a administração. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 x g durante 10 min a 4°C e o plasma foi coletado e armazenado em tubo criogênico de polipropileno com tampa de rosca e

armazenados na temperatura de -20°C até serem submetidos a análise do teor de clorpromazina.

3.1.13. **Análise Estatística**

A bioequivalência entre as duas formulações foi avaliada através do cálculo das razões individuais entre as formulações teste/referência para o Cmax, área ASC0-t e ASC0-inf. Cmax e o Tmax (tempo em que o Cmax ocorre) foram obtidos diretamente a partir das curvas. A ASC0-t foi calculada aplicando-se a regra linear trapezoidal.

A constante da taxa de eliminação (*kel*) foi obtida através do declive da regressão linear dos valores da concentração transformados em log versus tempo na fase descendente da curva. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculado como $0,693/kel$. A ASC0-inf foi calculada como $ASC0-t+Ct/kel$, onde Ct foi a última concentração mensurável.

Os cálculos estatísticos foram conduzidos utilizando-se nível de significância $P \leq 0,10$ e a bioequivalência foi atingida quando o intervalo de confiança de 90,0% para Cmax, ASC0-t e ASC0-inf ficou dentro da faixa de 80,0-125,0%, como previamente definido pelo FDA e pela ANVISA. Entre os Softwares utilizados incluímos o Equivtest® 2.0, MS Excel® 97, Tinn-R1.1, Win-Edit® 2.0 e Scientific Work Place® 5.0.

3.2 RESULTADOS

3.2.1. *Linearidade e Especificidade*

O método mais simples de regressão para as curvas de calibração da clorpromazina foi $Y = a + bx(1/x^2)$ de 0,5 a 200 ng/mL. O coeficiente de correlação entre as diferentes curvas variou de 0,9954 a 0,9977.

Os tempos de retenção da clorpromazina e do PI foram de $0,80 \pm 0,15$ min e $0,60 \pm 0,15$ min, respectivamente e a razão sinal/ruído foi maior do que 7. Os cromatogramas obtidos a partir de plasma em branco fortificados com clorpromazina na concentração do LIQ (0,5 ng/mL) e ciclobenzaprina são apresentados na Figura 5. Não foi observada presença de pico de interferência quando a análise foi realizada usando dois outros lotes de plasma hiperlipêmicos ou hemolisados (Figura 6). Além disso, não houve supressão iônica significativa na região de eluição em que o analito e o padrão são eluídos.

Os cromatogramas obtidos pela análise das amostras de voluntários não apresentaram níveis detectáveis de clorpromazina antes da administração do fármaco (Figura 7a). Após administração das formulações aos voluntários, clorpromazina foi facilmente quantificada 20 min pós-dose com valores próximos do CQB (Figura 7b).

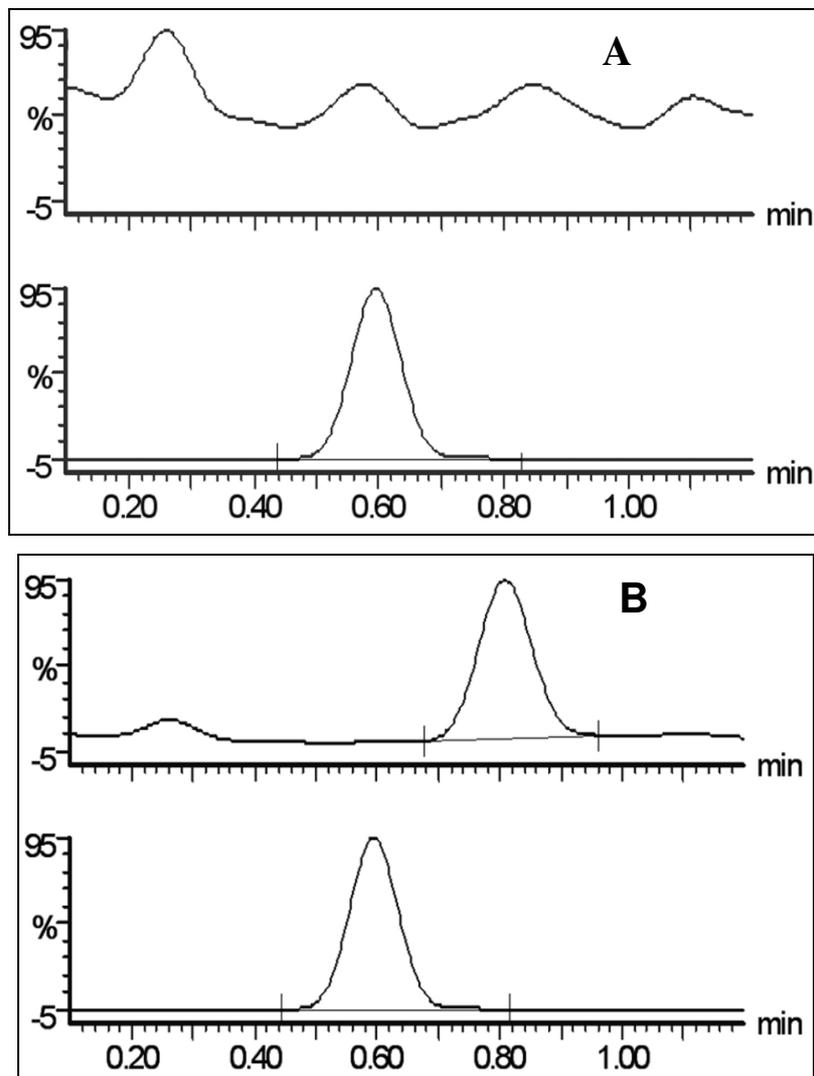


Figura 5. Cromatogramas do Monitoramento de Respostas Múltiplas (MRM) das amostras de plasma humano enriquecidas com clorpromazina ou ciclobenzaprina. Os painéis superiores mostram o canal de controle para a transição clorpromazina (m/z 319,1 > 85,9) na concentração do LIQ (0,5 ng/mL) e os painéis inferiores mostram o canal de controle para a transição da ciclobenzaprina (m/z 276,2 > 57,9). (A) amostras de plasma branco enriquecidas com ciclobenzaprina, (B) amostras de plasma branco enriquecidas com clorpromazina e ciclobenzaprina.

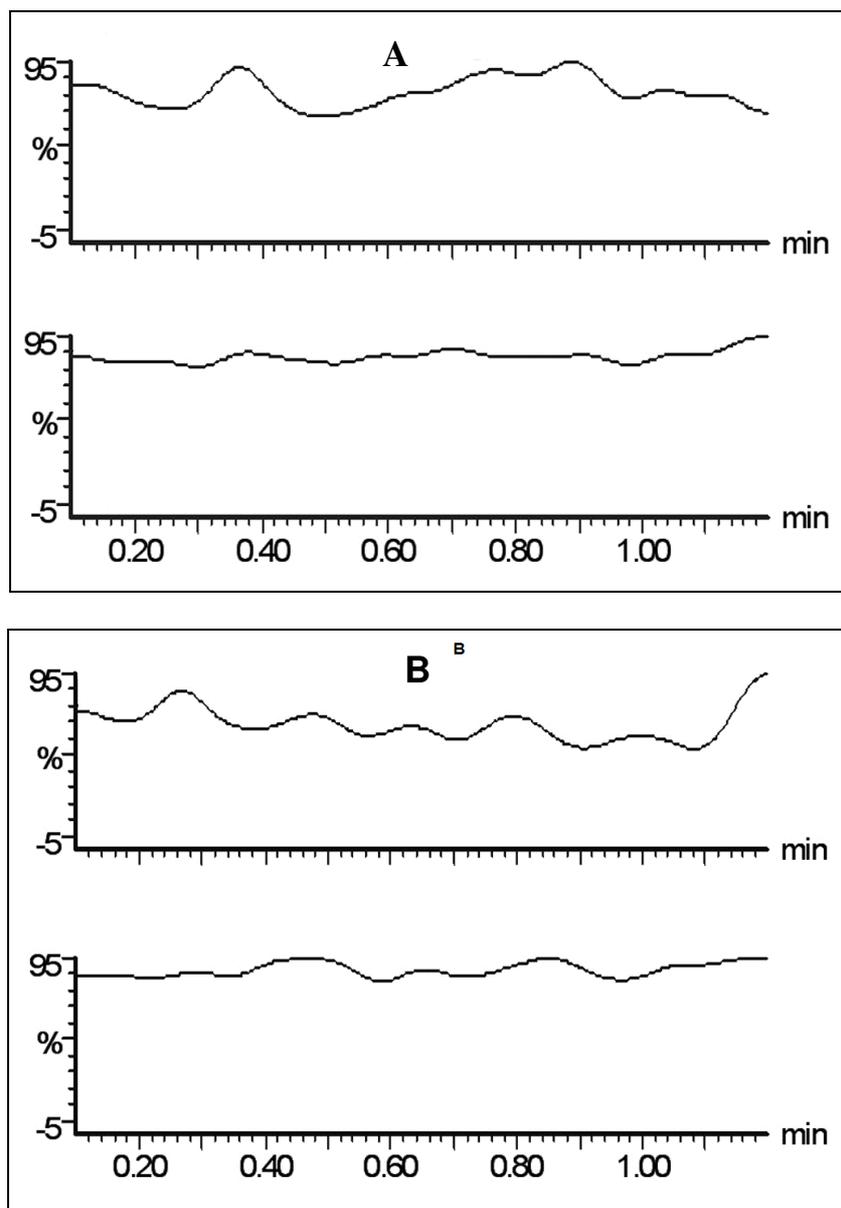


Figura 6. Especificidade da resposta e avaliação da presença de picos de resultantes de interferência no tempo de retenção para a clorpromazina e ciclobenzaprina após corrida cromatográfica em CLUE. Cromatogramas MRM de amostras de plasma branco para os canais de clorpromazina (painel superior) e ciclobenzaprina (painel inferior) utilizando os seguintes lotes de plasma: (A) hiperlipêmicos e (B) da amostra de plasma hemolisado.

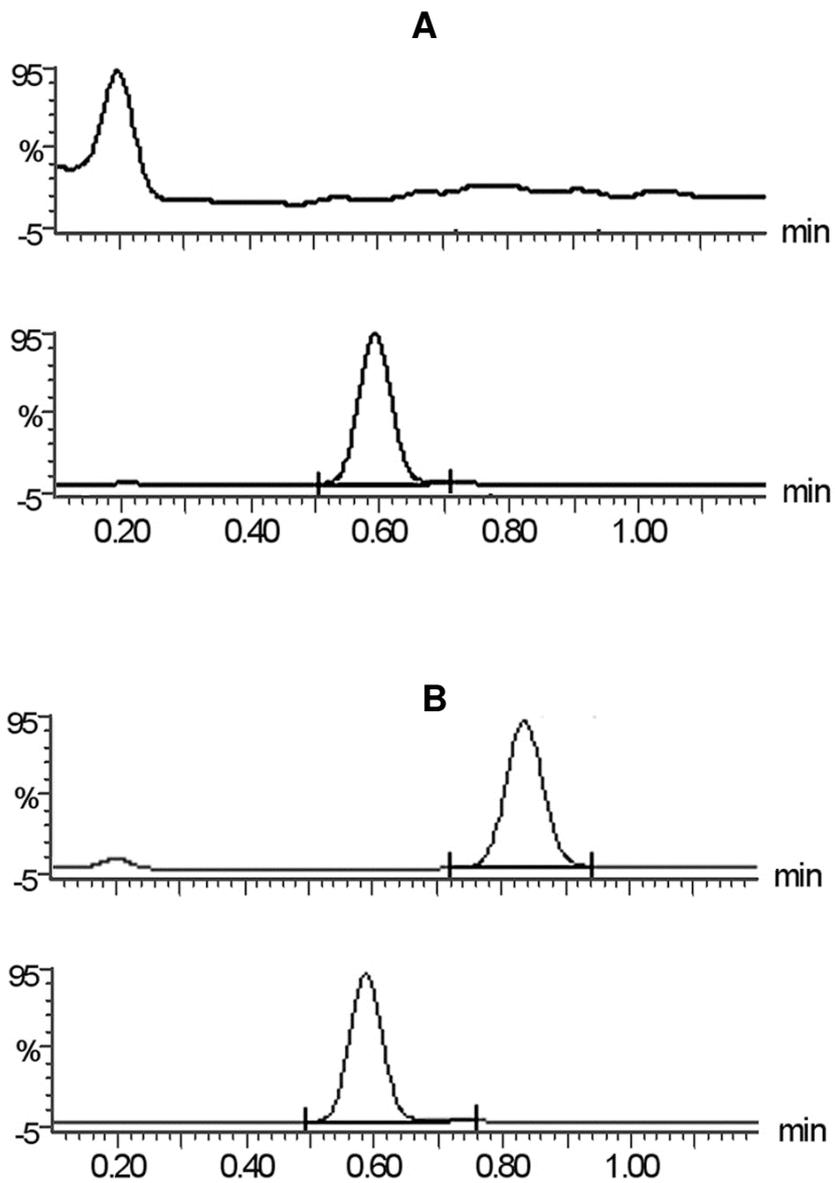


Figura 7. Cromatograma representativo de amostras de um mesmo voluntário mostrando a análise da amostra coletada antes da administração (A) e da amostra coletada 20 minutos após a administração de formulação referência (B). Painéis superiores mostram o canal de monitoramento para a transição de clorpromazina e os painéis inferiores mostram o canal de monitoramento para a transição da ciclobenzaprina.

3.2.2. **Recuperação**

Clorpromazina mostrou valores de recuperação (valores \pm CV (%), n = 5) para CQB, CQM e CQH em plasma humano normal, descritos a seguir: $74,8 \pm 9,3\%$, $70,6 \pm 4,8\%$ e $70,6 \pm 4,4\%$, respectivamente. A recuperação do PI foi de $74,9 \pm 4,6\%$. Valores de recuperação semelhantes foram obtidos para plasma hemolisada e lipêmicas.

3.2.3. **Precisão e Exatidão**

Precisão e exatidão intra-lote do ensaio foram determinadas para a clorpromazina em cada nível de CQ e são apresentados na Tabela 4. A precisão intra-ensaio variou de 2,4 a 5,8%, enquanto o valor inter-ensaio variou entre 3,6 a 9,9%. A precisão intra-ensaio variou de 96,9 a 102,5%, enquanto que a precisão inter-ensaio variou de 94,1 a 100,3%. Estes resultados estão dentro dos critérios de aceitação para precisão e exatidão, ou seja, valores do desvio ficaram dentro de $\pm 15\%$ dos valores nominais, exceto para LIQ, que pode apresentar um desvio de $\pm 20\%$.

Tabela 4. Precisão e exatidão da quantificação de clorpromazina em plasma humano. Os resultados foram obtidos durante os ensaios de validação do método analítico com as amostras de controle de qualidade (CQ) incluindo o limite inferior de quantificação (LIQ).

Amostras CQ	Nominal concentração (ng/mL)	Intra-ensaio exatidão ^a (%)	Inter-ensaio exatidão ^b (%)	Intra-ensaio precisão ^c (%CV)	Inter-ensaio precisão ^b (%CV)
LIQ	0,5	97,1	94,1	5,8	9,9
CQB	1,5	96,9	97,0	3,0	3,6
CQM	60,0	102,5	100,2	2,4	4,1
CQA	160,0	101,7	100,3	2,5	3,8

^a (n=6), expresso como: (concentração obtida/concentração nominal) X 100

^b Valores obtidos a partir de 3 corridas analíticas independentes (n=18)

^c n=6

3.2.4. **Estabilidade**

Os testes de estabilidade mostraram que a concentração da solução estoque de clorpromazina mostrou uma variação de apenas 2,8% entre as amostras frescas e armazenadas a 4°C durante 90 dias. Do mesmo modo, as soluções de trabalho armazenadas à temperatura ambiente foram estáveis após 7 h, com uma variação de apenas 8,4%. As soluções estoque e de trabalho também foram muito estáveis após 88 armazenados a 4°C dias ou 18h à temperatura ambiente. A variação observada nestes experimentos foi de 3,9 a 6,2%.

A estabilidade da clorpromazina foi avaliada em plasma humano e não demonstrou nenhuma degradação significativa após 6h à temperatura ambiente, três ciclos de congelamento e descongelamento, 95h pós-processamento, ou armazenadas durante 195 dias a -20 °C (Tabela 5).

Tabela 5. Teste de estabilidade da clorpromazina em plasma humano

	Média da conc. inicial (ng/mL)	% CV	Média da conc. final (ng/mL)	% CV	Varição (%)
Ciclos de congelamento e descongelamento (3 ciclos)					
CQB	1,50	4,2	1,63	1,6	8,5
CQA	171,05	0,8	168,38	2,0	-1,6
Curta duração (6 h)					
CQB	1,56	5,3	1,41	4,8	-9,7
CQA	166,76	1,9	159,00	1,9	-4,6
Pós-processamento (95 h)					
CQB	1,60	5,5	1,55	3,0	-2,9
CQA	168,32	1,4	168,62	6,5	0,2
Longa duração (195 dias, -20 °C)					
CQB	1,57	0,7	1,64	4,3	4,4
CQA	145,66	4,2	162,93	1,8	11,9

n=3 para cada teste.

CQB = 1,5 ng/mL; CQA = 160 ng/mL

3.2.5. *Estudo Farmacocinético*

A clorpromazina foi bem tolerada nas doses administradas e nenhuma reação adversa significativa não foi observada ou relatada. Nenhuma mudança clinicamente relevante foi observado em nenhum parâmetro bioquímico medido. Um total de 72 voluntários foram recrutados e 57 completaram o estudo. Dos 15 voluntários que não terminaram os dois períodos de confinamento foram excluídos devido ao seguintes motivos: 13 voluntários apresentaram razões pessoais e abandonaram o estudo após a primeira internação; 01 voluntário foi excluído por doença intercorrente com quadro de gastroenterocolite aguda após a primeira internação e impossibilitou de continuar o estudo; 01 voluntário foi excluído por evento adverso no segundo confinamento pelo relato de re-início de tratamento de glaucoma, cujo diagnóstico foi feito aos quatro anos de idade e este fato fora omitido pelo voluntário na etapa de recrutamento e seleção.

As curvas médias das concentrações plasmáticas de clorpromazina em função do tempo obtidas após uma dose oral única da formulação teste ou referência estão apresentadas na Figura 8. A concentração plasmática de clorpromazina não diferiram significativamente após a administração das duas formulações.

A Tabela 6 mostra os valores dos parâmetros farmacocinéticos e a Tabela 7 resume a análise de bioequivalência entre as formulações de clorpromazina. Resumidamente, a média geométrica e o respectivo intervalo de confiança (IC) 90% das razões entre as formulações de clorpromazina teste/referência foram de 97,46% (83,82; 113,31%) para C_{max} e 97,79% (86,95; 109,97%) para ASC_{0-t}.

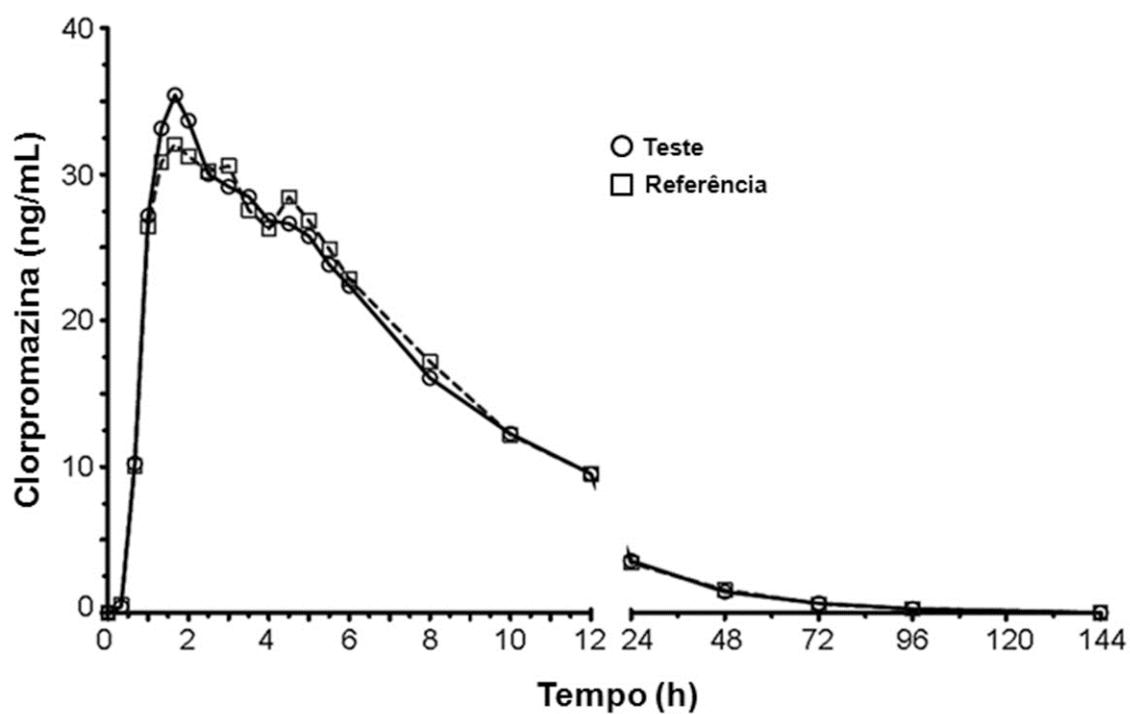


Figura 8. Gráfico da média das concentrações plasmáticas de clorpromazina versus tempo de coleta das amostras após administração das formulações teste ou referência contendo 100 mg de clorpromazina.

Tabela 6. Média aritmética dos parâmetros farmacocinéticos obtidas após administração das formulações teste e referência em comprimido com 100 mg de clorpromazina em 57 voluntários.

	Teste		Referência	
	Média	DP	Média	DP
C _{max} (ng/mL)	48,24	34,54	49,75	35,85
T _{max} (h)	2,58	1,37	2,73	1,89
T _{1/2} (h)	13,35	5,27	13,24	5,99
ASC0-t ([ng x h]/mL)	399,68	343,61	419,11	370,16
ASC0-inf ([ng x h]/mL)	417,61	347,33	434,33	371,39

Tabela 7. Média geométrica das razões individuais de ASC0-t, ASC0-inf e C_{max} (teste/referência) e os IC 90% correspondentes.

Parâmetro	Paramétrico (n=57)			
	Média geométrica (%)	CI 90%	Poder (%)	CV (%)
Razão ASC0-t %	97,79	86,95; 109,97	84%	38,81
Razão ASC0-inf %	98,58	88,24; 110,14	89%	36,49
Razão C _{max} %	97,46	83,82; 113,31	51%	51,00

3.3 DISCUSSÃO

Este foi o primeiro método descrito para a quantificação de clorpromazina em plasma humano, usando um método baseado em CLUE- EM/EM (133). O procedimento descrito neste trabalho está em conformidade com os requisitos do FDA e da ANVISA para a quantificação de drogas em estudos farmacocinéticos em humanos. O método analítico inclui uma extração líquido-líquido com éter dietílico/diclorometano (70/30, v/v), resultando em material extraído com grau de pureza suficiente para ser injetada no sistema cromatográfico. Este procedimento de extração, aliada à separação muito eficiente oferecida pelo sistema CLUE e a elevada seletividade do espectrômetro de massas no modo MRM com fonte de ionização eletrospray (CLUE-ES+/EM/EM) possibilitou um processo de quantificação muito sensível e reproduzível. Amostras de plasma branco a partir de todos os 57 voluntários mostraram cromatograma livre de picos interferentes no tempo de retenção do analito ou do padrão interno. O baixo LIQ (0,5 ng/mL) associado a uma rápida análise cromatográfica (2,0 min) representa o principal diferencial em relação aos métodos publicados na literatura que utilizam CLAE-EM/EM.

A concentração biológica de clorpromazina e outros antidepressivos têm sido avaliados na urina e soro humanos, bem como no plasma e tecido cerebral de ratos utilizando CLAE-EM/EM (72-74), GC-MS (56) e CLAE-UV (134). Alguns destes métodos fazem uso da extração líquido-líquido com éter isopropílico (74) ou t-butil éter de etilo (61), enquanto em outro trabalho os autores utilizaram precipitação de proteínas com uma mistura de acetonitrila/metanol (72). Métodos de extração mais sofisticados foram também descritos, como por exemplo a extração em fase sólida com cartucho Oasis MCX [26] para a determinação de vários sedativos hipnóticos em soro humano ou microextração dispersiva líquido-líquido (134) para a análise da clorpromazina na urina humana. No entanto, os tempos de corrida cromatográfica destes métodos foram entre 8-80 min.

O método descrito por Zhang et al. (74) mostrou LIQ de 0,2 ng/mL para a determinação de clorpromazina em plasma e cérebro de ratos, mas a separação

cromatográfica em 10 min é excessivamente longa para análise de um grande número de amostras provenientes de um estudo farmacocinético.

Yamini, et al (135) recentemente publicou um método utilizando CLAE-UV, utilizando extração em fase sólida (SPE) para quantificação de Clorpromazina em plasma, contudo com LIQ de 10 ng/mL.

Kirchherr et al. (72) também descreveram um método com LIQ inferior (0,27 ng/mL), mas o método representava a análise simultânea de uma série de 48 fármacos antidepressivos e antipsicóticos em soro humano utilizando também um tempo excessivamente longo de cromatografia (8 min). Uma vez que milhares de amostras de sangue são obtidas em um estudo de farmacocinética em humanos durante o período de confinamento, a separação muito rápida com o CLUE, combinada com LIQ baixo (0,5 ng/mL) faz com que este método seja adequado para ser aplicado ao longo de um estudo farmacocinético com plasma humano.

Devido ao seu excelente desempenho durante a validação, este método para a determinação de clorpromazina em plasma humano foi aplicado com sucesso em um estudo farmacocinético que visava avaliar a bioequivalência de duas formulações deste fármaco.

Após administração das formulações aos voluntários, foi verificada que a tolerabilidade das preparações foi excelente, como indicado pela ausência de qualquer efeito colateral significativo. Os intervalos de confiança de 90% para as razões das médias geométricas de C_{max}, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} de clorpromazina a partir dos resultados obtidos após administração tanto da formulação teste como da referência permaneceram dentro do intervalo de 80% a 125%, como proposto pelo FDA e ANVISA.

3.4 CONCLUSÃO

Este trabalho descreve um método rápido, sensível e robusto para quantificar clorpromazina no plasma humano utilizando ciclobenzaprina como padrão interno. Amostras extraídas foram analisadas por CLUE acoplado a espectrometria de massa. Este método está de acordo com os requisitos

propostos pela FDA de alta sensibilidade, especificidade e alto rendimento da amostra em ensaios comparativos farmacocinéticos tais como estudos de bioequivalência. A concentração mais baixa foi quantificada a 0,5 ng/mL com uma precisão adequada e precisão. O método descrito para a quantificação de clorpromazina em plasma humano foi aplicada com êxito em um estudo de bioequivalência de duas formulações de comprimidos com 100 mg de clorpromazina utilizando um processo aberto, aleatorizado, cruzado de dois períodos. Uma vez que o IC de 90% para as razões de C_{max} e ASC foram todas dentro do intervalo de 80-125%, concluiu-se que a formulação teste de clorpromazina é bioequivalente à formulação de referência em relação à taxa e extensão da absorção.

4. CAPÍTULO 2 - ONDANSETRONA

4.1 EXPERIMENTAL

4.1.1. *Materiais*

O padrão de referência Cloridrato de ondansetrona foi obtido diretamente da United States Pharmacopeia (USP) (Rockville, Maryland, EUA). Padrão interno ondansetrona-D3 foi adquirido da Synfine Research (Richmond Hill, Ontário, Canadá). Metanol, acetonitrila (grau CLAE) e éter metil-terc-butílico (MTBE) foram adquiridos da JT Baker (São Paulo, Brasil). Formato de amônio foi adquirido da Fluka-Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). Sangue humano foi coletado de doadores voluntários saudáveis e que não tomaram medicamentos ou drogas. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue na presença do anticoagulante EDTA (BD Vacutainer ®, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). Cada *pool* de plasma branco foi preparado e armazenado a -20°C até ser utilizado nos testes.

4.1.2. *Padrões de calibração e controles de qualidade*

O método de análise das amostra foi realizada seguindo as boas práticas de laboratório (BPL) e de acordo com as normas atuais para validação de método bioanalítico da ANVISA e do FDA.

Soluções estoque de ondansetrona e ondansetrona-d3 na concentração final de 1,0 mg/mL foram preparadas após a pesagem das moléculas e dissolução em metanol puro. As soluções de trabalho de ondansetrona foram preparadas por diluições em série da solução estoque em metanol-água (50:50, v/v) para se obter as concentrações finais de 2, 5, 20, 50, 100, 200, 400 e 600 ng/ml. A solução de trabalho de ondansetrona-d3 foi preparada por diluição da solução estoque em

água pura para se obter a concentração final de 30 ng/mL. As soluções estoque e de trabalho foram armazenadas a 4°C até à sua utilização.

As curvas de calibração para o ondansetrona foram preparadas em plasma pela diluição das soluções de trabalho (10 vezes) para se obter as concentrações finais de 0,2, 0,5, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 40,0 e 60,0 ng/mL. As análises foram realizadas em duplicada para cada concentração. As amostras de controle de qualidade foram preparadas em plasma branco nas concentrações de 0,2 (limite inferior de quantificação, LIQ), 0,6 (controle de qualidade, a baixo nível, CQB), 30,0 (controle de qualidade, a nível médio, CQM) e 50,0 ng/mL (controle de qualidade a nível elevado, CQA). As amostras de plasma fortificadas (padrões das curvas e os controles de qualidade) foram extraídas em cada lote de análise de amostras.

4.1.3. **Preparação de amostras.**

Após o descongelamento do plasma em temperatura ambiente, uma amostra de 50 µL de foi acondicionada em tubo de vidro seguida da adição de 25 µL da solução de trabalho do PI e 1,0 mL de MTBE. Após agitação no vórtex durante 20s, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g durante 3 min a 4°C e a fase orgânica foi transferida para outro tubo de vidro limpo submetido a evaporação do solvente sob fluxo de N₂ a 50°C. Os resíduos secos foram reconstituídos em 0,50 mL da mistura de acetonitrila-água (50:50, v/v) sob agitação vigorosa durante 10s e transferido para placas de 96 poços para posterior injeção no sistema cromatográfico.

4.1.4. **Condições cromatográficas**

Depois da extração, 10 µL das amostras foram injetados em uma pré-coluna Agilent Eclipse Zorbax® C18, 5 µm (12,5 x 4,5 mm ID) (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), em linha com uma coluna analítica Phenomenex Gêmeos® (Torrance, Califórnia, EUA) C18, 5 µm (75 x 4,6 mm ID), operando à temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila-água (50:50, v/v)

com 0,25 mM de formato de amônio sob fluxo de 0,80 mL/min. Sob estas condições, os tempos de retenção foram de $2,0 \pm 0,4$ min para ambos ondansetrona e ondansetrona-D3. O injetor automático foi mantido a 4°C e o tempo total da cromatografia foi de 3,0 min.

4.1.5. **Condições da Análise por Espectrometria de Massas**

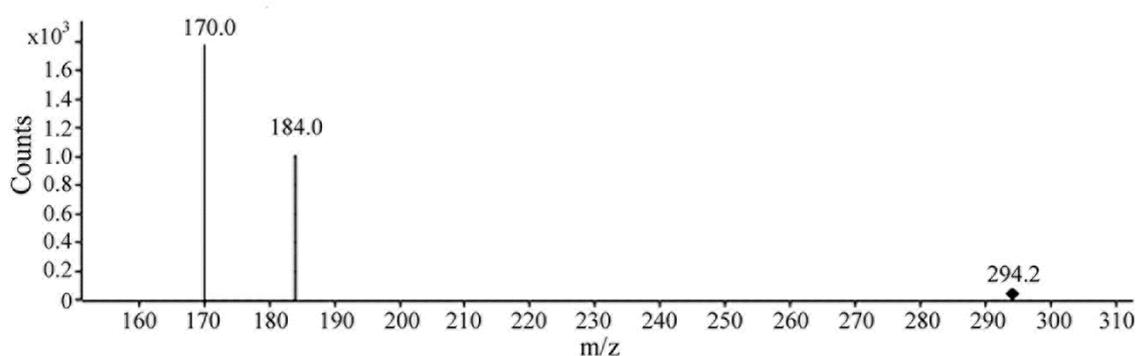
O sistema LC/MS/MS utilizado consistiu de um sistema de cromatografia líquida (modelo 1200, Agilent, Santa Clara, CA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo em série (modelo 6410, Agilent, Santa Clara, CA, EUA), equipado com fonte de ionização por electrospray operando (ESI) no modo ion positivo (ES+). Modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) foi utilizado para a detecção e análise das massas. Os parâmetros de ajuste foram otimizados para ondansetrona e ondansetrona-D3. O potencial do capilar do electrospray foi fixado a 4000 eV e nitrogênio foi utilizado como gás de secagem para evaporação do solvente (5L/min). As temperaturas dos gases de secagem e vaporização foram mantidos a 200°C e 325°C, respectivamente. O tempo de análise (Dwell Time) foi de 200 ms e a energia de colisão foi ajustada para 30 eV para ambos os compostos. Com base na verificação completa do espectro MS/MS de cada fármaco, os íons mais abundantes foram selecionados e o espectrômetro de massa foi ajustado para monitorar as transições dos íons precursores para os íons produto, como se segue: m/z 294,2→170,0 e m/z 294,2→184,0 para ondansetrona (Figura 9a), m/z 297,2→173,2 e m/z 297,2→187,0 para ondansetrona-D3 (Figura 9b) e com base nestas transições a via de fragmentação foi proposta (Figura 10). A aquisição e análise dos dados foram realizadas utilizando o software MassHunter B01.03.

4.1.6. **Linearidade**

As curvas de calibração foram construídas utilizando as razões das áreas entre os picos de ondansetrona e do PI em comparação com as concentrações nominais de ondansetrona-D3 dos oito padrões de referência em plasma (0,2, 0,5,

2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 40,0 e 60,0 ng/mL) analisados em duplicada. A análise de regressão linear foi efetuada com fator de ponderação $1/x^2$ a fim de avaliar a linearidade, bem como para obter a equação de calibração padrão: $y = ax + b$, onde y é a razão entre as áreas dos picos (analito/IS), " x " é a concentração, " a " representa o declive e " b " é a intercepção da linha de regressão. Além das amostras fortificadas com analito e IS, amostras de plasma branco (não fortificado) e uma amostra de plasma zero (fortificado apenas com IS) foram incluídas em cada corrida analítica para demonstrar a ausência de interferência.

A



B

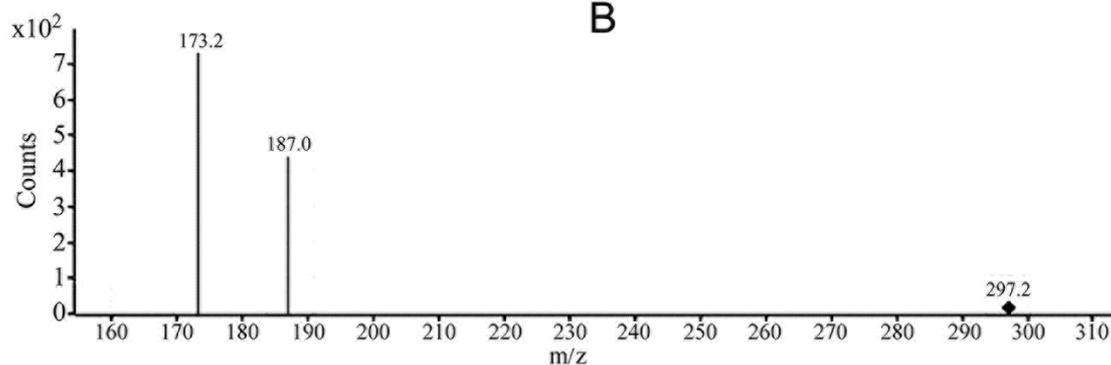


Figura 9. Espectro da varredura das massas de ondansetrona (A) e ondansetrona-D3 (B).

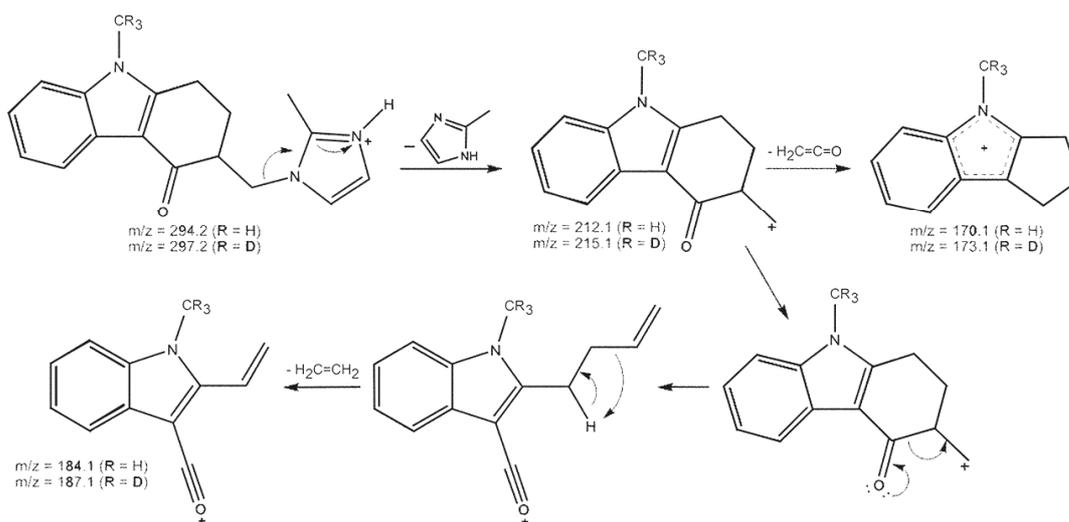


Figura 10. Rotas de fragmentação de ondansetrona e ondansetrona-D3. As rotas de fragmentação foram propostas de acordo com os resultados das transições obtidas: m/z 294.2 \rightarrow 170.0 e m/z 294.2 \rightarrow 184.0 para ondansetrona; m/z 297.2 \rightarrow 173.2 e m/z 297.2 \rightarrow 187.0 para ondansetrona-D3.

4.1.7. **Supressão Iônica**

Um procedimento para determinar o efeito de supressão iônica durante a análise MS/MS foi realizada através de um protocolo de infusão contínua do composto em estudo no detector MS (136, 137). O delineamento experimental consistiu de uma bomba de infusão ligado ao sistema por um "tee volume zero" antes do splitter e o sistema CLAE bombeando a mesma fase móvel utilizada na análise de rotina de ondansetrona. A bomba de infusão foi ajustada para transferir

a mistura do analito e do PI diluídos em fase móvel para o tubo de ligação entre a coluna de CLAE e a fonte de ionização do espectrômetro de massas. As concentrações do analito e do PI foram selecionadas de modo a atingir, pelo menos, 5 vezes a linha de base. O extrato reconstituído a partir de plasma em branco foi injetado no sistema CLAE enquanto a mistura padrão estava sendo infundida. A supressão de íons foi avaliada em três diferentes matrizes: plasma normal, hiperlipêmico e hemolisado. Estas amostras de plasma humano branco (*pool*) foram extraídas seguindo o mesmo procedimento de extração aplicado para as amostras do estudo. Neste sistema, qualquer supressão iônica resulta em uma depressão do sinal de MS.

4.1.8. **Recuperação**

As recuperações das extrações de ondansetrona e PI foram avaliadas pela comparação das proporções das áreas dos picos obtidas a partir de amostras de plasma extraídas com aquelas fortificadas após a extração de amostras brancas nas mesmas concentrações de cada nível de CQ (Recuperação Relativa). Este procedimento foi realizado utilizando-se cinco alíquotas de três fontes diferentes de plasma humano fortificados nas concentrações CQB (0,6 ng/mL), CQM (30 ng/mL) e CQA (50 ng/mL).

4.1.9. **Precisão e exatidão**

Durante o processo de validação, os parâmetros de precisão e exatidão do método foram avaliados utilizando três diferentes lotes de amostras de plasma branco fortificados nas concentrações de ondansetrona equivalente aos controles de qualidade (CQB, CQM e CQA). Além disso, a precisão e exatidão intra-lote também foram calculadas com a concentração equivalente ao LIQ. Para se determinar os parâmetros intra-ensaio, seis repetições de amostras de cada concentração mencionada acima foram analisadas simultaneamente para se obter os valores de CV (%) e de precisão. A precisão e exatidão inter-ensaio (entre

lotes) foram determinadas através da análise de valores médios das amostras de controle de qualidade a partir de três lotes de plasma analisados em dias distintos.

4.1.10. **Sensibilidade**

O LIQ foi determinado para a ondansetrona com base em dois critérios: (a) a resposta do analito nesta concentração tinha que ser pelo menos cinco vezes maior que o ruído da linha de base e (b) a resposta de analito no LIQ poderia ser determinada com precisão igual ou inferior a 20% e exatidão entre 80-120%. Os cálculos basearam-se na análise de seis réplicas de amostras fortificadas na concentração do LIQ, obtendo-se precisão e exatidão intra- e inter-dia.

4.1.11. **Estabilidade**

A estabilidade de ondansetrona durante a validação do método foi avaliada em cinco repetições de plasma fortificado com ondansetrona nas concentrações CQB (0,6 ng/mL) e o CQA (50 ng/mL) submetidas a diferentes condições. A concentração de ondansetrona foi comparada com aquela obtida a partir de amostras preparadas imediatamente antes do ensaio, possibilitando expressar os resultados como percentagem de degradação.

Inicialmente, a estabilidade foi avaliada depois de três ciclos de congelamento e descongelamento. Após cada ciclo de congelamento a -20°C por 24h, as amostras foram deixadas descongelar à temperatura ambiente com temperatura mantida a 22°C e foram, a seguir, novamente congeladas para um novo ciclo de 24h. Alíquotas de todas as amostras foram quantificadas no final do terceiro ciclo de congelamento/descongelamento.

A estabilidade pós-processamento foi avaliada durante um período de 48h. Amostras plasmáticas fortificadas nas concentrações dos CQs foram submetidas a extração líquido-líquido e armazenadas à temperatura ambiente por 95h antes da análise por CLAE-EM/EM.

Para avaliar as amostras de estabilidade de curto prazo, as amostras foram, inicialmente, descongeladas à temperatura ambiente (22°C) e mantidas sobre a

bancada de trabalho durante um tempo superior ao tempo máximo esperado para a preparação de amostras de rotina (7h).

Estabilidade de longo prazo foi avaliada usando amostras congeladas a -20°C durante um período de 81 dias, suficiente para cobrir todo o tempo do estudo de bioequivalência.

Para a avaliação da estabilidade das soluções padrão, as soluções estoque de ondansetrona foram preparadas como descrito, armazenadas a 25°C e cinco repetições foram avaliados após 7h. A estabilidade das soluções estoque e de trabalho foram avaliadas também em amostras armazenadas a -20°C durante 35 dias.

4.1.12. ***Estudo Farmacocinético***

O método analítico desenvolvido neste trabalho foi aplicado para avaliar comparativamente a concentração plasmática da ondansetrona após administração, em de duas formulações em comprimido de ondansetrona (8 mg) em voluntários saudáveis: Zofran® (lote no. (R279435V, formulação referência da Glaxosmithkline, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), e Ondansetrona (lote no. 07118501, formulação teste da Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil).

Vinte e oito voluntários saudáveis de ambos os sexos (14 homes e 14 mulheres), com idade entre 18 e 50 anos e índice de massa corporal dentro do intervalo de 18,50 a 29,90, foram selecionados para o estudo após avaliação do seu estado de saúde por meio de avaliação clínica (exame físico, ECG) e dos testes laboratoriais: glicose sanguínea, ureia, creatinina, TGO, TGP, fosfatase alcalina, γ -GT, bilirrubina total, albumina e proteínas totais, triglicérides, colesterol total, ácido úrico, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células brancas, exame de urina e teste de gravidez β HCG. Todos os indivíduos foram negativos para HIV, HCV e HBV.

Todos os indivíduos assinaram termo de consentimento informado e o estudo foi realizado em conformidade com: Declaração revisada de Helsinki, as

regras de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP) e as Resoluções No.196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, Brasil. O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Campinas - UNICAMP, São Paulo, Brasil.

O estudo foi delineado como dose única, cruzado, aleatorizado, com um período de 7 dias de *washout* entre as doses. Após a coleta da amostra de sangue pré-dose, cada voluntário recebeu uma única dose de ondansetrona (8 mg de uma formulação de comprimido) acompanhado da ingestão de 200 ml de água. Os voluntários foram então mantidos em jejum durante 4 horas, período após o qual um almoço padrão foi servido. Nenhum outro alimento foi permitido durante o período de internação e o consumo de líquido foi permitido à vontade somente após o almoço (com a exceção de bebidas contendo xantina, incluindo chá, café e refrigerantes). Os sujeitos foram monitorados ao longo do estudo e as formulações foram consideradas como sendo bem toleradas. As amostras de sangue foram recolhidas por cateter em tubos contendo EDTA nos tempos 10, 20, 40, 50 min e também 1, 1.33, 1.67, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 24, horas após a administração. Imediatamente após cada coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 x g durante 10 min a 4°C e o plasma foi coletado e armazenado em tubo criogênico de polipropileno com tampa de rosca e armazenados na temperatura de -20°C até serem submetidos a análise do teor de ondansetrona.

4.1.13. **Análise Estatística**

A bioequivalência entre as duas formulações foi avaliada através do cálculo das razões individuais entre as formulações teste/referência para o C_{max}, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf}. C_{max} e o T_{max} foram obtidos diretamente a partir das curvas. A ASC_{0-t} foi calculada aplicando-se a regra linear trapezoidal.

A constante da taxa de eliminação (*kel*) foi obtida através do declive da regressão linear dos valores da concentração transformados em log versus tempo na fase descendente da curva. O tempo de meia-vida (*t*_{1/2}) foi calculado como 0,693/*kel*. A ASC_{0-inf} foi calculada como ASC_{0-t}+C_t/*kel*, onde C_t foi a última concentração mensurável.

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando nível de significância $P \leq 0,10$ e a bioequivalência foi atingida quando o intervalo de confiança de 90,0% para C_{max} , $ASC0-t$ e $ASC0-inf$ ficou dentro da faixa de 80,0-125,0%, como previamente definido pelo FDA e pela ANVISA. Entre os Softwares utilizados incluímos o Equivtest® 2.0, MS Excel® 97, Tinn-R1.1, Win-Edit® 2.0 e Scientific Work Place® 5.0.

4.2 RESULTADOS

4.2.1. *Linearidade e especificidade*

O método mais simples de regressão para as curvas de calibração do ondansetrona foi $Y = a + bx$ para a faixa de concentração de 0,2 a 60 ng/mL. Os coeficientes de correlação variaram de 0,9918 a 0,9988.

Os cromatogramas obtidos a partir de amostras de plasma fortificado com ondansetrona na concentração do LIQ (0,2 ng/mL), comparado com plasma branco, são apresentados na Figura 11. O tempo de retenção tanto do analito como para o PI foi de $2,0 \pm 0,04$ min e a razão sinal-ruído foi superior a 7. Não houve supressão significativa de íons na região em que o analito e o padrão interno foram eluídos. Além disso, não houve pico de interferência quando a análise foi realizada usando lotes de plasma hiperlipêmicos e hemolisada.

Os cromatogramas obtidos pela análise das amostras de voluntários não apresentaram níveis detectáveis de ondansetrona antes da administração do fármaco. Após administração das formulações aos voluntários, ondansetrona foi facilmente quantificada 20 min pós-dose com valores entre LIQ e CQB.

4.2.2. *Recuperação*

Ondansetrona apresentou as recuperações (valores \pm CV (%), $n = 5$) para CQB, CQM e CQH como se segue: $88,8 \pm 5,7\%$, $86,4 \pm 6,8\%$ e $91,8 \pm 5,7\%$, respectivamente. A recuperação do PI foi de $83,0 \pm 1,4\%$.

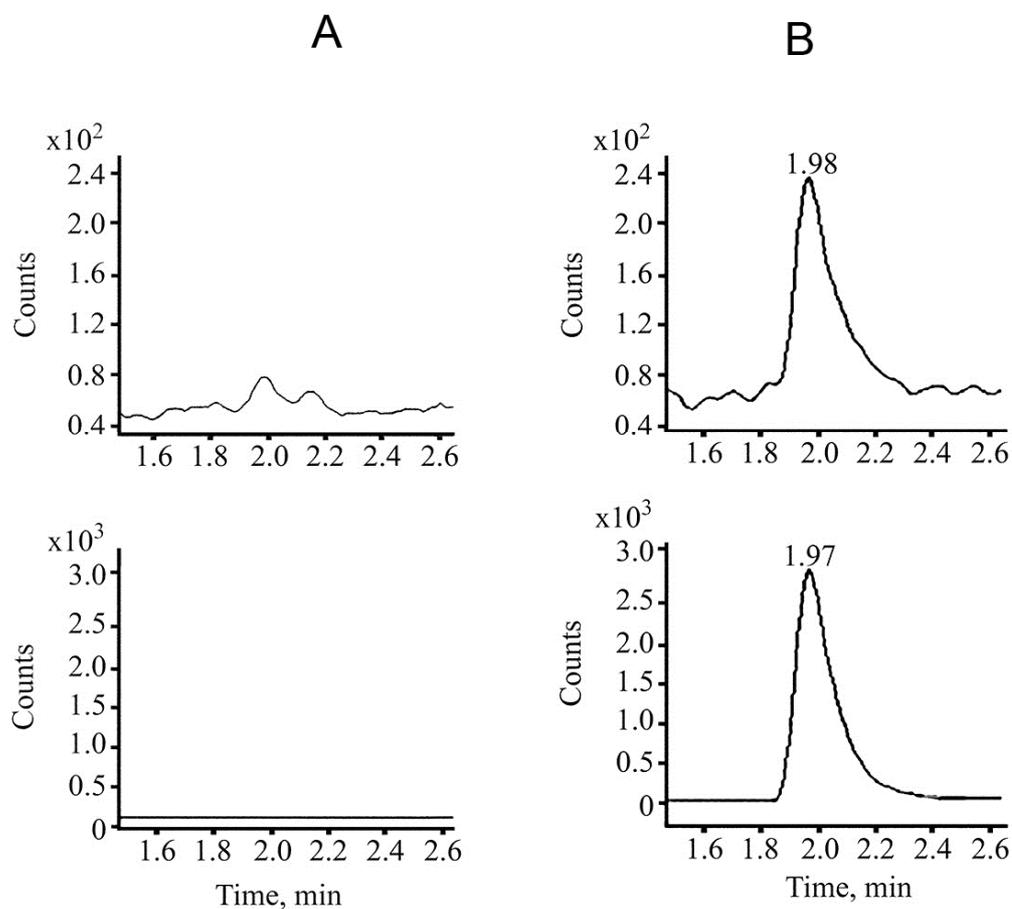


Figura 11. Cromatogramas do Monitoramento de Respostas Múltiplas (MRM) das amostras de plasma humano enriquecidas com ondansetrona ou ondansetrona-D3. Os painéis superiores mostram o canal de controle para a transição ondansetrona (m/z 294.2 \rightarrow 170.0 e m/z 294.2 \rightarrow 184.0) e os painéis inferiores mostram o canal de controle para a transição da ondansetrona-D3 (m/z 297.2 \rightarrow 173.2 e 297.2 \rightarrow 187.0). (A) amostras de plasma branco enriquecidas com ondansetrona-D3, (B) amostras de plasma branco enriquecidas com ondansetrona na concentração do LIQ (0,2 ng/mL) e ondansetrona-D3.

4.2.3. *Precisão e Exatidão*

Os valores de precisão e exatidão Intra-lote do ensaio para quantificação de ondansetrona foram medidos em cada nível de CQ e são apresentados na Tabela 8. A precisão intra-ensaio variou de 1,6 a 7,7%, enquanto os valores inter-ensaio variaram de 2,1 a 5,1%. As precisões intra-ensaio variaram de 97,5 a 108,2%, enquanto que a os valores inter-ensaio variaram de 97,3 a 107,0%. Como estabelecido pelos guias ANVISA e FDA, estes resultados estavam dentro dos critérios de aceitação para precisão e exatidão, ou seja, a variação foi no máximo de $\pm 15\%$ dos valores nominais, exceto para LIQ, que permite um desvio de $\pm 20\%$.

4.2.4. *Estabilidade*

De acordo com os resultados do teste de estabilidade, não houve degradação significativa da solução estoque após 7h de armazenamento à temperatura ambiente. Nesta condição, a variação entre as amostras frescas e armazenadas foi de -9,0%. Além disso, após 35 dias a -20°C, a variação entre as amostras frescas e armazenadas foi de 6,9%.

Os testes de estabilidade da ondansetrona no plasma humano não demonstraram nenhuma degradação significativa após 7h à temperatura ambiente, três ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento durante 48 horas à temperatura ou armazenadas durante 81 dias a -20°C (Tabela 9).

Tabela 8. Precisão e exatidão da quantificação de ondansetrona em plasma humano. Os resultados foram obtidos durante os ensaios de validação do método analítico com as amostras de controle de qualidade (CQ) incluindo o limite inferior de quantificação (LIQ).

Amostras CQ	Nominal (ng/mL)	Exatidão		Precisão	
		Intra- ensaio ^a (%)	Inter- ensaio ^b (%)	Intra- ensaio ^c (%CV)	Inter- ensaio ^b (%CV)
LIQ	0,2	105,6	-	7,0	-
CQB	0,6	97,5	97,3	7,7	5,1
CQM	30	108,2	106,6	1,6	2,1
CQA	50	107,9	107,0	4,5	3,3

^a (n=6), expresso como: (concentração obtida/concentração nominal) X 100

^b Valores obtidos a partir de 3 corridas analíticas independentes (n=18)

^c n=6

Tabela 9. Teste de estabilidade da ondansetrona em plasma humano

	Média da conc. inicial (ng/mL)	% CV	Média da conc. final (ng/mL)	% CV	Varição (%)
Ciclos de congelamento e descongelamento (3 ciclos)					
CQB	0,58	5,0	0,57	6,1	-1,7
CQA	53,3	2,6	48,4	4,7	-9,2
Curta duração (7h)					
CQB	0,58	5,0	0,60	13,5	2,4
CQA	53,3	2,6	48,5	2,0	-9,0
Pós-processamento (48h)					
CQB	0,58	5,0	0,58	7,7	0,0
CQA	53,3	2,6	54,7	2,0	2,6
Longa duração (81 dias)					
CQB	0,59	4,2	0,61	2,9	3,3
CQA	49,6	4,6	53,6	4,6	8,3

n=5 para cada teste

CQB = 0,60 ng/mL; CQA = 50 ng/mL

4.2.5. ***Estudo Farmacocinético***

A ondansetrona foi bem tolerada nas doses administradas e nenhuma reação adversa foi observada ou relatada. Nenhuma mudança clinicamente relevante foi observada em nenhum parâmetro bioquímico medido. Um total de 25 voluntários completou o estudo (12 homens e 13 mulheres). Dos 3 voluntários que não terminaram os dois períodos de confinamento foram excluídos, 1 voluntário alegou razões pessoais, 1 voluntário apresentou evento adverso de náusea e vômito após a administração da medicação no primeiro período e 1 voluntário apresentou evento adverso de eczema perioral após ter recebido alta no primeiro período. A curva das concentrações médias de ondansetrona no plasma versus tempo, obtida após administração de uma dose oral única de cada formulação, é apresentada na Figura 12. As concentrações plasmáticas de ondansetrona não diferiram significativamente após a administração das formulações teste ou de referência.

A Tabela 10 mostra os valores dos parâmetros farmacocinéticos e a Tabela 11 resume os valores da análise de bioequivalência entre as formulações de ondansetrona. Resumidamente, a média geométrica e o respectivo intervalo de confiança (IC) 90% das razões entre as formulações de ondansetrona teste/referência foram de 90,15% (81,74-99,44%) para C_{max} e 93,11% (83,01-104,43%) para ASC_{0-t}.

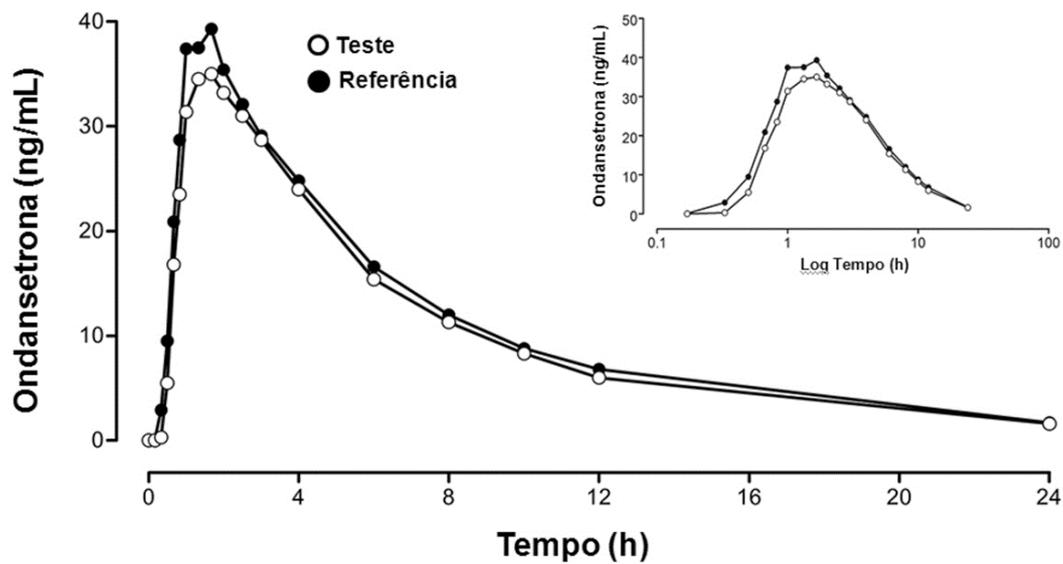


Figura 12. Gráfico da média das concentrações plasmáticas de ondansetrona versus tempo de coleta das amostras após administração das formulações teste ou referência contendo 8 mg de ondansetrona. O painel interno mostra a representação dos resultados em escala semi-log.

Tabela 10. Média aritmética dos parâmetros farmacocinéticos obtidas após administração das formulações teste e referência em comprimido com 8 mg de ondansetrona em 25 voluntários.

	Teste		Referência	
	Média	DP	Média	DP
C _{max} (ng/mL)	42,30	16,99	47,55	22,73
T _{max} (h)	1,51	0,62	1,30	0,46
T _{1/2} (h)	5,66	0,96	5,79	1,68
ASC _{0-t} ([ng x h]/mL)	247,14	113,82	266,88	133,23
ASC _{inf} ([ng x h]/mL)	261,11	124,25	283,12	143,39

Tabela 11. Média geométrica das razões individuais de ASC_{0-t}, ASC_{0-inf} e C_{max} (teste/referência) e os IC 90% correspondentes.

Parâmetros	Paramétrico (n=25)			
	Média Geométrica (%)	90% CI	Power (%)	CV (%)
Razão ASC _{0-t} %	93,11	83,02 – 104,43	99	23,99
Razão ASC _{inf} %	92,16	82,25 – 103,26	99	23,78
Razão C _{max} %	90,15	81,74 – 99,44	98	20,42

4.3 DISCUSSÃO

Amostras de plasma branco, obtidas a partir de todos os 25 voluntários, foram analisadas por CLAE-EM/EM e mostraram cromatogramas sem nenhum pico ou ruído significativo no tempo de retenção do analito ou padrão interno.

O método analítico para quantificação de ondansetrona em plasma humano descrito neste trabalho oferece vantagens sobre os anteriormente relatados utilizando CLAE- EM/EM (99-102), apresentando um LIQ validado de 0,2 ng/mL associado ao menor tempo de análise cromatográfica descrita (2,5 min) e volume de plasma muito baixo (50 µL) utilizado na etapa de extração da ondansetrona, possibilitando a coleta de volume menor de sangue durante o estudo farmacocinético, uma vez que um elevado número de amostras de sangue é necessário em cada período de confinamento (17 para cada voluntário nesse estudo). O volume de plasma utilizado durante a extração do analito torna-se um parâmetro crítico a ser considerado para reduzir a quantidade de sangue coletada, reduzindo assim os riscos durante estes períodos de confinamento.

A preparação da amostra faz uso de uma extração líquido-líquido que apesar do protocolo simples, mostrou reprodutibilidade e foi suficiente para proporcionar uma limpeza eficaz da amostra.

Em comparação com os métodos CLAE- EM/EM para quantificação da ondansetrona publicados anteriormente, o nosso LIQ é significativamente menor que 1,0 ng/mL descrito por Xu et al. (102) e 2,0 ng/mL descrito por Armando et al. (2009) (99). Além disso, estes dois métodos descrevem uma análise cromatográfica significativamente mais longa, com tempos de corrida de 20 e 6 minutos, respectivamente. Uma vantagem adicional do nosso método é o volume significativamente menor de plasma humano utilizado para a extração do analito. Como já descrito acima, utilizamos apenas 50 µL de plasma, enquanto outros utilizaram volumes a partir de 200 µL (99-102). Outros métodos cromatográficos e de detecção foram utilizados em trabalhos anteriores visando a quantificação de ondansetrona no plasma humano. Estes métodos incluem a separação quiral para

a determinação das formas R(-) e S(+), CLAE acoplado a detecção por UV (97, 98). ou ainda eletroforese capilar de alta performance com heptaquis-(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina como um modificador de fase móvel (92). Estes métodos mostraram pouca sensibilidade como evidenciado pelo LIQ que variou de 10 a 15 ng/mL, não sendo apropriados para a medição dos níveis de ondansetrona em estudos farmacocinéticos. Mesmo a utilização de um método laborioso e caro para extração da ondansetrona em fase sólida (94, 95) resultou em faixa de quantificação entre 1 a 20 mg/ml, o que também não é adequado para um estudo farmacocinético como apresentado neste estudo.

No que respeita à extração, o processo em fase sólida têm sido usados por outros autores (98, 102), obtendo excelente sensibilidade com LIQ de 0,1 ng/mL. No entanto, a corrida cromatográfica longo de 12 min e os 200 μ L de plasma necessários para a extração de ondansetrona torna esse método analítico menos atraente para os estudos de bioequivalência.

Outros autores utilizaram extração líquido-líquido com grandes volumes de solventes (93, 96, 138). Uma exceção é o método descrito por Dotsikas et al (2006) (100) que relata a extração de ondansetrona com um volume menor (600 μ L) de solvente, utilizando-se o processo de extração semi-automatizado. O método descrito por Dotsikas et al. (2006) (100) apresenta um LIQ ligeiramente superior (0,25 ng/mL) e uma corrida cromatográfica ligeiramente mais rápida (2 min). No entanto, estes autores utilizaram um volume de plasma 5 vezes maior (250 μ L). Provavelmente, o desempenho desse método seria comprometido seriamente caso os autores tivessem utilizado o mesmo volume de plasma utilizado em nosso trabalho.

Ninama et al (2013) (141), descreve um método de extração em fase sólida utilizando CLAE-EM/EM com corrida cromatográfica semelhante de aproximadamente 3 minutos, mas o LIQ de 1 ng/mL representa valor superior ao nosso limite que foi de 0,2 ng/mL. Outro ponto de destaque é uso de 200 μ L de amostra de plasma frente a 50 μ L utilizado pelo nosso método e a recuperação média de 81,50% para ondansetrona frente aos 89,00% obtidos em nosso método.

Uma vez que o nosso método fornece excelente desempenho analítico para a extração de ondansetrona e provou ser adequado para a análise de amostras de plasma humano, ele foi utilizado com sucesso em um estudo farmacocinético de duas formulações de ondansetrona em humanos.

A análise clínica dos voluntários mostrou que a tolerabilidade de todas as preparações foi excelente, como indicado pela ausência de qualquer efeito colateral significativo. Os respectivos intervalos de confiança de 90% para as razões das médias geométricas de C_{max}, ASC_{0-t} e valores ASC_{0-inf} de ondansetrona absorvido a partir tanto do teste e as formulações de referência foram incluídos no intervalo de 80% a 125%, tal como proposto pelo FDA e ANVISA.

4.4 CONCLUSÃO

Este trabalho descreve um método rápido, sensível e robusto para quantificar ondansetrona no plasma humano utilizando ondansetrona-D3 como padrão interno. As amostras extraídas foram analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho, acoplada a espectrometria de massas. Este método está de acordo com os requisitos propostos pela *Food and Drug Administration* (EUA) de alta sensibilidade, especificidade e alto rendimento da amostra em ensaios farmacocinéticos comparativos, tais como estudos de bioequivalência. A menor concentração quantificada foi de 0,2 ng/mL com precisão e exatidão adequadas. O método descrito para a quantificação de ondansetrona no plasma humano foi aplicada com êxito em um estudo de bioequivalência de duas formulações de ondansetrona em comprimidos com 8 mg, utilizando um processo aberto, aleatorizado, cruzado de dois períodos. Uma vez que o IC de 90% para as razões do C_{max} e da ASC ficaram dentro do intervalo de 80-125%, concluiu-se que a formulação de teste de ondansetrona é bioequivalente à formulação de referência no que diz respeito tanto à taxa e extensão como de absorção.

5. CAPÍTULO 3 - IMIPRAMINA

5.1 EXPERIMENTAL

5.1.1. *Materiais*

O padrão de referência cloridrato de Imipramina foi obtido diretamente da United States Pharmacopeia (USP, Lote I) (Rockville, Maryland, EUA). Padrão interno cloridrato de ciclobenzaprina (Lote 038K1021) foi adquirido da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Ácido fórmico, Metanol, acetonitrila (grau CLAE), diclorometano e éter metil-terc-butílico (MTBE) foram adquiridos da JT Baker (São Paulo, Brasil). Água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). Sangue humano foi coletado de doadores voluntários saudáveis e que não tomaram medicamentos ou drogas. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue na presença do anticoagulante Heparina de Lítio (BD Vacutainer® Plus, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). Cada *pool* de plasma branco foi preparado e armazenado a -20°C até ser utilizado nos testes.

5.1.2. *Padrões de calibração e controles de qualidade*

O método de análise das amostras foi realizada seguindo as boas práticas de laboratório (BPL) e de acordo com as normas atuais para validação de método bioanalítico da ANVISA e do FDA.

Soluções estoque de imipramina e ciclobenzaprina na concentração final de 0,5 mg/mL foram preparadas após a pesagem das moléculas e dissolução em metanol puro. As soluções de trabalho de imipramina foram preparadas por diluições em série da solução estoque em metanol-água (50:50, v/v) para se obter as concentrações finais de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 ng/ml. A solução de trabalho de ciclobenzaprina foi preparada por diluição da solução estoque em

metanol-água (50:50, v/v) para se obter a concentração final de 100 ng/mL. As soluções estoque e de trabalho foram armazenadas a 4°C até à sua utilização.

As curvas de calibração para a imipramina foram preparadas em plasma pela diluição das soluções de trabalho (10 vezes) para se obter as concentrações finais de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 e 20,0 ng/mL. As análises foram realizadas em duplicata para cada concentração. As amostras de controle de qualidade foram preparadas em plasma branco nas concentrações de 0,1 (limite inferior de quantificação, LIQ), 0,3 (controle de qualidade baixo, CQB), 8,0 (controle de qualidade médio, CQM) e 16,0 ng/mL (controle de qualidade alto, CQA). As amostras de plasma fortificadas (padrões das curvas e os controles de qualidade) foram extraídas em cada lote de análise de amostras.

5.1.3. **Preparação de amostras.**

Após o descongelamento do plasma em temperatura ambiente, uma amostra de 300 µL foi acondicionada em tubo de vidro seguida da adição de 50 µL da solução de trabalho do padrão interno e 2 mL de mistura de éter dietílico/diclorometano (60/40; v/v). Após agitação no vórtex durante 60s, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g durante 1 min a 4°C e a fase orgânica foi transferida para outro tubo de vidro limpo submetido a evaporação do solvente sob fluxo de N₂ a 50°C. Os resíduos secos foram reconstituídos em 100 µL da mistura de acetonitrila-água (50:50, v/v) sob agitação vigorosa durante 20s e transferido para placas de 96 poços para posterior injeção no sistema cromatográfico.

5.1.4. **Condições cromatográficas**

Depois da extração, 7,5 µL das amostras foram injetados em uma coluna Aquity CLUE BEH C18 1,7 µm (100 x 2,1 mm de diâmetro interno), operando a 40°C. A fase móvel utilizada era composta de uma mistura de 65% de água com 1% de ácido fórmico e 35% de acetonitrila a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O sistema de amostragem automática foi mantido a 12°C e o tempo total de corrida

cromatográfica foi de 2,0 min. Sob estas condições, os tempos de retenção foram de $1,6 \pm 0,1$ min tanto para imipramina como para ciclobenzaprina.

5.1.5. **Condições da Análise por Espectrometria de Massas**

A detecção foi realizada utilizando espectrômetro de massa Waters Q-Premier XE em tandem equipado com ionização por electrospray (ES) e fonte operando no modo de positivo (ES+). Parâmetros de interface foram otimizados durante a infusão da imipramina e ciclobenzaprina através da interface de controle com o sistema CLUE. As configurações de MS selecionadas foram: tensão capilar de 3.5kV, tensão de cone de 30 V, temperatura da fonte de 110°C, temperatura de dessolvatação de 400°C, energia de colisão de 18 eV para imipramina e 20 eV para ciclobenzaprina, tempo de permanência (dwell time) de 0,15s para cada transição. Com base na verificação do espectro MS/MS completo de cada fármaco, os íons mais abundantes foram selecionados. O espectrômetro de massa foi então ajustado para monitorar as transições dos íons precursores que deram origem aos respectivos produtos. As transições selecionadas foram: transição $281,1 > 85,8$ m/z monitorada para imipramina (Figura 13a) e transição $276,2 > 57,9$ m/z para ciclobenzaprina (Figura 13b). Aquisições de dados e análise foram realizadas com o software Analyst (versão 1.4.2).

5.1.6. **Linearidade**

As curvas de calibração foram construídas utilizando as razões das áreas entre os picos de imipramina e do PI em comparação com as concentrações nominais de imipramina dos oito padrões de referência em plasma (0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 e 20,0 ng/mL) analisados em duplicata. A análise de regressão linear foi efetuada com fator de ponderação $1/x^2$ a fim de avaliar a linearidade, bem como para obter a equação de calibração padrão: $y = ax + b$, onde y é a razão entre as áreas dos picos (analito/PI), "x" é a concentração, "a" representa o declive e "b" é a intercepção da linha de regressão. Além das amostras fortificadas com analito e IS, amostras de plasma branco (não fortificado) e uma amostra de

plasma zero (fortificado apenas com IS) foram incluídas em cada corrida analítica para demonstrar a ausência de interferência.

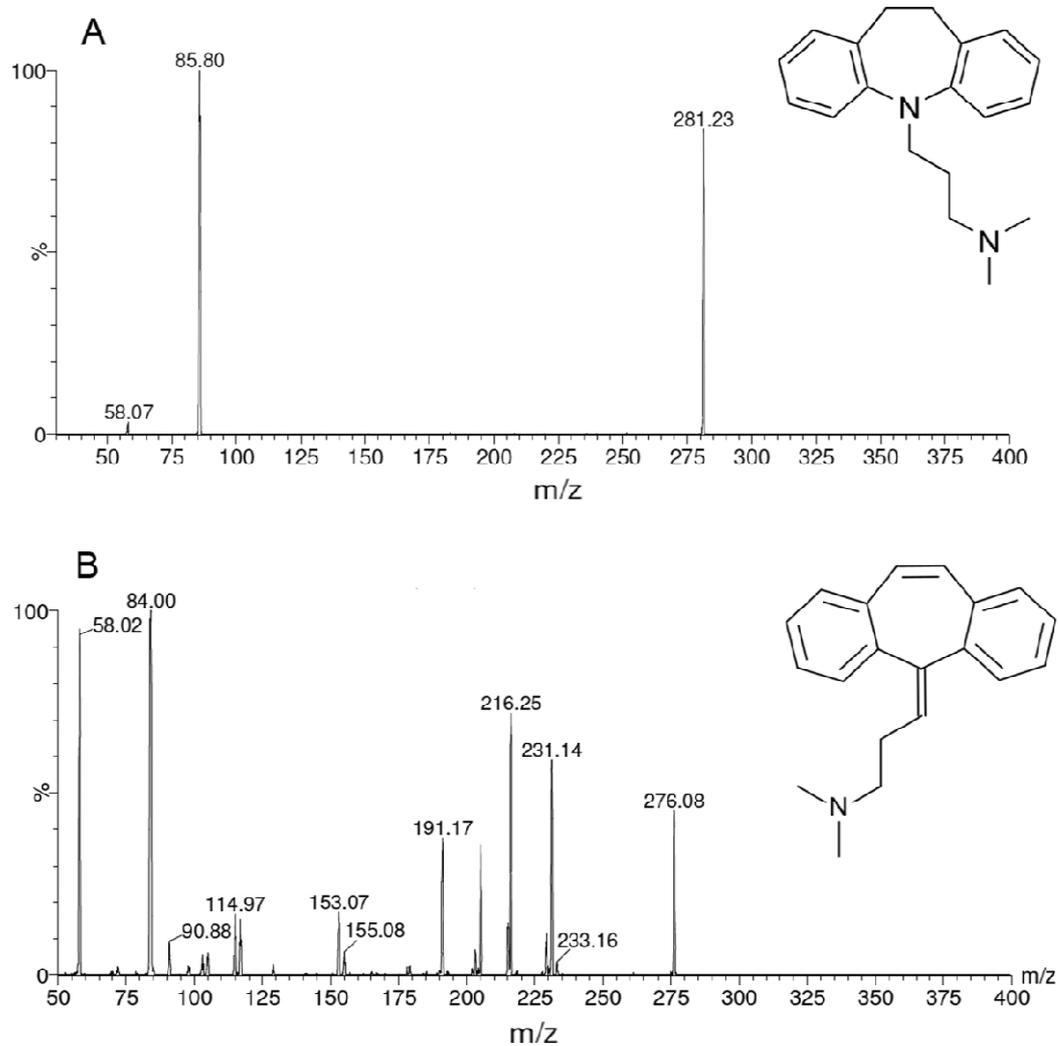


Figura 13. Espectro da varredura das massas de imipramina (A) e ciclobenzaprina (B).

5.1.7. **Supressão Iônica**

Um procedimento para determinar o efeito de supressão iônica durante a análise MS/MS foi realizada através de um protocolo de infusão contínua do composto em estudo no detector MS (136, 137). O delineamento experimental consistiu de uma bomba de infusão ligado ao sistema por um "tee volume zero" antes do splitter e o sistema CLAE bombeando a mesma fase móvel utilizada na análise de rotina de imipramina. A bomba de infusão foi ajustada para transferir a mistura do analito e do PI diluídos em fase móvel para o tubo de ligação entre a coluna de CLAE e a fonte de ionização do espectrômetro de massas. As concentrações do analito e do PI foram selecionadas de modo a atingir, pelo menos, 5 vezes a linha de base. O extrato reconstituído a partir de plasma em branco foi injetado no sistema CLAE enquanto a mistura padrão estava sendo infundida. A supressão de íons foi avaliada em três diferentes matrizes: plasma normal, hiperlipêmico e hemolisado. Estas amostras de plasma humano branco (*pool*) foram extraídas seguindo o mesmo procedimento de extração aplicado para as amostras do estudo. Neste sistema, qualquer supressão iônica resulta em uma depressão do sinal de MS.

5.1.8. **Recuperação**

Os valores de recuperação das extrações de imipramina e PI foram avaliados pela comparação das proporções das áreas dos picos obtidas a partir de amostras de plasma extraídas com aquelas fortificadas após a extração de amostras brancas nas mesmas concentrações de cada nível de CQ (Recuperação Relativa). Este procedimento foi realizado utilizando-se cinco alíquotas de três fontes diferentes de plasma humano fortificados nas concentrações CQB (0,3 ng/mL), CQM (8 ng/mL) e CQA (16 ng/mL).

5.1.9. **Precisão e exatidão**

Durante o processo de validação, os parâmetros de precisão e exatidão do método foram avaliados utilizando três diferentes lotes de amostras de plasma branco fortificados nas concentrações de imipramina equivalente aos controles de qualidade (CQB, CQM e CQA). Além disso, a precisão e exatidão intra-lote também foram calculadas com a concentração equivalente ao LIQ. Para se determinar os parâmetros intra-ensaio, seis repetições de amostras de cada concentração mencionada acima foram analisadas simultaneamente para se obter os valores de CV (%) e de precisão. A precisão e exatidão inter-ensaio (entre lotes) foram determinadas através da análise de valores médios das amostras de controle de qualidade a partir de três lotes de plasma analisados em dias distintos.

5.1.10. **Sensibilidade**

O LIQ foi determinado para a imipramina com base em dois critérios: (a) a resposta do analito nesta concentração tinha que ser pelo menos cinco vezes maior que o ruído da linha de base e (b) a resposta de analito no LIQ poderia ser determinada com precisão igual ou inferior a 20% e exatidão entre 80-120%. Os cálculos basearam-se na análise de seis réplicas de amostras fortificadas na concentração do LIQ, obtendo-se precisão e exatidão intra-dia e inter-dia.

5.1.11. **Estabilidade**

A estabilidade de imipramina durante a validação do método foi avaliada em cinco repetições de plasma fortificado com imipramina nas concentrações CQB (0,3 ng/mL) e o CQA (16 ng/mL) submetidas a diferentes condições. A concentração de imipramina foi comparada com aquela obtida a partir de amostras preparadas imediatamente antes do ensaio, possibilitando expressar os resultados como percentagem de degradação.

Inicialmente, a estabilidade foi avaliada depois de três ciclos de congelamento e descongelamento. Após cada ciclo de congelamento a -20°C por 24h, as amostras foram deixadas descongelar à temperatura ambiente com

temperatura mantida a 22°C e foram, a seguir, novamente congeladas para um novo ciclo de 24h. Alíquotas de todas as amostras foram quantificadas no final do terceiro ciclo de congelamento/descongelamento. A estabilidade pós-processamento foi avaliada em amostras plasmáticas fortificadas nas concentrações dos CQs foram submetidas a ensaio de extração líquido-líquido e armazenadas à temperatura de 2 a 8°C por 161h antes da análise por CLUE-EM/EM. Para avaliar as amostras de estabilidade de curto prazo, as amostras foram, inicialmente, descongeladas à temperatura ambiente (22°C) e mantidas sobre a bancada de trabalho durante um tempo superior ao tempo máximo esperado para a preparação de amostras de rotina (20h). Estabilidade de longo prazo foi avaliada usando amostras congeladas a -20°C durante um período de 119 dias, suficiente para cobrir todo o tempo do estudo de bioequivalência.

Para a avaliação da estabilidade das soluções padrão, as soluções estoque de imipramina foram preparadas como descrito, armazenadas a temperatura ambiente e cinco repetições foram avaliados após 8h. As estabilidades das soluções estoque e de trabalho foram avaliadas também em amostras armazenadas a -20°C durante 36 dias.

5.1.12. ***Estudo Farmacocinético***

O método analítico desenvolvido neste trabalho foi aplicado para avaliar comparativamente a concentração plasmática da imipramina após administração, em de duas formulações em comprimido revestido de cloridrato de imipramina (25 mg) em voluntários saudáveis: Tofranil® (lot no. Z0062, formulação referência da Novartis Biociências S.A., Taboão da Serra, SP, Brazil), e Imipramina (lot no. 09010482, formulação teste da Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil).

Trinta e seis voluntários saudáveis de ambos os sexos, com idade entre 18 a 50 anos e índice de massa corporal dentro do intervalo de 18,5 a 29,9, foram selecionados para o estudo após avaliação do seu estado de saúde por meio de avaliação clínica (exame físico, ECG) e dos testes laboratoriais: glicose sanguínea,

uréia, creatinina, TGO, TGP, fosfatase alcalina, γ -GT, bilirrubina total, albumina e proteínas totais, triglicérides, colesterol total, ácido úrico, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células brancas, exame de urina e teste de gravidez β HCG. Todos os indivíduos foram negativos para HIV, HCV e HBV.

Todos os indivíduos assinaram termo de consentimento informado e o estudo foi realizado em conformidade com: Declaração revisada de Helsinki, as regras de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP) e as Resoluções No.466/12 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, Brasil. O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Campinas - UNICAMP, São Paulo, Brasil.

O eletrocardiograma de cada voluntário foi avaliado no pré-confinamento por um cardiologista da equipe de avaliação clínica. O relatório do ECG faz parte da documentação do estudo. A pressão arterial foi considerada como normal dentro dos seguintes limites: 90-139 mmHg para a sistólica e 50-89 mmHg para a diastólica. A frequência cardíaca dentro de 50-100 b.p.m foi considerada normal. A temperatura corporal dentro de 35,5°C a 37,5°C foi considerada normal.

O estudo foi delineado como dose única, cruzado, aleatorizado, com um período de 14 dias de *washout* entre as doses. Após a coleta da amostra de sangue pré-dose, cada voluntário recebeu uma única dose de imipramina (25 mg de uma formulação de comprimido) acompanhado da ingestão de 200 ml de água. Os voluntários foram então mantidos em jejum durante 4 horas, período após o qual um almoço padrão foi servido. Nenhum outro alimento foi permitido durante o período de internação e o consumo de líquido foi permitido à vontade somente após o almoço (com a exceção de bebidas contendo xantina, incluindo chá, café e refrigerantes). Os sujeitos foram monitorados ao longo do estudo e as formulações foram consideradas como sendo bem toleradas. As amostras de sangue foram recolhidas por cateter em tubos contendo Heparina de Lítio nos tempos -30, 20 e 40 min e também 1, 1,5, 2, 2,33, 2,67, 3, 3,33, 3,67, 4, 4,5, 5, 6, 8, 10, 14, 18, 24, 72 e 96 horas após a administração. Imediatamente após cada coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 x g durante 10 min a 4°C e o plasma foi

coletado e armazenado em tubo criogênico de polipropileno com tampa de rosca e armazenados na temperatura de -20°C até serem submetidos a análise do teor de imipramina.

5.1.13. **Análise Estatística**

A bioequivalência entre as duas formulações foi avaliada através do cálculo das razões individuais entre as formulações teste/referência para o C_{max}, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf}. C_{max} e o T_{max} foram obtidos diretamente a partir das curvas. A ASC_{0-t} foi calculada aplicando-se a regra linear trapezoidal.

A constante da taxa de eliminação (kel) foi obtida através do declive da regressão linear dos valores da concentração transformados em log versus tempo na fase descendente da curva. A meia-vida de eliminação plasmática (t_{1/2}) foi calculada como 0,693/kel. A ASC_{0-inf} foi calculada como ASC_{0-t}+C_t/kel, onde C_t foi a última concentração mensurável. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando nível de significância $P \leq 0,10$ e a bioequivalência foi atingida quando o intervalo de confiança de 90,0% para C_{max}, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} ficou dentro da faixa de 80,0-125,0%, como previamente definido pelo FDA e pela ANVISA. Entre os Softwares utilizados incluímos o Equivtest® 2.0, MS Excel® 97, Tinn-R1.1, Win-Edit® 2.0 e Scientific Work Place® 5.0.

5.2 RESULTADOS

5.2.1. **Linearidade e Especificidade**

O método mais simples de regressão para as curvas de calibração do imipramina foi $Y = ax + b$ para a faixa de concentração de 0,1 a 20 ng/mL. Os coeficientes de correlação variaram de 0,9972 a 0,9981. Os cromatogramas obtidos a partir de amostras de plasma fortificado com imipramina na concentração do LIQ (0,1 ng/mL), comparado com plasma branco, são apresentados na Figura 14. O tempo de retenção tanto do analito como para o PI foi de $1,6 \pm 0,01$ min e a razão sinal-ruído foi superior a 7. Não houve supressão significativa de íons na região em que o analito e o padrão interno foram eluídos

(Figura 15). Além disso, não houve pico de interferência quando a análise foi realizada usando lotes de plasma hiperlipêmico e hemolisado (Figura 16). As análises das amostras dos voluntários mostraram cromatogramas sem níveis detectáveis de imipramina antes da administração do fármaco (Figura 17a). No entanto, após administração da medicação, a imipramina foi facilmente quantificada 20 min pós-dose, mostrando valores próximos do CQB (Figura 17b).

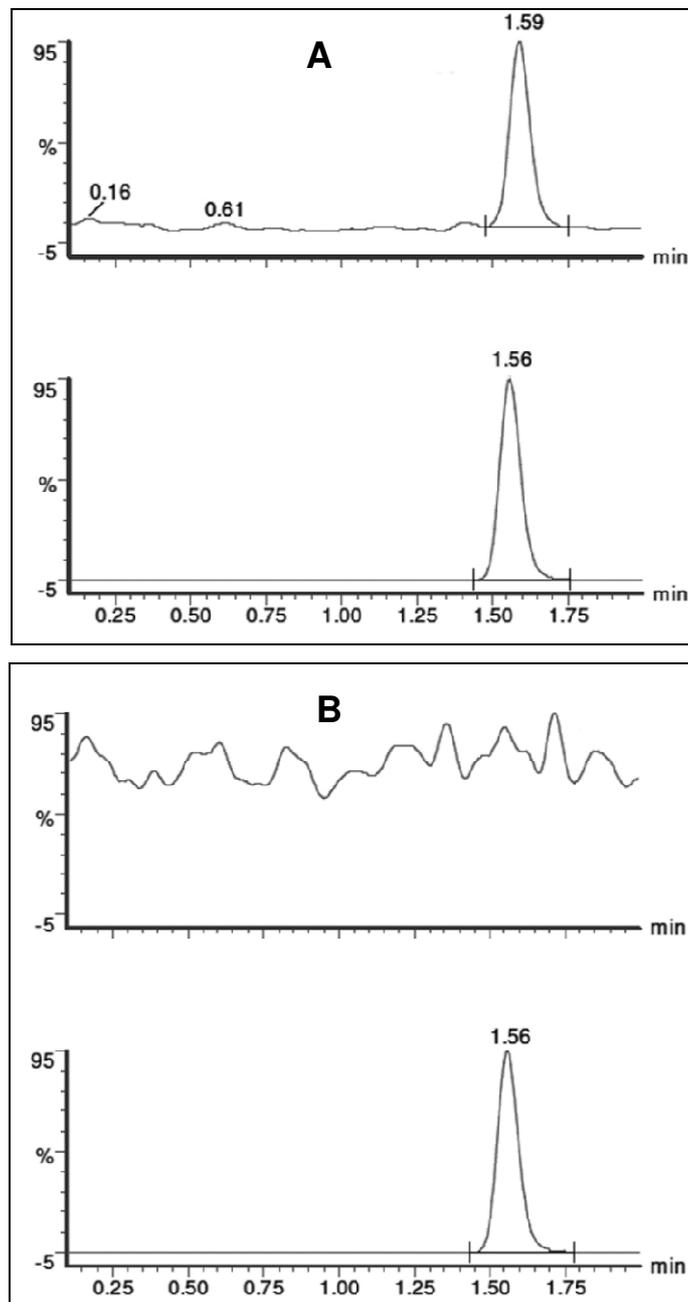
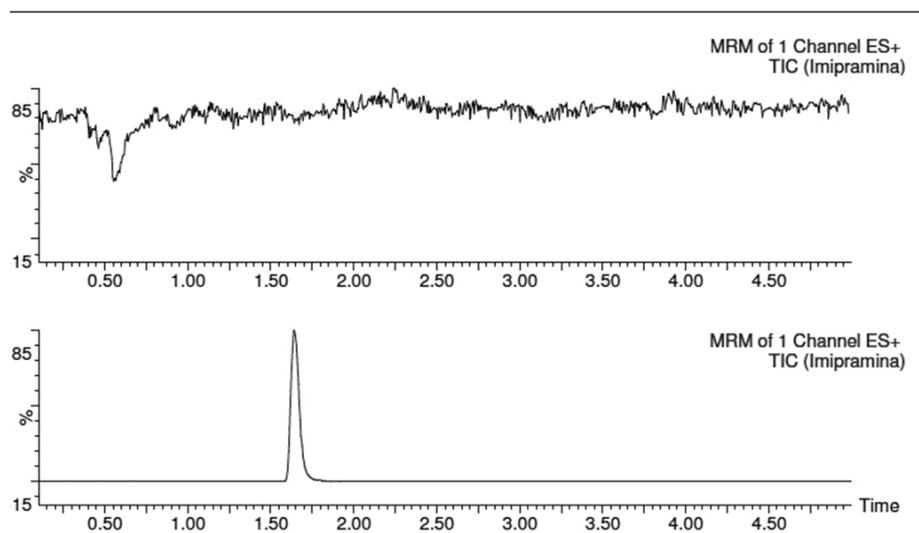


Figura 14. Cromatogramas do Monitoramento de Respostas Múltiplas (MRM) das amostras de plasma humano enriquecidas com (A) imipramina na concentração do LIQ (0,5 ng/mL) (m/z 281,1 > 85,8, painel superior) ou (B) ciclobenzaprina (m/z 276,2 > 57,9, painel inferior).

A



B

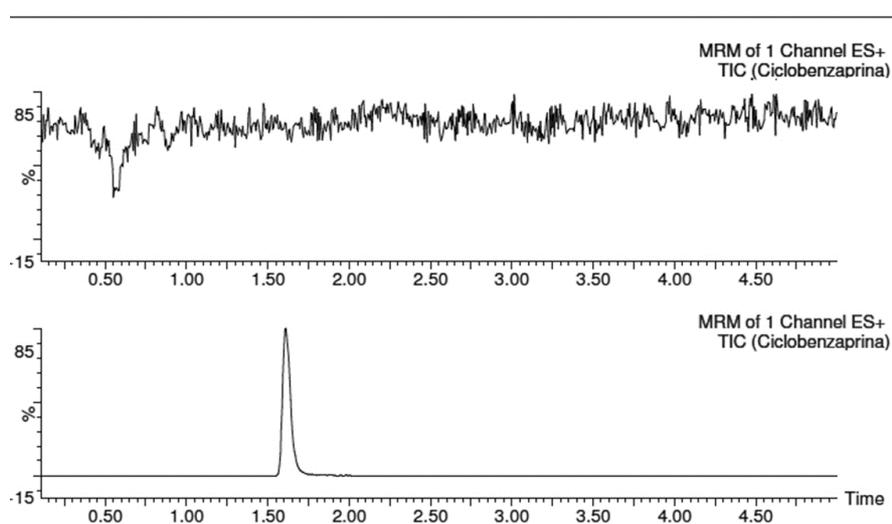


Figura 15. Supressão iônica da imipramina (A) ou ciclobenzaprina (B). A imipramina foi monitorada na transição m/z 281,1 > 85,8 e a ciclobenzaprina na transição m/z 276,2 > 57,9.

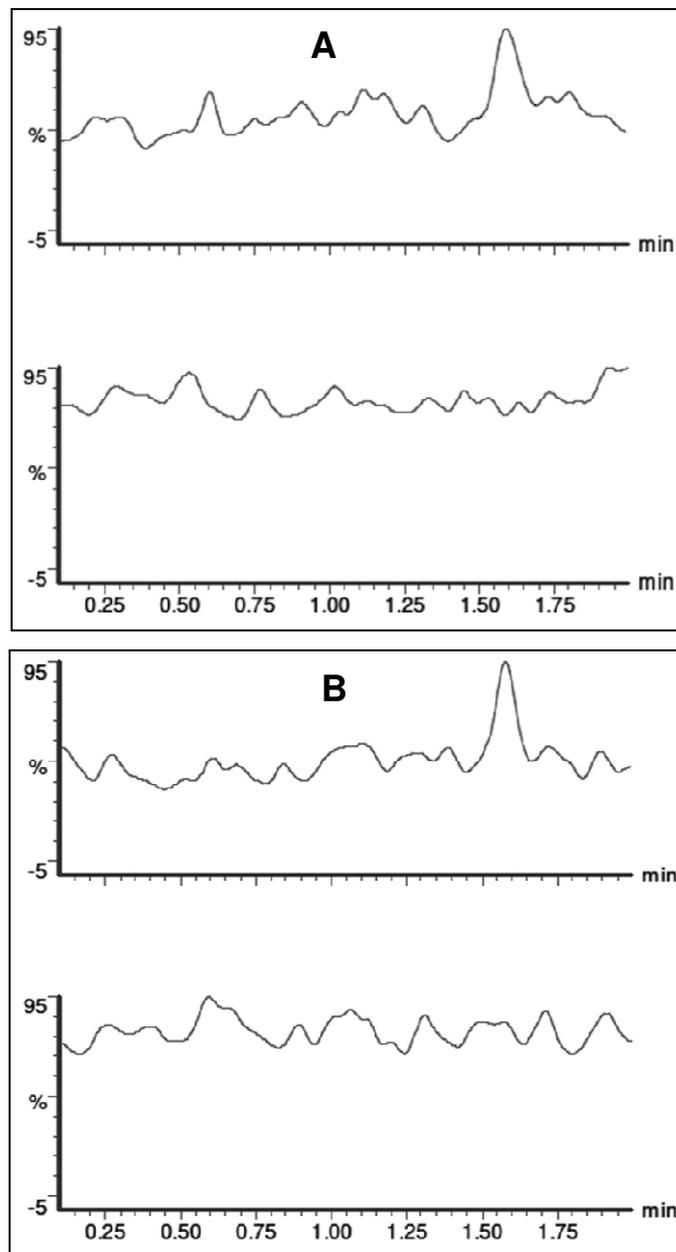


Figura 16. Especificidade da resposta após corrida cromatográfica em CLUE. MRM para os canais de imipramina (painel superior) e ciclobenzaprina (painel inferior) utilizando os seguintes lotes de plasma: (A) hiperlipêmicos e (B) da amostra de plasma hemolisado.

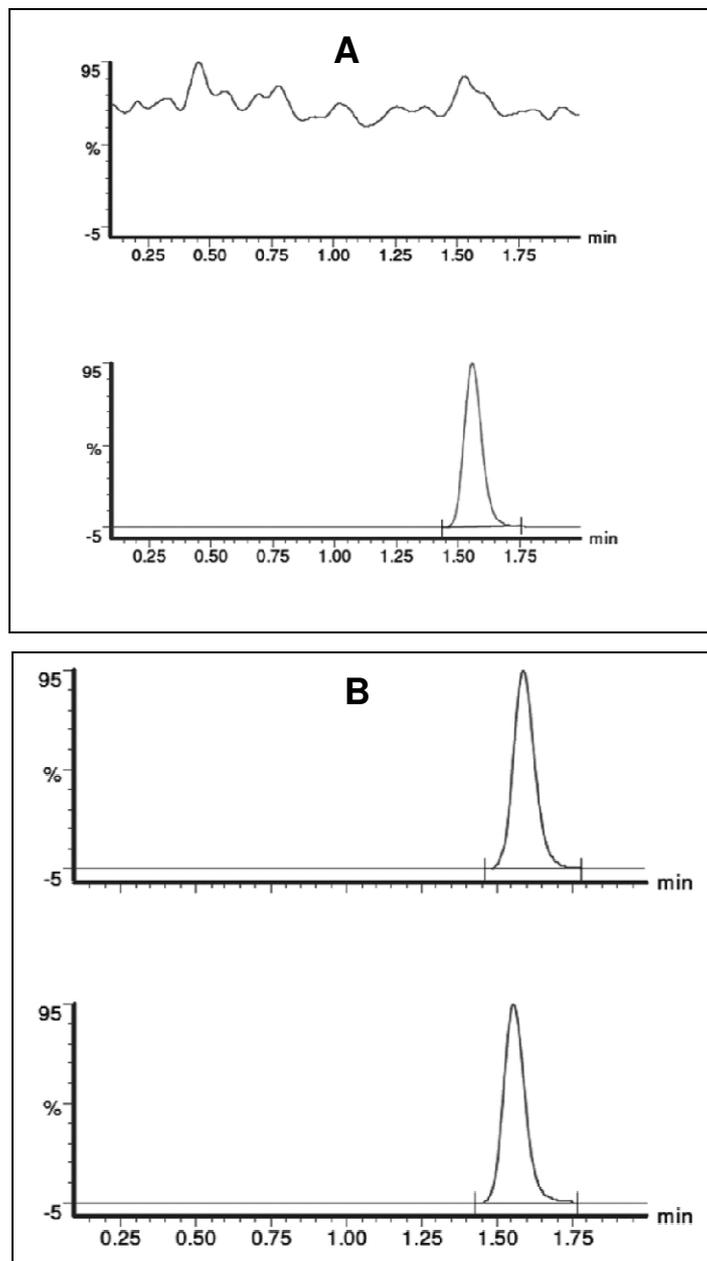


Figura 17. Cromatograma representativo de um mesmo voluntário mostrando amostra coletada antes (A) e 20 minutos após a administração de formulação referência (B). Painéis superiores mostram o monitoramento para a transição de imipramina e os painéis inferiores para a transição da ciclobenzaprina.

5.2.2. **Recuperação**

Imipramina apresentou as recuperações (valores \pm CV (%), n = 6) para CQB, CQM e CQA como se segue em plasma normal: $73,5 \pm 15,2\%$, $71,0 \pm 15,3\%$ e $81,1 \pm 12,7\%$, respectivamente. A recuperação do PI foi de $66,6 \pm 15,3\%$. Em plasma hemolisado os valores de recuperação foram: $73,9 \pm 9,3\%$, $69,3 \pm 5,9\%$ e $71,9 \pm 7,4\%$, respectivamente. A recuperação do PI foi de $63,2 \pm 5,9\%$. Finalmente, em plasma lipêmico os valores foram: $71,3 \pm 8,4\%$, $65,0 \pm 9,3\%$ e $77,7 \pm 10,4\%$, respectivamente. A recuperação do PI foi de $58,5 \pm 9,6\%$.

5.2.3. **Precisão e Exatidão**

Os valores de precisão e exatidão Intra-lote do ensaio para quantificação de imipramina foram medidos em cada nível de CQ e são apresentados na Tabela 12. A precisão intra-ensaio variou de 0,8 a 5,8%, enquanto os valores inter-ensaio variaram de 2,1 a 5,1%. As precisões intra-ensaio variaram de 95,0 a 105,4%, enquanto que a os valores inter-ensaio variaram de 98,2 a 108,2%. Como estabelecido pelos guias ANVISA e FDA, estes resultados estavam dentro dos critérios de aceitação para precisão e exatidão, ou seja, a variação foi no máximo de $\pm 15\%$ dos valores nominais, exceto para LIQ, que permite um desvio de $\pm 20\%$.

Tabela 12. Precisão e exatidão da quantificação de imipramina em plasma humano. Os resultados foram obtidos durante os ensaios de validação do método analítico com as amostras de controle de qualidade (CQ) incluindo o limite inferior de quantificação (LIQ).

Amostras CQ	Nominal concentração (ng/mL)	Exatidão		Precisão	
		Intra-ensaio ^a (%)	Inter-ensaio ^b (%)	Intra-ensaio ^c (%CV)	Inter-ensaio ^b (%CV)
LIQ	0.1	105,4	108,2	5,8	5,1
CQB	0.3	101,6	98,9	2,0	2,7
CQM	8.0	95,0	98,2	1,0	2,8
CQA	16.0	98,0	100,4	0,8	2,1

^a (n=6), expresso como: (concentração obtida/concentração nominal) X 100

^b Valores obtidos a partir de 3 corridas analíticas independentes (n=18)

^c n=6

5.2.4. Estabilidade

De acordo com os resultados do teste de estabilidade, não houve degradação significativa da solução estoque após 8h de armazenamento à temperatura ambiente. Nesta condição, a variação entre as amostras frescas e armazenadas foi de -9,0%. Além disso, após 36 dias a -20°C, a variação entre as amostras frescas e armazenadas foi de 6,9%.

Os testes de estabilidade da imipramina no plasma humano não demonstraram nenhuma degradação significativa após 20h à temperatura ambiente, três ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento

durante 161 horas à temperatura ambiente ou armazenadas durante 119 dias a -20°C (Tabela 13).

Tabela 13. Teste de estabilidade da imipramina em plasma humano.

	Média da conc. inicial (ng/mL)	% CV	Média da conc. final (ng/mL)	% CV	Varição (%)
Ciclos de congelamento e descongelamento (3 ciclos)					
CQB	0,29	1,0	0,30	1,0	1,2
CQA	15,87	1,0	15,72	2,1	-1,0
Curta duração (20 h)					
CQB	0,29	1,6	0,30	2,3	5,3
CQA	15,83	1,1	16,04	0,8	1,3
Pós-processamento (161 h)					
CQB	0,29	5,4	0,28	1,4	-0,8
CQA	15,97	1,5	16,16	0,5	1,2
Longa duração (119 dias, -20 °C)					
CQB	0,27	3,1	0,28	0,1	2,7
CQA	15,22	2,9	14,45	1,1	-5,1

n=3 para cada teste.

CQB = 0,3 ng/mL; CQA = 16,0 ng/mL

5.2.5. *Estudo Farmacocinético*

A imipramina foi bem tolerada nas doses administradas e nenhuma reação adversa séria foi observada ou relatada. No entanto, foram relatados 62 eventos adversos, sendo 09 considerados suspeitos, 36 considerados não-relacionados e 17 considerados relacionados com o fármaco, sendo estes últimos: sonolência (n

= 17), gosto amargo persistente (n = 1), salivacão (n = 1). Os eventos adversos foram devidamente descritos e anotados nas fichas clínicas dos voluntários.

Nenhuma mudança clinicamente relevante foi observada em nenhum parâmetro bioquímico medido. Um total de 35 voluntários completaram o estudo. O único voluntário que não terminou o estudo foi excluído devido a razões pessoais. A curva das concentrações médias de imipramina no plasma versus tempo, obtida após administração de uma dose oral única de cada formulação, é apresentada na Figura 18. As concentrações plasmáticas de imipramina não diferiram significativamente após a administração das formulações teste ou de referência.

A Tabela 14 mostra os valores dos parâmetros farmacocinéticos e a Tabela 15 resume os valores da análise de bioequivalência entre as formulações de imipramina. Resumidamente, a média geométrica e o respectivo intervalo de confiança (IC) 90% das razões entre as formulações de imipramina teste/referência foram de 90,15% (81,74-99,44%) para C_{max} e 93,11% (83,01-104,43%) para ASC_{0-t}.

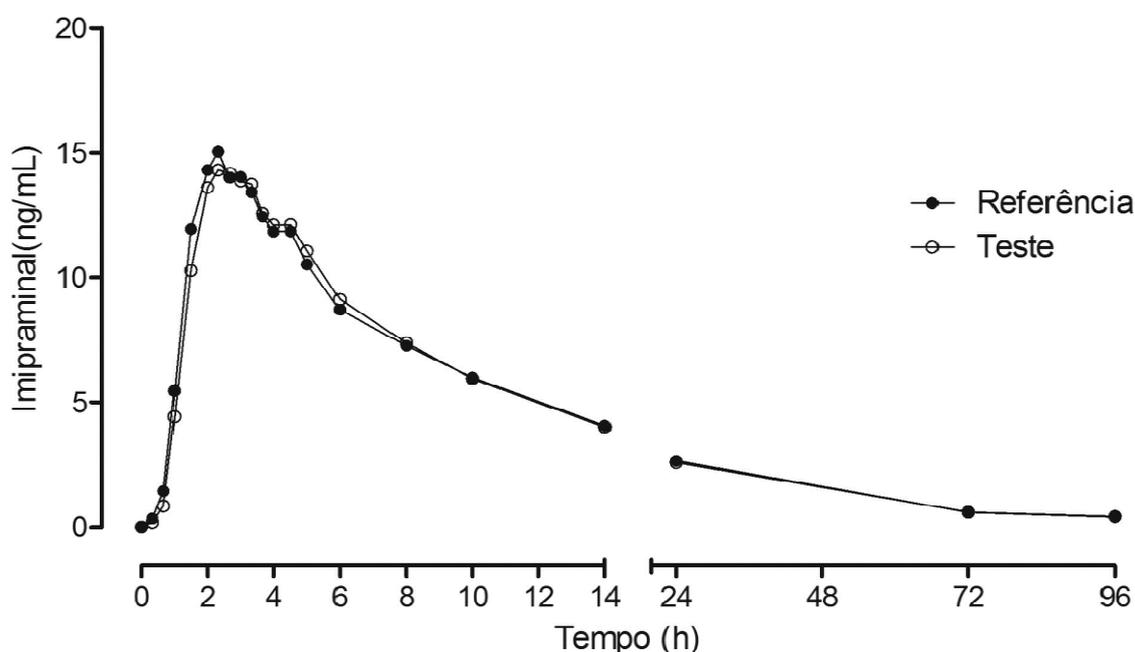


Figura 18. Gráfico da média das concentrações plasmáticas de imipramina versus tempo de coleta das amostras após administração das formulações teste ou referência contendo 25 mg de imipramina.

Tabela 14. Média aritmética dos parâmetros farmacocinéticos obtidas após administração das formulações teste e referência em comprimido com 25 mg de imipramina em 35 voluntários.

	Teste		Referência	
	Média	DP	Média	DP
C_{max} (ng/mL)	17,56	9,21	17,47	8,28
T_{max} (h)	2,73	0,92	2,49	0,89
$T_{1/2}$ (h)	19,25	5,92	18,94	5,80
ASC0-t ([ng x h]/mL)	226,35	145,37	228,56	146,41
ASC0-inf ([ng x h]/mL)	240,53	169,99	242,28	172,08

Tabela 15. Média geométrica das razões individuais de ASC0-t, ASC0-inf e Cmax (teste/referência) e os IC 90% correspondentes.

Parâmetro	Paramétrico (n=35)			
	Média geométrica (%)	CI 90%	Poder (%)	CV (%)
Razão ASC0-t %	97,56	93,52; 101,79	99%	10,50
Razão ASC0-inf %	97,85	93,87; 102,01	99%	10,29
Razão C _{max} %	98,60	94,17; 103,23	99%	11,39

5.3 DISCUSSÃO

Amostras de plasma branco obtido a partir de todos os 35 voluntários analisadas por CLUE-EM/EM mostraram cromatogramas sem nenhum pico ou ruído significativo no tempo de retenção do analito ou padrão interno. O método analítico para quantificação de imipramina em plasma humano descrito neste trabalho oferece vantagens sobre os anteriormente relatados utilizando CLUE-EM/EM (116, 139), CLAE-EM/EM (117, 140) e CLAE-ES (115), apresentando o LIQ validado de 0,1 ng/mL associado ao menor tempo de análise cromatográfica descrita (2,0 min). A preparação da amostra faz uso de uma extração líquido-líquido que apesar do protocolo simples, mostrou reprodutibilidade e foi suficiente para proporcionar uma limpeza eficaz da amostra.

Na comparação com os métodos para quantificação da imipramina publicados anteriormente, o nosso LIQ é significativamente menor que 2,5 ng/mL descrito por del Mar Ramírez Fernández (2012) (116) e 1,5 ng/mL descrito por Tanaka et al. (2011) (117). Além disso, estes dois métodos descrevem uma

análise cromatográfica significativamente mais longa, com tempos de corrida de 7 e 5,5 minutos, respectivamente. No entanto, vale ressaltar que estes métodos foram desenvolvidos para a quantificação de vários compostos simultaneamente. O trabalho publicado por Ullmann et al. (2001) (115) descreve um método para determinação de imiparina e seu principal metabólito desipramina em soro humano utilizando método validado de CLAE-EM. Os autores demonstraram a validação de um LIQ de 0,26 ng/mL. Em geral, métodos que utilizam CLUE apresentam melhorias significativas na sensibilidade, velocidade, e resolução. Sensibilidade aumentada com CLUE pode alcançar até 10 vezes e melhorias na velocidade dos métodos podem chegar a cinco vezes, em condições comparáveis de separação de picos. Melhorias na resolução cromatográfica com CLUE são aparentes a partir da análise da largura dos picos que se apresentam mais estreitos quando comparado ao CLAE (141). Em geral, a combinação entre a separação cromatográfica por cromatografia por CLUE e detecção por CLAE-EM/EM tem a propriedade de tornar o método muito mais eficiente em termos de sensibilidade, velocidade e resolução quando comparado a análise por CLAE-EM (141).

Uma vez que o nosso método fornece excelente desempenho analítico para a extração de imipramina e provou ser adequado para a análise de amostras de plasma humano, ele foi utilizado com sucesso em um estudo farmacocinético de duas formulações de imipramina em humanos.

A avaliação do parâmetro primário do estudo, a biodisponibilidade relativa entre as formulações Tofranil® (referência da Novartis Biociências S.A) e Imipramina (formulação teste da Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.) em comprimido revestido de cloridrato de imipramina (25 mg) em voluntários saudáveis, mostrou que não houve diferenças significativas na biodisponibilidade entre as formulações.

A análise clínica dos voluntários mostrou que a tolerabilidade de todas as preparações foi boa, como indicado pelo baixo número e pouca intensidade dos efeitos adversos relacionados a administração do fármaco. Dos sessenta e dois eventos adversos relatados durante o estudo, nove foram considerados suspeitos,

trinta e seis foram considerados não-relacionados e apenas dezessete foram considerados relacionados com o fármaco, sendo que destes últimos, quinze voluntários apresentaram a sonolência como efeito adverso. Em concordância com a boa tolerabilidade das formulações, nenhuma mudança clinicamente relevante foi observada em nenhum parâmetro bioquímico medido.

Os respectivos intervalos de confiança de 90% para as razões das médias geométricas de C_{max} , ASC_0-t e valores ASC_0-inf de imipramina absorvido a partir tanto do teste e as formulações de referência foram incluídos no intervalo de 80% a 125%, tal como proposto pelo FDA e ANVISA.

Ciraulo et al. (1988) investigou a biodisponibilidade de imipramina e desipramina entre usuários de álcool após desintoxicação e indivíduos saudáveis. Neste trabalho, os autores chegaram a conclusão de que etilistas crônicos apresentaram *clearance* de imipramina significativamente maior do que os voluntários sadios (107).

Metabólitos hidroxilados de imipramina podem possuir atividades anti-depressivas e cardiopélicas, mas a sua taxa de formação é limitada e as concentrações plasmáticas tendem a seguir o perfil da droga mãe com pouco acúmulo. Os potentes efeitos cardiovasculares dos metabólitos hidroxilados podem ser particularmente relevantes para os idosos e em caso de sobredosagem aguda (111).

O trabalho desenvolvido por Ullman et al. (2001) avaliou a bioequivalência entre três formulações de imipramina fornecidas pela Novartis: Tofranil 25mg, Tofranil mite com 10 mg e pós branco contendo 25 mg de imipramina-HCl em frasco de vidro para reconstituição com água. As três formulações apresentaram biodisponibilidade relativas semelhantes (115).

Chambers et al. (2013) (142) descreve método utilizando a mesma técnica de CLUE-EM/EM para quantificação simultânea de 5 antidepressivos (amitriptilina, norprriptilina, imipramina, doxepina e desipramina) em urina humana. Diferentemente do nosso método que utilizou extração líquido-líquido, o método descrito utilizou extração em fase sólida. A Extração em fase sólida (SPE) proposta utiliza cartuchos da marca Oasis® e devido a grande quantidade de

amostras a serem analisadas (1.584 amostras) representam um custo maior que a utilização somente de solventes proposta em nossa extração líquido-líquido (LLE). A linearidade validada de 0,02 – 250 ng/mL demonstra superioridade com relação ao nosso método (0,10 – 20 ng/mL), permitindo quantificar amostras de imipramina em uma concentração mais baixa e mais ampla, entretanto nosso método possui maior rapidez de análise com 2,0 minutos para cada corrida cromatográfica contra 3,5 minutos do método descrito.

Outro método para quantificação de imipramina e trimipramina em urina foi descrito por Shamsipur et al. (2014) (143) utilizando microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e CLAE-UV. Apesar da técnica de DLLME utilizar menores quantidades de solventes para extração do analito, a técnica utiliza 1000 µL de amostra, com corrida cromatográfica de 3,5 minutos, demonstrando ter análise mais lenta que o nosso método desenvolvido (2,0 minutos). Acrescenta-se que LIQ de 5 ng/mL é bastante superior ao LIQ de 0,1 ng/mL validado em nosso método.

5.4 CONCLUSÃO

Este trabalho descreve um método rápido, sensível e robusto para quantificar imipramina no plasma humano utilizando ciclobenzaprina como padrão interno. As amostras extraídas foram analisadas por CLAE-EM/EM. Este método está de acordo com os requisitos propostos pela *Food and Drug Administration* (EUA) de alta sensibilidade, especificidade e alto rendimento da amostra em ensaios farmacocinéticos comparativos, tais como estudos de bioequivalência. A menor concentração quantificada foi de 0,1 ng/mL com precisão e exatidão adequadas. O método descrito para a quantificação de imipramina no plasma humano foi aplicada com êxito em um estudo de bioequivalência de duas formulações de imipramina em comprimidos com 25 mg, utilizando um processo aberto, aleatorizado, cruzado de dois períodos. Uma vez que o IC de 90% para as razões de C_{max} e ASC ficaram dentro do intervalo de 80-125%, concluiu-se que a formulação de teste de imipramina é bioequivalente à formulação de referência no que diz respeito tanto à taxa e extensão como de absorção.

6. DISCUSSÃO GERAL

A Anvisa permite ao profissional farmacêutico a substituição do medicamento de referência prescrito pelo médico pelo genérico correspondente. Caso o médico tenha restrições quanto a substituição da sua indicação pelo genérico, ele deve explicitar sua determinação na prescrição. Nos casos de prescrição de medicamentos por seu nome genérico, ou seja, pela Denominação Comum Brasileira (DCB) ou pela Denominação Comum Internacional (DCI), o farmacêutico pode dispensar tanto o medicamento de referência quanto os genéricos ou similares correspondentes (144).

No entanto, não está estabelecido se um genérico pode ser trocado por outro, e essa questão é importante não somente porque o número de genéricos aprovados de um mesmo medicamento de referência pode ser muito grande, como também porque esses medicamentos não são idênticos em termos de ingredientes inativos. Essa é uma área na bioequivalência normalmente ignorada, mas que realmente carece de imediata atenção (11).

Tendo em vista o fato de os órgãos reguladores se basearem apenas no critério da bioequivalência média e não exigirem os cálculos da bioequivalência individual e populacional que garantem a intercambiabilidade em diferentes abordagens (*prescribability* e *switchability*), alguns autores sugerem que sejam realizadas metanálises combinando dados de diferentes estudos de bioequivalência, com o intuito de proporcionar uma revisão sistemática da bioequivalência entre produtos genéricos e de referência (119, 145).

A Anvisa tem em seu poder todos os dados relativos a estudos de bioequivalência e de biodisponibilidade relativa já realizados para o registro de medicamentos no Brasil que permitem a aplicação da metanálise para avaliar a intercambiabilidade entre genéricos. Pelo fato de os genéricos existirem no país há apenas 15 anos e a exigência para similares realizarem estudos de bioequivalência ser ainda mais recente (2003), esse tipo de análise se torna

bastante útil no aperfeiçoamento dos critérios para concessão de registro ou mesmo como uma ferramenta para o monitoramento de genéricos e similares pós-registro. Isso se aplica especialmente ao caso de medicamentos que tratam doenças crônicas e são de uso contínuo, em que a substituição por uma nova cópia pode não proporcionar os níveis de absorção necessários pelo organismo para alcançar os resultados terapêuticos desejados.

Atualmente, todo medicamento genérico é intercambiável com o produto de referência. O mesmo ainda não ocorre com o similar. Para regularizar esta situação, a Anvisa determinou, por meio da RDC 134 (146), que todos os similares deverão apresentar, até 2014, testes para garantir que os efeitos são os mesmos dos medicamentos de referência. Os laboratórios ganharam prazo de dez anos para realizar todos os testes exigidos. Algumas indústrias farmacêuticas têm alegado que alguns desses produtos tiveram de ser retirados do mercado, baseando esta decisão na alegação de que a exigência dos testes de bioequivalência aumenta os custos de forma considerável. No dia 09/10/2014, a Anvisa divulgou nota em seu site que aprovou a norma que estabelece os procedimentos para a intercambialidade de medicamentos similares com o medicamento de referência. Ou seja, os requisitos necessários para que o similar possa substituir o medicamento de referência. Pela nova regra, os similares que já tenham comprovado equivalência farmacêutica com o medicamento de referência da categoria poderão declarar na bula que são substitutos ao de marca. A medida poderá ser adotada pelos fabricantes a partir de 1º de janeiro de 2015 e terão 12 meses para fazer a alteração nas bulas. A Anvisa também descreve na nota que vai manter uma lista atualizada dos similares intercambiáveis para orientar médicos, farmacêuticos e pacientes sobre quais produtos possuem equivalência já comprovada na Agência (147).

Como apresentado ao longo deste trabalho, estudos de biodisponibilidade e bioequivalência têm papel fundamental no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e correspondem ao padrão aceito para assegurar o desempenho terapêutico de medicamentos que passaram por alterações em processos de fabricação, modificações de formulação e também para a aprovação de

medicamentos genéricos. Esses padrões estão baseados em assegurar que tanto o produto de referência, como o produto teste, apresentem o mesmo perfil de concentração plasmática pelo tempo. Enquanto os testes de bioequivalência têm sido amplamente utilizados nas últimas três décadas, recentemente, um novo padrão, aplicável a um número considerável de medicamentos, foi desenvolvido baseado na classificação de fármacos de acordo com suas propriedades biofarmacêuticas (148). Este novo padrão baseia-se no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), o qual está baseado nas características intrínsecas de cada fármaco que interferem diretamente na sua absorção, principalmente permeabilidade e solubilidade (149).

Tendo como base a solubilidade e a permeabilidade dos fármacos, o seguinte SCB é recomendado na literatura:

Classe I: alta solubilidade e alta permeabilidade;

Classe II: baixa solubilidade e alta permeabilidade;

Classe III: alta solubilidade e baixa permeabilidade;

Classe IV: baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

O SCB pode auxiliar na previsão da absorção *in vivo* e identificar se a biodisponibilidade de determinado produto farmacêutico é sensível a alterações do processo produtivo, dos constituintes da formulação ou da concentração do fármaco (150).

Um fármaco será considerado altamente solúvel se sua maior dose administrada oralmente como uma formulação de liberação imediata (dose máxima por administração descrita em bula) solubiliza-se completamente em até 250 ml de cada uma das soluções tampão utilizadas dentro da faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (151).

A determinação da permeabilidade dos fármacos através de membranas do trato gastrointestinal (TGI) contribui para prever sua biodisponibilidade. Existem vários modelos *in vitro* que possibilitam determinar a permeabilidade efetiva (152, 153). Atualmente, estão sendo estudadas metodologias empregando cultura de células como Caco-2, TC-7; 2/4/A1; MDCK e MDCK-MDR1 (154-157).

Entre os três medicamentos avaliados neste trabalho, a clorpromazina é classificada como classe III (158), a ondansetrona é classificada como classe II (159) e a imipramina faz parte da classe I (160, 161). Para ilustrar a importância da SCB, podemos lembrar que há relatos na literatura de estudos de bioequivalência entre três formulações de imipramina: Tofranil 25mg, Tofranil mite com 10 mg e pós branco contendo 25 mg de imipramina-HCl em frasco de vidro para reconstituição com água (115). Podemos inferir que a facilidade de obtenção de bioequivalência para formulações distintas como essas se deve ao fato da imipramina possuir alta solubilidade e alta permeabilidade. Desde que o SCB foi introduzido em 1995 no âmbito internacional, seu uso vem sendo adotado para fundamentar que testes de dissolução *in vitro* sejam usados para estabelecer bioequivalência no caso de fármacos da classe I (162) e algumas Agências Regulatórias, inclusive a ANVISA (151), têm adotado o critério das isenções de testes de bioequivalência (bioisenções) para formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata, cujos fármacos pertencem à Classe I.

Para ilustrar a importância de novas medidas relacionadas com a farmacovigilância de medicamentos para garantir uma política de intercambiabilidade entre genéricos e similares, podemos exemplificar a questão com a metanálise de estudos de bioequivalência realizada por Lopes et al (2010). Neste estudo, os autores aplicaram uma revisão sistemática de vários estudos de bioequivalência para avaliar a segurança na intercambiabilidade entre diferentes genéricos e similares que contenham Hidroclorotiazida e Maleato de Enalapril em suas formulações. É importante ressaltar que estes medicamentos são frequentemente utilizados por inúmeros pacientes e fazem parte do programa Farmácia Popular, do Ministério da Saúde (MS). Os resultados obtidos permitiram aos autores concluir que, entre os medicamentos genéricos e similares anti-hipertensivos estudados e distribuídos pelo programa Farmácia Popular, a intercambiabilidade pode ser feita com segurança entre os produtos dos fármacos Hidroclorotiazida. Já na avaliação dos medicamentos do princípio ativo Maleato de Enalapril, os produtos estudados não contemplaram os intervalos preconizados na regulamentação nacional. Portanto, a resposta farmacocinética e a efetividade do

medicamento podem ser afetadas em alguns pacientes que utilizem diferentes marcas de genéricos ou similares no tratamento da hipertensão arterial e de outras doenças cardiovasculares (119).

Para garantir a mesma resposta clínica, ensaios comparando os efeitos terapêuticos das diferentes apresentações são necessários para avaliar melhor a questão levantada por esta metanálise.

Este trabalho vem contribuir com informações sobre a bioequivalência de três formulações genéricas de medicamentos com ação no sistema nervoso central. Esses estudos, associados aos de outras indústrias farmacêuticas vêm contribuir com o maior acesso da população a este tipo de medicamento. Segundo a lista de medicamentos genéricos registrados na ANVISA até 14 de julho de 2014 haviam 3 genéricos do Amplicitil comprimido revestido (Cloridrato de Clorpromazina) lançados nas dosagens de 10 e 25 mg, três genéricos do Zofran comprimido revestido (Cloridrato de Ondansetrona) lançados nas dosagens de 4 e 8 mg. No entanto, não há nenhum registro de medicamento genérico do cloridrato de Imipramina nesta lista.

Na última década, a evolução dos aspectos técnicos da regulamentação brasileira na área de medicamentos, tendo como base princípios científicos, é inquestionável. A implantação das legislações contribuiu para o aprimoramento da fabricação e garantia de qualidade dos medicamentos no país, introduzindo conceitos tais como equivalência farmacêutica, biodisponibilidade e bioequivalência.

O teste de bioequivalência é fundamental para garantir que dois medicamentos que provaram a equivalência farmacêutica apresentarão o mesmo desempenho no organismo em relação à biodisponibilidade, expressa em termos da quantidade absorvida do fármaco, a partir da forma farmacêutica ministrada, e da velocidade do processo de absorção.

Por meio da avaliação das resoluções publicadas pela ANVISA até o momento, verifica-se que houveram várias alterações, ao longo do tempo, no sentido de otimizar a implementação da política de medicamentos genéricos e

viabilizar o processo de adequação dos medicamentos similares no Brasil, o que representou grande avanço técnico-científico para o País.

7. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho cumpriu seu objetivo geral, realizando 3 estudos de bioequivalência contendo fármacos de ação central para avaliação da biodisponibilidade relativa, utilizando-se os critérios de bioequivalência.

Cumpriu também o objetivo específico de desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos, rápidos, sensíveis e robustos para quantificar os fármacos de interesse presentes no plasma humano, respeitando os requisitos do FDA e ANVISA de alta sensibilidade, especificidade e alto rendimento da amostra em ensaios farmacocinéticos comparativos de bioequivalência para fins de registro como medicamentos genéricos e/ou similar descritos no capítulo 1 para o fármaco Clorpromazina, capítulo 2 para o fármaco Ondansetrona e capítulo 3 para Imipramina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palmeira Filho PL, Pan SSK. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. BNDES Setorial. 2003(18):19.
2. Frenkel J. Estudo competitivo de cadeias integradas no Brasil: impacto das zonas de livre comércio. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. 2002.
3. Capanema LXL, PALMEIRA FILHO PL. Indústria Farmacêutica Brasileira: Reflexões sobre sua Estrutura e Potencial de Investimentos. BNDES Publicações. 2007:44.
4. Datamonitor. Brazil Pharmaceutical Market Overview. Strong market growth continues, but regulatory risks increase. Datamonitor Healthcare [Internet]. 2012 Acessado em 3 de janeiro de 2013:[139 p.]. Available from: www.datamonitor.com.
5. Haydock I. Takeda to begin direct operations in Brazil. Scrip Intelligence [Internet]. 2009 Acessado em 3 de Janeiro de 2013. Available from: <http://www.scripintelligence.com/business/Takeda-to-begin-direct-operations-in-Brazil-181802>.
6. Bourne-Partners. Modernizing Pharma Markets in Brazil and Mexico. Bourne Partners World Press [Internet]. 2012 Acessado em 3 de Janeiro de 2013. Available from: <http://bournepartners.wordpress.com/2012/06/01/modernizing-pharma-markets-in-brazil-and-mexico/>.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº96/08. Requisitos para a propaganda ou publicidade de medicamentos industrializados isentos de prescrição., (2008).
8. Lei dos Genéricos: Estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências., (1999).
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - Resolução - RDC nº58, de 10 de outubro de 2014., (2014).
10. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - Resolução - RDC nº269, de 22 de setembro de 2005., (2005).
11. Chow SC, Liu JP. Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies. 2 ed. New York: Marcel Dekker; 2000.
12. Aiache JM, Roca R, Bastide J, Bastide M, Kantelip JP. [Biopharmaceutical study of new oral dosage forms of indomethacin]. J Pharm Belg. 1983;38(1):5-21. Epub 1983/01/01. Etude biopharmaceutique de nouvelles formes galéniques orales de l'indometacine.

13. Quental C, Salles Filho S. Ensaio clínico: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2006;9:16.
14. Storpirtis S, Bueno MM. A vigilância sanitária e a política nacional de medicamentos no Brasil: medicamentos genéricos, similares e novos. Storpirtis S., Mori ALPM, Yochiy A., Ribeiro E., Porta V, editors. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
15. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial., (1996).
16. Consiglieri VO, Storpirtis S. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Rev Bras Cienc Farm*. 2000;36(1):8.
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 133, de 29 de maio de 2003, (2003).
18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 134, de 29 de maio de 2003, (2003).
19. Pró-Genéricos. Genéricos são 65% dos medicamentos prescritos no Brasil. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica [Internet]. 2014 Acessado em 04 de Janeiro de 2015. Available from: <http://www.inct-if.com.br/portal/detalhaNoticia.asp?codigo=ACE2CE29D9>.
20. Datamonitor. US Generics Overview. Opportunities and challenges in an evolving marketplace. Datamonitor Healthcare [Internet]. 2011 Acessado em 3 de janeiro de 2013:[48 p.]. Available from: www.datamonitor.com.
21. Espicom-Business-Intelligence. Global Overview and Company Profiles. World Generic Market Report [Internet]. 2012 Acessado em 04 de janeiro de 2013; Vol I. Available from: www.espicom.com/generics.
22. Scaramuzzo M. Muda o perfil dos genéricos mais vendidos. *Valor Econômico* [Internet]. 2012 Acessado em 04 de Janeiro de 2013. Available from: <http://www.valor.com.br/empresas/2667252/muda-o-perfil-dos-genericos-mais-vendidos#ixzz1vTJUit51>.
23. Kane JM, Correll CU. Past and present progress in the pharmacologic treatment of schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 2011;71(9):1115-24. Epub 2010/10/07.
24. Long JW. *The Essential guide to prescription drugs*. New York: HarperPerennial; 1992.
25. Wise RA. Forebrain substrates of reward and motivation. *J Comp Neurol*. 2005;493(1):115-21. Epub 2005/10/29.
26. Kapur S. Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2003;160(1):13-23. Epub 2002/12/31.

27. Kapur S. How antipsychotics become anti-"psychotic"--from dopamine to salience to psychosis. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(8):402-6. Epub 2004/07/28.
28. Strange PG. Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev.* 2001;53(1):119-33. Epub 2001/02/15.
29. Bon RS, Beech DJ. In pursuit of small molecule chemistry for calcium-permeable non-selective TRPC channels -- mirage or pot of gold? *British journal of pharmacology.* 2013;170(3):459-74. Epub 2013/06/15.
30. Lopez-Munoz F, Alamo C, Cuenca E, Shen WW, Clervoy P, Rubio G. History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. *Ann Clin Psychiatry.* 2005;17(3):113-35. Epub 2006/01/26.
31. Laborit G, Baron C. [Can analgesics replace neuroleptics in anesthesia? Experimental study]. *Agressologie.* 1974;15(4):271-82. Epub 1974/01/01. Les analgesiques peuvent-ils remplacer les neuroleptiques en anesthésie? Etude expérimentale.
32. Lopez-Munoz F, Alamo C, Rubio G, Cuenca E. Half a century since the clinical introduction of chlorpromazine and the birth of modern psychopharmacology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004;28(1):205-8. Epub 2004/02/06.
33. Delay J, Deniker P, Tardieu Y, Lemperiere T. [Neuroplegic medications and cures in psychiatry: preliminary trials with reserpine; comparison with the effects of chlorpromazine]. *Presse Med.* 1955;63(32):663-5. Epub 1955/05/04. Médicaments et cures neuroleptiques en thérapeutique psychiatrique: premiers essais de la reserpine; comparaison avec les effets de la chlorpromazine.
34. King C, Voruganti LN. What's in a name? The evolution of the nomenclature of antipsychotic drugs. *J Psychiatry Neurosci.* 2002;27(3):168-75. Epub 2002/06/18.
35. Moreira FA, Guimarães FS. Mecanismos de ação dos antipsicóticos: hipóteses dopaminérgicas. *Medicina, Ribeirão Preto.* 2007;40(1):9.
36. Dollery CT. Clinical pharmacology of calcium antagonists. *Am J Hypertens.* 1991;4(2 Pt 2):88S-95S. Epub 1991/02/01.
37. Yeung PK, Hubbard JW, Korchinski ED, Midha KK. Pharmacokinetics of chlorpromazine and key metabolites. *Eur J Clin Pharmacol.* 1993;45(6):563-9. Epub 1993/01/01.
38. Carlsson A, Lindqvist M. Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1963;20:140-4. Epub 1963/01/01.

39. Anden NE, Butcher SG, Corrodi H, Fuxe K, Ungerstedt U. Receptor activity and turnover of dopamine and noradrenaline after neuroleptics. *Eur J Pharmacol.* 1970;11(3):303-14. Epub 1970/01/01.
40. Feinberg AP, Snyder SH. Phenothiazine drugs: structure-activity relationships explained by a conformation that mimics dopamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1975;72(5):1899-903. Epub 1975/05/01.
41. Snyder SH, Banerjee SP, Yamamura HI, Greenberg D. Drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. *Science.* 1974;184(4143):1243-53. Epub 1974/06/21.
42. Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science.* 1976;192(4238):481-3. Epub 1976/04/30.
43. Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature.* 1976;261(5562):717-9. Epub 1976/06/24.
44. Smith S, Scarth E, Sasada M. *Drugs in anaesthesia and intensive care.* 4th Edition ed. New York: Oxford University Press; 2011. 402 p.
45. Ellenhorn MJ, Schonwald S, Ordog G, Wasserberger J. *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning* 2nd ed ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1997. 2047 p.
46. Fowler NO, McCall D, Chou TC, Holmes JC, Hanenson IB. Electrocardiographic changes and cardiac arrhythmias in patients receiving psychotropic drugs. *The American journal of cardiology.* 1976;37(2):223-30. Epub 1976/02/01.
47. Hollister LE, Kosek JC. Sudden Death during Treatment with Phenothiazine Derivatives. *JAMA.* 1965;192:1035-8. Epub 1965/06/21.
48. Midha KK, Hawes EM, Hubbard JW, Korchinski ED, McKay G. Intersubject variation in the pharmacokinetics of chlorpromazine in healthy men. *J Clin Psychopharmacol.* 1989;9(1):4-8. Epub 1989/02/01.
49. Ross JB. *Drugs and the treatment of psychiatric disorders: Depression and anxiety disorders.* 10th ed. Gilman A, Goodman LS, Hardman JG, Limbird LE, editors. New York: McGraw-Hill; 2001.
50. Dahl SG, Strandjord RE. Pharmacokinetics of chlorpromazine after single and chronic dosage. *Clin Pharmacol Ther.* 1977;21(4):437-48. Epub 1977/04/01.
51. David H. *The creation of psychopharmacology.* Cambridge, MA: Harvard University Press; 2002. 469 p.
52. Terry AV, Jr., Gearhart DA, Mahadik SP, Warsi S, Davis LW, Waller JL. Chronic exposure to typical or atypical antipsychotics in rodents: temporal

- effects on central alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience*. 2005;136(2):519-29. Epub 2005/10/12.
53. Terry AV, Jr., Gearhart DA, Mahadik SP, Warsi S, Waller JL. Chronic treatment with first or second generation antipsychotics in rodents: effects on high affinity nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors in the brain. *Neuroscience*. 2006;140(4):1277-87. Epub 2006/04/22.
 54. Girre C, Koch H, Crouzette J, Palombo S, Fournier PE. Gas chromatographic determination of chlorproethazine in plasma. *J Chromatogr*. 1987;419:363-7. Epub 1987/08/07.
 55. McKay G, Hall K, Cooper JK, Hawes EM, Midha KK. Gas chromatographic--mass spectrometric procedure for the quantitation of chlorpromazine in plasma and its comparison with a new high-performance liquid chromatographic assay with electrochemical detection. *J Chromatogr*. 1982;232(2):275-82. Epub 1982/11/12.
 56. Pujadas M, Pichini S, Civit E, Santamarina E, Perez K, de la Torre R. A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007;44(2):594-601. Epub 2007/03/31.
 57. Midha KK, Cooper JK, McGilveray IJ, Butterfield AG, Hubbard JW. High-performance liquid chromatographic assay for nanogram determination of chlorpromazine and its comparison with a radioimmunoassay. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1981;70(9):1043-6. Epub 1981/09/01.
 58. Midha KK, Hubbard JW, Cooper JK, Gurnsey T, Hawes EM, McKay G, et al. Therapeutic monitoring of chlorpromazine. IV: Comparison of a new high-performance liquid chromatographic method with radioimmunoassays for parent drug and some of its major metabolites. *Ther Drug Monit*. 1987;9(3):358-65. Epub 1987/09/01.
 59. Pistos C, Stewart JT. Direct injection HPLC method for the determination of selected phenothiazines in plasma using a Hisep column. *Biomed Chromatogr*. 2003;17(7):465-70. Epub 2003/11/05.
 60. Rukhadze MD, Alexishvili MM, Okujava VM, Makharadze TG, Sebiskveradze MV, Tsagareli SK. Interaction of carbamazepine and chlorpromazine in rabbits. *Biomed Chromatogr*. 1999;13(7):445-9. Epub 1999/10/27.
 61. Tanaka E, Nakamura T, Terada M, Shinozuka T, Hashimoto C, Kurihara K, et al. Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2007;854(1-2):116-20. Epub 2007/04/27.

62. Hayen H, Karst U. Analysis of phenothiazine and its derivatives using LC/electrochemistry/MS and LC/electrochemistry/fluorescence. *Anal Chem.* 2003;75(18):4833-40. Epub 2003/12/17.
63. Cooper JK, McKay G, Midha KK. Subnanogram quantitation of chlorpromazine in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of pharmaceutical sciences.* 1983;72(11):1259-62. Epub 1983/11/01.
64. Kawashima K, Dixon R, Spector S. Development of radioimmunoassay for chlorpromazine. *Eur J Pharmacol.* 1975;32(02):195-202. Epub 1975/06/01.
65. Midha KK, Loo JC, Hubbard JW, Rowe ML, McGilveray IJ. Radioimmunoassay for chlorpromazine in plasma. *Clin Chem.* 1979;25(1):166-8. Epub 1979/01/01.
66. Kerns EH, Di L. Utility of mass spectrometry for pharmaceutical profiling applications. *Curr Drug Metab.* 2006;7(5):457-66.
67. Marzo A, Bo LD. Tandem mass spectrometry (LC-MS-MS): a predominant role in bioassays for pharmacokinetic studies. *Arzneimittelforschung.* 2007;57(2):122-8.
68. Maurer HH. Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2007;388(7):1315-25.
69. Niessen WM. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *Journal of chromatography A.* 2003;1000(1-2):413-36. Epub 2003/07/25.
70. Srinivas NR. Applicability of bioanalysis of multiple analytes in drug discovery and development: review of select case studies including assay development considerations. *Biomed Chromatogr.* 2006;20(5):383-414. Epub 2005/11/25.
71. Zhong D, Chen X, Gu J, Li X, Guo J. Applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in drug and biomedical analyses. *Clin Chim Acta.* 2001;313(1-2):147-50. Epub 2001/11/06.
72. Kirchherr H, Kuhn-Velten WN. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi-level, single-sample approach. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 2006;843(1):100-13. Epub 2006/06/27.
73. Miyaguchi H, Kuwayama K, Tsujikawa K, Kanamori T, Iwata YT, Inoue H, et al. A method for screening for various sedative-hypnotics in serum by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2006;157(1):57-70. Epub 2005/05/05.
74. Zhang G, Terry AV, Jr., Bartlett MG. Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of

- the lipophilic antipsychotic drug chlorpromazine in rat plasma and brain tissue. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2007;854(1-2):68-76. Epub 2007/04/25.
75. Butcher ME. Global experience with ondansetron and future potential. *Oncology*. 1993;50(3):191-7. Epub 1993/05/01.
 76. Currow DC, Coughlan M, Fardell B, Cooney NJ. Use of ondansetron in palliative medicine. *The Journal of Pain and Symptom Management*. 1997;13(5):302-7. Epub 1997/05/01.
 77. Gralla RJ, Navari RM, Hesketh PJ, Popovic W, Strupp J, Noy J, et al. Single-dose oral granisetron has equivalent antiemetic efficacy to intravenous ondansetron for highly emetogenic cisplatin-based chemotherapy. *Journal of clinical oncology*. 1998;16(4):1568-73. Epub 1998/04/29.
 78. Gregory RE, Ettinger DS. 5-HT₃ receptor antagonists for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. A comparison of their pharmacology and clinical efficacy. *Drugs*. 1998;55(2):173-89. Epub 1998/03/20.
 79. Hesketh PJ. Comparative review of 5-HT₃ receptor antagonists in the treatment of acute chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Cancer investigation*. 2000;18(2):163-73. Epub 2000/03/08.
 80. Loewen PS, Marra CA, Zed PJ. 5-HT₃ receptor antagonists vs traditional agents for the prophylaxis of postoperative nausea and vomiting. *Canadian journal of anaesthesia*. 2000;47(10):1008-18. Epub 2000/10/14.
 81. Markham A, Sorokin EM. Ondansetron. An update of its therapeutic use in chemotherapy-induced and postoperative nausea and vomiting. *Drugs*. 1993;45(6):931-52. Epub 1993/06/01.
 82. Oge A, Alkis N, Oge O, Kartum A. Comparison of granisetron, ondansetron and tropisetron for control of vomiting and nausea induced by cisplatin. *Journal of Chemotherapy*. 2000;12(1):105-8. Epub 2000/04/18.
 83. Roila F, Hesketh PJ, Herrstedt J. Prevention of chemotherapy- and radiotherapy-induced emesis: results of the 2004 Perugia International Antiemetic Consensus Conference. *Annals of Oncology*. 2006;17(1):20-8. Epub 2005/11/30.
 84. Ye JH, Ponnudurai R, Schaefer R. Ondansetron: a selective 5-HT₃ receptor antagonist and its applications in CNS-related disorders. *CNS Drug Rev*. 2001;7(2):199-213. Epub 2001/07/28.
 85. Dixon CM, Colthup PV, Serabjit-Singh CJ, Kerr BM, Boehlert CC, Park GR, et al. Multiple forms of cytochrome P450 are involved in the metabolism of ondansetron in humans. *Drug Metabolism and Disposition*. 1995;23(11):1225-30. Epub 1995/11/01.

86. Pritchard JF. Ondansetron metabolism and pharmacokinetics. *Seminars in Oncology*. 1992;19(4 Suppl 10):9-15. Epub 1992/08/01.
87. Fischer V, Vickers AE, Heitz F, Mahadevan S, Baldeck JP, Minery P, et al. The polymorphic cytochrome P-4502D6 is involved in the metabolism of both 5-hydroxytryptamine antagonists, tropisetron and ondansetron. *Drug Metabolism and Disposition*. 1994;22(2):269-74. Epub 1994/03/01.
88. Wilde MI, Markham A. Ondansetron. A review of its pharmacology and preliminary clinical findings in novel applications. *Drugs*. 1996;52(5):773-94. Epub 1996/11/01.
89. Russell D, Kenny GN. 5-HT₃ antagonists in postoperative nausea and vomiting. *Br J Anaesth*. 1992;69(7 Suppl 1):63S-8S. Epub 1992/01/01.
90. GlaxoWellcome. Zofran (ondansetron hydrochloride) and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. In: *Zofran Product Information*. Research Triangle Park, NC. 1999.
91. Wring SA, Rooney RM, Goddard CP, Waterhouse I, Jenner WN. A sensitive radioimmunoassay, combined with solid-phase extraction, for the sub-nanogram per ml determination of ondansetron in human plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1994;12(3):361-71. Epub 1994/03/01.
92. Siluveru M, Stewart JT. Enantioselective determination of S-(+)- and R-(-)-ondansetron in human serum using derivatized cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*. 1997;691(1):217-22. Epub 1997/03/28.
93. Bauer S, Stormer E, Kaiser R, Tremblay PB, Brockmoller J, Roots I. Simultaneous determination of ondansetron and tropisetron in human plasma using HPLC with UV detection. *Biomedical Chromatography*. 2002;16(3):187-90. Epub 2002/03/29.
94. Colthup PV, Felgate CC, Palmer JL, Scully NL. Determination of ondansetron in plasma and its pharmacokinetics in the young and elderly. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1991;80(9):868-71. Epub 1991/09/01.
95. Colthup PV, Palmer JL. The determination in plasma and pharmacokinetics of ondansetron. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*. 1989;25 Suppl 1:S71-4. Epub 1989/01/01.
96. Depot M, Leroux S, Caille G. High-resolution liquid chromatographic method using ultraviolet detection for determination of ondansetron in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 1997;693(2):399-406. Epub 1997/06/06.
97. Kelly JW, He L, Stewart JT. High-performance liquid chromatographic separation of ondansetron enantiomers in serum using a cellulose-derivatized stationary phase and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography*. 1993;622(2):291-5. Epub 1993/12/22.

98. Liu J, Stewart JT. High-performance liquid chromatographic analysis of ondansetron enantiomers in human serum using a reversed-phase cellulose-based chiral stationary phase and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*. 1997;694(1):179-84. Epub 1997/06/20.
99. Armando YP, Schramm SG, Silva Mde F, Kano EK, Koono EE, Porta V, et al. Bioequivalence assay between orally disintegrating and conventional tablet formulations in healthy volunteers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;366(1-2):149-53. Epub 2008/10/14.
100. Dotsikas Y, Kousoulos C, Tsatsou G, Loukas YL. Development and validation of a rapid 96-well format based liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis method for ondansetron in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2006;836(1-2):79-82. Epub 2006/04/04.
101. Liu K, Dai X, Zhong D, Chen X. Quantitative determination of ondansetron in human plasma by enantioselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2008;864(1-2):129-36. Epub 2008/02/27.
102. Xu X, Bartlett MG, Stewart JT. Determination of ondansetron and its hydroxy metabolites in human serum using solid-phase extraction and liquid chromatography/positive ion electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2000;35(11):1329-34. Epub 2000/12/13.
103. Baldessarini RJ. Drug therapy of depression and anxiety disorders. 11th ed. L.L. B, Lazo JS, Parker KL, editors. New York: McGraw-Hill; 2006. 429-59 p.
104. Blier P, de Montigny C. Possible serotonergic mechanisms underlying the antidepressant and anti-obsessive-compulsive disorder responses. *Biol Psychiatry*. 1998;44(5):313-23. Epub 1998/10/02.
105. Kroeze WK, Roth BL. The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biol Psychiatry*. 1998;44(11):1128-42. Epub 1998/12/04.
106. Lemoine A, Gautier JC, Azoulay D, Kiffel L, Belloc C, Guengerich FP, et al. Major pathway of imipramine metabolism is catalyzed by cytochromes P-450 1A2 and P-450 3A4 in human liver. *Mol Pharmacol*. 1993;43(5):827-32. Epub 1993/05/01.
107. Ciraulo DA, Barnhill JG, Jaffe JH. Clinical pharmacokinetics of imipramine and desipramine in alcoholics and normal volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 1988;43(5):509-18. Epub 1988/05/01.
108. Gram LF, Christiansen J. First-pass metabolism of imipramine in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1975;17(5):555-63. Epub 1975/05/01.
109. Lanza di Scalea T, Wisner KL. Antidepressant medication use during breastfeeding. *Clin Obstet Gynecol*. 2009;52(3):483-97. Epub 2009/08/08.

110. Wong SH. Monitoring of drugs in breast milk. *Ann Clin Lab Sci.* 1985;15(2):100-5. Epub 1985/03/01.
111. Sallee FR, Pollock BG. Clinical pharmacokinetics of imipramine and desipramine. *Clin Pharmacokinet.* 1990;18(5):346-64. Epub 1990/05/01.
112. Ericksen SE. Recent advances in antidepressant drug treatment. *West J Med.* 1979;131(2):104-13. Epub 1979/08/01.
113. Kuhn R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry.* 1958;115(5):459-64. Epub 1958/11/01.
114. ANVISA. Bula Tofranil - Novartis2005 Acessado em 10 de Janeiro de 2013. Available from: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[26173-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[26173-1-0].PDF).
115. Ullmann U, Lehnfeld R, Bliesath H, Birkel M, Gebbing H, Grave M, et al. Relative bioavailability of imipramine (Tofranil) coated tablets in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2001;39(6):271-6. Epub 2001/06/30.
116. del Mar Ramirez Fernandez M, Wille SM, Samyn N. Quantitative method validation for the analysis of 27 antidepressants and metabolites in plasma with ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2012;34(1):11-24. Epub 2012/01/03.
117. Tanaka Y, Ohkawa T, Yasui H. Development of a novel high-throughput analytical methodology, multiple injection method, for quantitative analysis in drug metabolism and pharmacokinetic studies using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(8):1187-93. Epub 2011/08/02.
118. Rumel D, Nishioka Sde A, Santos AA. [Drug interchangeability: clinical approach and consumer's point of view]. *Rev Saude Publica.* 2006;40(5):921-7. Epub 2007/02/16. Intercambialidade de medicamentos: abordagem clinica e o ponto de vista do consumidor.
119. Lopes RA, Neves Fde A. Meta-analysis for bioequivalence studies: interchangeability of generic drugs and similar containing Hydrochlorothiazide is possible but not with Enalapril Maleate. *J Bras Nefrol.* 2010;32(2):173-81. Epub 2010/11/26.
120. Chow SC, Liu JP. Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies. 2 ed ed. New York: Taylor & Francis; 2009.
121. Galgatte UC, Jamdade VR, Aute PP, Chaudhari PD. Study on requirements of bioequivalence for registration of pharmaceutical products in USA, Europe and Canada. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society.* 2014;22(5):391-402. Epub 2014/12/05.
122. Rosenbaum SE. Effects of variability in hepatic clearance on the bioequivalence parameters of a drug and its metabolite: simulations using a

- pharmacostatistical model. *Pharm Acta Helv.* 1998;73(3):135-44. Epub 1998/08/26.
123. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE 1170, de 19 de abril de 2006., (2006).
 124. FDA. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), - Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products - Revision 1. 2003.
 125. Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW. The role of metabolites in bioequivalence. *Pharmaceutical research.* 2004;21(8):1331-44. Epub 2004/09/14.
 126. Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW. The bioequivalence of highly variable drugs and drug products. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2005;43(10):485-98. Epub 2005/10/26.
 127. Georgala S, Papassotiriou I, Georgala C, Demetriou E, Schulpis KH. Isotretinoin therapy induces DNA oxidative damage. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC.* 2005;43(11):1178-82. Epub 2005/10/20.
 128. Thiboutot DM, Gollnick HP. Treatment considerations for inflammatory acne: clinical evidence for adapalene 0.1% in combination therapies. *J Drugs Dermatol.* 2006;5(8):785-94. Epub 2006/09/23.
 129. Schug BS, Brendel E, Wolf D, Wonnemann M, Wargenau M, Blume HH. Formulation-dependent food effects demonstrated for nifedipine modified-release preparations marketed in the European Union. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences.* 2002;15(3):279-85. Epub 2002/03/30.
 130. Jones B, Kenward MG. Design and analysis of cross-over trials. 2nd ed. London: Chapman & Hall; 2003. 412 p.
 131. Licea-Perez H, Wang S, Bowen CL, Yang E. A semi-automated 96-well plate method for the simultaneous determination of oral contraceptives concentrations in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 2007;852(1-2):69-76. Epub 2007/01/30.
 132. Theron HB, Coetzee C, Sutherland FC, Wiesner JL, Swart KJ. Selective and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of levonorgestrel in human plasma. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 2004;813(1-2):331-6. Epub 2004/11/24.
 133. Borges NC, Rezende VM, Santana JM, Moreira RP, Moreira RF, Moreno P, et al. Chlorpromazine quantification in human plasma by UPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Application to a comparative

- pharmacokinetic study. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2011;879(31):3728-34. Epub 2011/11/15.
134. Chen J, Xiong C, Ruan J, Su Z. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of clozapine and chlorpromazine in urine. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2011;31(2):277-84. Epub 2011/04/21.
 135. Yamini U, Faraji M. Extraction and determination of trace amounts of chlorpromazine in biological fluids using magnetic solid phase extraction followed by CLAE. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014;4(4):7.
 136. Muller C, Schafer P, Stortzel M, Vogt S, Weinmann W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2002;773(1):47-52. Epub 2002/05/17.
 137. Hsieh Y, Chintala M, Mei H, Agans J, Brisson JM, Ng K, et al. Quantitative screening and matrix effect studies of drug discovery compounds in monkey plasma using fast-gradient liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2001;15(24):2481-7. Epub 2001/12/18.
 138. Chandrasekar D, Ramakrishna S, Diwan PV. A rapid, sensitive and validated method for the determination of ondansetron in human plasma by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *Arzneimittelforschung*. 2004;54(10):655-9. Epub 2004/11/24.
 139. Johnson-Davis KL, Juenke JM, Davis R, McMillin GA. Quantification of tricyclic antidepressants using UPLC-MS/MS. *Methods Mol Biol*. 2012;902:175-84. Epub 2012/07/07.
 140. Hasselstrom J. Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2011;879(1):123-8. Epub 2010/12/18.
 141. Churchwell MI, Twaddle NC, Meeker LR, Doerge DR. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;825(2):134-43. Epub 2005 Jul 5.
 142. Chambers EE, Woodcock MJ, Wheaton JP, Pekol TM, Diehl DM. Systematic development of an UPLC-MS/MS method for the determination of tricyclic antidepressants in human urine. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014;88:660-5. Epub 2013/11/19.

143. Shamsipur M, Mirmohammadi M. High performance liquid chromatographic determination of ultra traces of two tricyclic antidepressant drugs imipramine and trimipramine in urine samples after their dispersive liquid-liquid microextraction coupled with response surface optimization. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014;100:271-8. Epub 2014/09/03.
144. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.º 51 de 15 de agosto de 2007 (2007).
145. Chow SC, Liu J. Meta-analysis for bioequivalence review. *J Biopharm Stat*. 1997;7(1):97-111. Epub 1997/03/01.
146. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 134, de 29 de maio de 2003 *Diário Oficial da União, Brasília, DF*. 2003.
147. ANVISA. Aprovada intercambialidade de similares 2014 Acessado em 14 de Outubro de 2014. Available from: <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/cVTv>.
148. Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Molecular pharmaceutics*. 2006;3(6):631-43. Epub 2006/12/05.
149. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*. 1995;12(3):413-20. Epub 1995/03/01.
150. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharmaceutical research*. 1998;15(1):11-22. Epub 1998/03/06.
151. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 37, de 3 de agosto de 2011, (2011).
152. Makhey VD, Guo A, Norris DA, Hu P, Yan J, Sinko PJ. Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells. *Pharmaceutical research*. 1998;15(8):1160-7. Epub 1998/08/26.
153. Mariappan TT, Singh S. Evidence of efflux-mediated and saturable absorption of rifampicin in rat intestine using the ligated loop and everted gut sac techniques. *Molecular pharmaceutics*. 2004;1(5):363-7. Epub 2005/07/20.
154. Balimane PV, Chong S, Morrison RA. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2000;44(1):301-12. Epub 2001/03/29.
155. Neuhoff S, Ungell AL, Zamora I, Artursson P. pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European*

- Federation for Pharmaceutical Sciences. 2005;25(2-3):211-20. Epub 2005/05/25.
156. Putnam WS, Pan L, Tsutsui K, Takahashi L, Benet LZ. Comparison of bidirectional cephalexin transport across MDCK and caco-2 cell monolayers: interactions with peptide transporters. *Pharmaceutical research*. 2002;19(1):27-33. Epub 2002/02/12.
157. Putnam WS, Ramanathan S, Pan L, Takahashi LH, Benet LZ. Functional characterization of monocarboxylic acid, large neutral amino acid, bile acid and peptide transporters, and P-glycoprotein in MDCK and Caco-2 cells. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2002;91(12):2622-35. Epub 2002/11/16.
158. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for the who model list of essential medicines immediate release, solid oral dosage forms. Working document QAS/04.109/Rev.1 [database on the Internet]. 2005 [cited 10 de janeiro de 2015]. Available from: http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS04_109Rev1_Waive_invivo_bioequiv.pdf.
159. Ramirez E, Laosa O, Guerra P, Duque B, Mosquera B, Borobia AM, et al. Acceptability and characteristics of 124 human bioequivalence studies with active substances classified according to the Biopharmaceutic Classification System. *British journal of clinical pharmacology*. 2010;70(5):694-702. Epub 2010/11/03.
160. Bergstrom CA, Andersson SB, Fagerberg JH, Ragnarsson G, Lindahl A. Is the full potential of the biopharmaceutics classification system reached? *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2014;57:224-31. Epub 2013/10/01.
161. Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical research*. 2005;22(1):11-23. Epub 2005/03/18.
162. Cook J, Addicks W, Wu YH. Application of the biopharmaceutical classification system in clinical drug development--an industrial view. *The AAPS journal*. 2008;10(2):306-10. Epub 2008/05/27.

9. ANEXOS

9.1 APROVAÇÕES DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



CEP, 22/06/10
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 580/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 2927.0.000.146-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES DE CLORIDRATO DE CLORPROMAZINA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS: CLORIDRATO DE CLORPROMAZINA COMPRIMIDO REVESTIDO DE 100 MG (TESTE) PRODUZIDO PELA UNIÃO QUÍMICA FARMACÊUTICA NACIONAL S.A. E AMPLICTIL® COMPRIMIDO REVESTIDO DE 100 MG (REFERÊNCIA) PRODUZIDO PELO SANOFI-AVENTIS FARMACÊUTICA LTDA” (SPH030/10).

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ney Carter do Carmo Borges

INSTITUIÇÃO: Synchronphar

APRESENTAÇÃO AO CEP: 18/06/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/06/11 (O formulário encontra-se no site acima).

II - OBJETIVOS

Caracterização da taxa e extensão de biodisponibilidade de teste e referência após administração de uma dose oral única em condições de jejum.

III - SUMÁRIO

Estudo aberto, monocêntrico, balanceado, aleatorizado, cruzado, com 2 tratamentos, 2 seqüências, 2 períodos, nos quais os voluntários recebem, em cada período, a formulação teste ou a formulação referência, após jejum. A seqüência de tratamento atribuída a cada voluntário nos períodos de estudo é determinado por uma lista de aleatorização gerada automaticamente. As formulações serão administradas por via oral em dose única seguidos de coletas de sangue de pelo menos 3 meias vidas. Os períodos de tratamento devem obedecer um intervalo mínimo de 7 meias-vidas entre eles (período de wash out da droga), sendo deste estudo no mínimo 14 dias de intervalo. Os voluntários serão aleatoriamente designados a uma das seqüências de tratamento. A população a ser estudada será constituída de 72 voluntários sadios, adultos de ambos os sexos, com idade de 18 a 50 anos, com índice de massa corpórea maior ou igual a 18,5 e menor ou igual a 29,9. Não há restrições quanto ao grupo étnico. Os voluntários serão recrutados entre aqueles que se apresentem à Unidade Clínica. O volume de sangue coletado de cada voluntário será de cerca de 405 ml.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. O Termo de Consentimento é adequado e contém todas as informações para que o voluntário decida se quer ou não participar do estudo. Os critérios de inclusão e exclusão são adequados, bem como a forma de recrutamento dos voluntários.



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, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

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.).

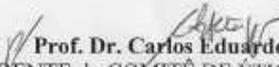
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e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

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de junho de 2010.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP


Prof. Dr. Carlos Silva Bortolotto
Vice-Presidente do
Comitê de Ética em Pesquisa
FCM/UNICAMP
Matrícula: 288564



CEP, 27/05/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 376/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 1435.0.000.146-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES DE ONDANSETRONA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS: ONDANSETRONA COMPRIMIDO REVESTIDO DE 8 MG (TESTE) PRODUZIDO PELA CRISTÁLIA PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS LTDA E ZOFRAN[®] COMPRIMIDO REVESTIDO DE 8 MG (REFERÊNCIA) PRODUZIDO PELO GLAXOSMITHKLINE” (SPH 16/08).

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ney Carter do Carmo Borges

INSTITUIÇÃO: Synchronphar – Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/04/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/05/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Caracterização da taxa e extensão de biodisponibilidade de teste e referência após a administração de uma dose oral única em condições de jejum.

III - SUMÁRIO

É um estudo piloto de bioequivalência, aberto, aleatorizado, cruzado, com 2 tratamentos, onde 28 voluntários de ambos os sexos, recebem, em cada período distinto, a formulação teste ou a formulação referência. A seqüência de tratamento atribuída a cada voluntário nos períodos de estudo é determinado por uma lista de aleatorização gerada automaticamente pelo sistema R2.2. As formulações são administradas em dose única por via oral, seguidos de coletas de sangue de pelo menos 3 meias-vidas. Os períodos de tratamento devem obedecer a um intervalo de 7 meias-vidas entre eles. Um volume total de 330 ml será coletado de cada voluntário.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequado e contém todas as informações para que o voluntário decida se quer ou não participar do estudo. Os critérios de inclusão e exclusão são adequados, bem como a forma de recrutamento dos voluntários.

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

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

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de maio de 2008.

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



CEP, 27/10/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 993/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 4317.0.000.146-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES DE CLORIDRATO DE IMPRAMINA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS: CLORIDRATO DE IMPRAMINA COMPRIMIDO REVESTIDO DE 25 MG (TESTE) PRODUZIDO PELA CRISTÁLIA PRODUTOS QUÍMICOS FARMACÊUTICOS LTDA. E TOFRANIL® DRÁGEA DE 25 MG (REFERÊNCIA) PRODUZIDO PELA NOVARTIS BIOCIENTIAS” (SPH025/09).

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ney Carter do Carmo Borges

INSTITUIÇÃO: Synchrophar

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/10/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/10/10 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Caracterização da taxa e extensão de biodisponibilidade de teste e referência após a administração de uma dose oral única em condições de jejum.

III - SUMÁRIO

É um estudo aberto, balanceado, aleatorizado, cruzado, com 2 tratamentos, onde 36 voluntários de ambos os sexos, recebem, em cada período distinto, a formulação teste ou a formulação referência. A seqüência de tratamento atribuída a cada voluntário nos períodos de estudo é determinado por uma lista de aleatorização gerada automaticamente pelo sistema R2.6. As formulações são administradas em dose única por via oral seguidos de coletas de sangue de pelo menos 3 meias -vidas. Os períodos de tratamento devem obedecer a um intervalo de 7 meias-vidas entre eles (14 dias). Um volume total de 390 ml será coletado de cada voluntário.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequado e contém todas as informações para que o voluntário decida se quer ou não participar do estudo. Os critérios de inclusão e exclusão são adequados, bem como a forma de recrutamento dos voluntários. O volume de sangue a ser colhido é adequado.

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, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

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

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de outubro de 2009.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP