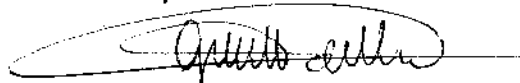


Este exemplar corresponde à
versão final da Tese de mes-
trado, apresentada à Faculdade
de Ciências Médicas da
Unicamp pelos médicos Marcelo
Nicolás Muscará.

Campinas, 05 de dezembro 1991



Prof. Dr. Gilberto de Mucit
- orientador -

ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA DE METRONIDAZOL E VERAPAMIL EM VOLUNTÁRIOS NORMAIS

Marcelo Nicolás Muscará

Dezembro, 1991

***Tese de Mestrado realizada no Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas, sob a orientação do
Prof. Dr. Gilberto de Nucci***

ÍNDICE

	Página
Título.....	1
Apresentação.....	2
Agradecimentos.....	3
Resumo.....	4
Lista de Materiais.....	5
Capítulo I: Introdução Geral.....	6
Capítulo II: Bioequivalência de quatro formulações de metronidazol.....	15
Capítulo III: Bioequivalência de duas formulações de verapamil.....	29
Capítulo IV: Discussão Geral.....	41
Summary.....	45
Referências Bibliográficas.....	46
Apêndice.....	53

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, aos meus irmãos, à nona e à Sandra pelo amor e apoio incondicional, ao qual me acostumaram.

Ao Claudio, por tantos anos de amizade e pela "indução enzimática" que fez este resultado possível.

À Emilse e Blanca por terem fornecido aquela força que alguma vez escasseou.

Aos Drs. John Salmon (Wellcome Research Labs., Beckenham, Inglaterra), Sílvia R. Santos (INCOR, São Paulo), Leonello Leone (Ospedale Infantile Regina Margherita, Turim, Itália), Pietro Fagiolino (Universidade de Montevideo, Uruguai) e Atholl Johnston (St. Bartholomew's Hospital, Londres, Inglaterra) pelas importantes contribuições no desenvolvimento de técnicas e discussão dos resultados estatísticos.

Aos amigos Eduardo A. Hofstätter e Rossana Anderson Marangoni, pela consideração e ajuda na difícil tarefa de integração.

Ao Dr. Edson Antunes, pela correção do manuscrito.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmacologia, por terem criado condições propícias de trabalho.

À FAPESP, pelas valiosas sugestões do assessor científico e o apoio financeiro recebido mediante a concessão da bolsa de mestrado.

Finalmente, agradeço ao Dr. Gilberto de Nucci, pela confiança depositada, pela orientação científica recebida e a grande "biDisponibilidade" humana, e à Dra. Lillian M. Babadópulos, pela paciência.

RESUMO

As diferenças entre os processos de fabricação e as matérias primas de formulações de uma determinada droga são algumas das principais causas da variabilidade observada na resposta individual à droga. A confirmação da bioequivalência entre diferentes formulações e/ou preparações farmacêuticas de uma determinada droga é de crítica importância para o ajuste adequado de regimes de dosificação.

Neste trabalho, são apresentados dois estudos de biodisponibilidade comparativa em voluntários normais. O primeiro deles versa sobre quatro formulações de metronidazol em diferentes dosagens, e o segundo sobre duas formulações de verapamil de liberação retardada.

As concentrações plasmáticas das drogas foram analisadas por cromatografia líquida de alta pressão (com detecção por absorbância UV no caso do metronidazol e por emissão de fluorescência para o verapamil).

Foram obtidos os dados farmacocinéticos, e a sua análise estatística foi efetuada mediante a aplicação de diferentes testes.

Os resultados mostram bioequivalência no caso das preparações de metronidazol com o mesmo conteúdo de droga, e ausência de bioequivalência para aquelas formulações com quantidades diferentes. As duas formulações de verapamil foram consideradas como não-bioequivalentes. Essas conclusões foram baseadas nos critérios utilizados pela "Food and Drug Administration".

LISTA DE MATERIAIS

FÁRMACOS

Trichomol 200 mg, lista F869, lote AT-1113

Trichomol 400 mg, lista F 870, lote AT-1116

Trichomol 500 mg, lista F871, lote AT-1117)

Geangin retard 240 mg comprimidos, lista F587, lote AT-1157

Abbott Latin America Development Center (Argentina)

Flagyl 400 mg Rhodia-Brasil

Dilacorón 240 mg retard comprimidos, lote 90560 Laboratório Knoll,
Brasil

REAGENTES

Metronidazol (p.a.) Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

Tinidazol (p.a.) Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

Cloridrato de verapamil (p.a.) Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

Fosfato di-ácido de potássio (p.a.) Merck S.A. Inds. Quims. (Rio de Janeiro, Brasil)

Hidróxido de sódio (p.a.) Merck S.A. Inds. Quims. (Rio de Janeiro, Brasil)

Fosfato di-ácido de sódio (p.a.) Merck S.A. Inds. Quims. (Rio de Janeiro, Brasil)

n-Heptano (p.a.) Merck S.A. Inds. Quims. (Rio de Janeiro, Brasil)

Ácido fosfórico (p.a.) Merck S.A. Inds. Quims. (Rio de Janeiro, Brasil)

Metanol (para cromatografia) Merck S.A. Inds. Quims. (Rio de Janeiro, Brasil)

Acetonitrila (para cromatografia) Merck S.A. Inds. Quims. (Rio de Janeiro, Brasil)

Flecainida Cedida gentilmente pelo Dr. L. Leone (Ospedale Infantile Regina Margherita, Turim, Itália).

Sulfato de zinco (p.a.) Reagen (Rio de Janeiro, Brasil)

Tetrahidrofurano (p.a.) Riedel-deHaen AG (Seelze, Alemanha)

COLUNAS E PRÉ-COLUNAS PARA HPLC

Coluna de fase reversa C₈, 250 x 4.6 mm (Lichrospher 100 RP-8),
tamanho médio de partícula 5 µm Merck

Coluna fase reversa, C₁₈, 250 x 4.6 mm, tamanho médio de partícula 10
µm

Pré-coluna fase reversa C₁₈, 15 x 4.6 mm, tamanho médio de partícula 7
µm Brownlee-Labs, Santa Clara, CA, USA

CAPÍTULO I:

INTRODUÇÃO GERAL

Existem vários fatores responsáveis pela grande diferença observada na resposta dos pacientes às drogas. Tais diferenças podem estar relacionadas à variabilidade da formulação da droga (variabilidade farmacêutica) ou a diferenças inter-sujeitos (a administração da mesma dose de uma mesma formulação pode produzir um efeito pequeno ou nulo num paciente, o efeito terapêutico desejado num segundo paciente, e um efeito tóxico num terceiro).

O primeiro fator inter-sujeitos é a variabilidade farmacocinética entre os mesmos. Este termo refere-se à velocidade e grau de absorção da droga, à sua distribuição entre os vários compartimentos corporais, a sua união às proteínas plasmáticas e aos tecidos, e a velocidade de metabolismo e excreção da droga. O resultado desta variabilidade é tal que, se a concentração plasmática da droga fosse medida, grandes diferenças seriam encontradas, apesar de todos eles estarem recebendo a mesma dose.

O segundo fator é a variabilidade farmacodinâmica entre indivíduos, ou seja, a diferença entre indivíduos em resposta a uma determinada concentração de droga no sítio de ação.

A farmacocinética poderia ser definida de uma forma simples como "o que o corpo faz à droga", e a farmacodinâmica como "o que a droga faz ao corpo". Outro determinante importante da resposta é "o que o paciente faz com a droga"; este último fator é chamado aderência ao tratamento.

FATORES FARMACÊUTICOS

Um aspecto que deve ser levado em consideração é o fato de que toda vez que um médico prescreve uma "droga", o paciente recebe um "remédio". As substâncias ativas só representam uma pequena proporção do peso total das medicações sólidas orais, tais como comprimidos ou cápsulas. Similarmente, as formas injetáveis requerem uma solução ou suspensão do princípio ativo num veículo líquido apropriado de complexidade variável. Diferenças nos componentes do excipiente de uma determinada forma farmacêutica (por exemplo diluentes, agentes agregantes, lubrificantes, agentes desintegrantes, revestimentos), assim como nos processos de fabricação (tamanho dos grânulos, pressão de

compressão dos comprimidos), influenciam notavelmente as velocidades de dissolução e absorção.

FATORES FARMACOCINÉTICOS

Absorção

A maioria das drogas são administradas por via oral. Os comprimidos e cápsulas devem passar por uma série de processos antes de alcançar a circulação sistêmica e produzir o efeito farmacológico. Uma vez ingerido, um comprimido ou cápsula deve se desintegrar, desagregar e dissolver no fluido gastrointestinal, antes de que a droga possa ser absorvida. As variáveis que determinam a velocidade e grau de incorporação da droga na corrente circulatória são:

- i. as propriedades físicoquímicas da droga: solubilidade, peso molecular, coeficiente de partição, forma cristalina;
- ii. a presença de alimentos ou outras substâncias: por exemplo, a metoclopramida aumenta as velocidades de absorção do acetaminofeno (Nimmo e col., 1973), levodopa (Morris e col., 1976), lítio (Crammer e col., 1974) e tetraciclina (Gothini e col., 1972), em quanto que a propantelina as diminui (*ibid.*);
- iii. o esvaziamento gástrico;
- iv. o tempo de trânsito intestinal;
- v. o pH do trato gastrointestinal: por exemplo, a acloridria aumenta a velocidade de absorção da aspirina (Pottage e col., 1974);
- vi. o fluxo biliar;
- vii. as características farmacêuticas da droga anteriormente expostas.

Esta velocidade e grau de absorção de uma droga administrada por via extravascular é conhecida como **biodisponibilidade** (F). A biodisponibilidade é determinada por comparação da área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo (AUC) obtida após a administração extravascular (ev) da droga, com aquela resultante de uma administração intravenosa (iv), corrigindo pelas doses administradas (D). Ou seja:

$$F = (AUC_{ev}/AUC_{iv}) \times (D_{iv}/D_{ev})$$

Duas formulações ou preparações farmacêuticas que exibem biodisponibilidades comparáveis são chamadas de **bioequivalentes**.

Distribuição

De modo geral, drogas que são rápida e livremente absorvidas a partir do trato gastrointestinal são também rapidamente distribuídas através dos diferentes compartimentos corporais. Muitas drogas, entretanto, ligam-se fortemente à proteínas plasmáticas e tissulares, e o grau de ligação afeta a cinética da droga em questão.

Para uma droga que não apresenta ligação significativa a proteínas, os tecidos seriam um compartimento aquoso adicional, nos quais a droga estaria dissolvida. Entretanto, uma ligação acima do 95% faria que a concentração de droga livre farmacologicamente ativa a nível da blofase seja muito baixa.

Uma droga que se liga significativamente a tecidos tem um volume de distribuição aparente (V_d) grande. Isto é o volume teórico de fluido necessário para conter a totalidade da droga presente no organismo a uma concentração igual à plasmática. O V_d não representa um volume real, e deve ser interpretado como a totalidade de fluidos corporais necessária se a droga estivesse uniformemente distribuída em todas as porções do corpo. Por exemplo, o V_d para a digoxina está em torno dos 70 litros/kg de peso (a água corporal total é aproximadamente 60% do peso, e a volemia 8%).

A ligação às proteínas é um fator determinante da velocidade de eliminação e, portanto, da meia-vida ($T_{1/2}$) através de mecanismos metabólicos e de excreção, já que estes processos, assim como o efeito farmacológico, dependem da quantidade de droga livre. Certos estados patológicos mostram uma concentração reduzida de proteínas plasmáticas, seja por uma produção reduzida, por exemplo na cirrose hepática (Blaschke, 1977), ou por uma perda aumentada, como no caso da síndrome nefrótica. A insuficiência renal pode também reduzir a ligação de drogas às proteínas plasmáticas devido a uma redução na afinidade da albumina, seja por mudanças na estrutura, seja por

acúmulo de inibidores endógenos (Sjoholm e col., 1976). Portanto, nestas patologias, a proporção de droga livre / droga ligada está aumentada, e a dose daqueles fármacos com alta afinidade por proteínas plasmáticas (98-99% de ligação) e índice terapêutico estreito deve ser diminuída.

Metabolização

A maioria das drogas administradas em humanos são metabolizadas por enzimas hepáticas, apesar de que certa metabolização pode acontecer também no trato gastrointestinal, nos pulmões e no sangue.

O metabolismo hepático é particularmente importante naquelas drogas com características lipossolúveis. Por reações de oxidação, dealquilação, redução, hidrólise (chamadas reações de fase I), e conjugação com ácido glucurônico, sulfúrico, aminoácidos (como glutation) e acetil coenzima A (N-acetilação; reações de fase II) as drogas são convertidas em metabólitos mais hidrossolúveis, favorecendo assim a sua excreção, mediada principalmente pelos rins.

Diversos fatores afetam a velocidade de metabolização:

- i. idade: por exemplo, os idosos apresentam diminuição do fluxo sanguíneo hepático e esplâncnico, do volume do fígado, assim como das atividades enzimáticas das monoxidasas de função mistas e NADPH redutase hepáticas (Schmuker, 1985). Nos neonatos e crianças, a velocidade de metabolização da teofilina está aumentada, assim como a variabilidade dela com a dose (Ellis e col., 1976); estas diferenças aparentemente desaparecem na puberdade;
- ii. estado nutricional e constituição da dieta;
- iii. co-administração de drogas indutoras (fenobarbital) ou inibidoras (etanol) das enzimas hepáticas microssomais;
- iv. doenças, principalmente hepáticas e cardiovasculares;
- v. tabaco: o fumo aumenta a velocidade de eliminação de várias drogas, tais como: antipirina, cafeína, imipramina, lidocaína, teofilina, propranolol, oxazepam (Jusko, 1984).

Os fatores anteriormente citados devem ser levados em consideração na hora da prescrição.

Dois importantes processos metabólicos hepáticos são controlados geneticamente: a acetilação pela N-acetil transferase e a hidroxilação catalizada pela monoxigenase. Tem sido reportadas altas percentagens de indivíduos com diferenças genéticas em diversas sociedades e grupos étnicos, razão pela qual as dosificações de drogas que sofrem estes processos de metabolização devem ser cuidadosamente ajustadas segundo as características próprias destes grupos genéticos.

Por exemplo, acima de 95% dos esquimós canadenses são acetiladores rápidos da isoniazida, mas estes representam apenas 18% da população egípcia. Aproximadamente 10% da população britânica tem uma redução em uma monoxigenase hepática específica responsável pela hidroxilação da debrisoquina, perhexilina, nortriptilina e outras drogas. Estes indivíduos têm um risco incrementado de desenvolvimento de neuropatia periférica quando tratados com a droga anti anginosa perhexilina (Turner e col., 1986).

Excreção

A maioria das drogas são excretadas na urina como metabólitos, mas algumas são excretadas *in natura*, dependendo da sua hidrossolubilidade.

Algumas drogas lipossolúveis podem aparecer no filtrado glomerular, devido a sua baixa afinidade pelas proteínas plasmáticas, mas voltam rapidamente à corrente sanguínea por difusão passiva a nível do túbulo proximal; só são excretadas quando convertidas em metabólitos mais polares que já não podem sofrer esse processo de reabsorção. A administração concomitante de substâncias que alteram o pH urinário tem também uma forte influência na excreção de drogas com características ácido-base (a excreção de drogas com características básicas, como a anfetamina, é favorecida por acidificação da urina, por exemplo, com cloreto de amônio). A alteração da proporção de droga no estado não-ionizado no ultrafiltrado glomerular vai determinar o grau de reabsorção passiva da mesma, e assim uma maior ou menor concentração plasmática do princípio ativo.

A idade, através da diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtrado glomerular a uma velocidade de aproximadamente 1-2% por

ano (Schmuker, 1985) bem como o estado de higidez afetam acentuadamente os processos de excreção renal. A quantificação da concentração de creatinina e/ou uréia sérica, como indicadores da taxa de filtração glomerular, pode ajudar o médico no ajuste adequado da dosificação do medicamento.

Outra via de excreção importante, principalmente naqueles pacientes com capacidade de excreção renal reduzida, é a biliar, quer a droga *in natura* ou sob a forma conjugada. Aquí reaparece o fenômeno de reabsorção. Alguns conjugados são primeiramente metabolizados ao composto ativo pelas bactérias intestinais e, posteriormente, absorvidos. Este processo resulta num prolongamento da meia-vida e duração da ação da droga.

FATORES FARMACODINÂMICOS

Segundo Turner e col. (1986), as vias pelas quais uma droga pode produzir um efeito farmacológico são 4:

- i. por interação com receptores específicos (segundo o tipo de ação farmacológica são classificados em agonistas ou antagonistas);
- ii. por inibição de processos fisiológicos enzimáticos, trata-se por exemplo do caso dos inibidores da enzima conversora de angiotensina I;
- iii. por interação com processos biossintéticos (por exemplo, os análogos de purina exercem a sua ação citotóxica por ligação ao ADN e inibem o processo de tradução na síntese protéica);
- iv. por uma ação física direta, por exemplo o efeito dos sais purgativos, baseado numa maior retenção de água por aumento da osmolaridade no intestino, ou a difusão dos anestésicos voláteis na membrana plasmática, inibindo assim a sua capacidade de despolarização.

Existem drogas que atuam por outros mecanismos, por exemplo as vitaminas, como cofatores nos processos enzimáticos, os quelantes (como o EDTA) no tratamento de intoxicação com metais pesados, ou o carvão ativado, como adsorvente de substâncias.

As principais causas de diferenças na resposta a uma droga são dadas pelos fatores genéticos que dão origem às indiossincrasias,

manifestando-se como hiporreatividade, supersensibilidade, ou desenvolvendo o fenômeno de tolerância. A regulação da quantidade e/ou afinidade dos receptores alcança extremos patológicos, como no caso da expressão do oncogen *erbA* que codifica o receptor para o hormônio tiroideo, mas sem o seu sítio de união (Evans, 1988), ou quando provocado por autoimunidade, como é o caso da miastenia gravis (Almon e col., 1974), na qual observa-se uma depleção dos receptores nicotínicos a nível da junção neuromuscular.

ADERÊNCIA AO TRATAMENTO

A falta de aderência ao tratamento é uma das maiores causas que afetam a resposta à uma droga. É particularmente problemático nas pessoas muito jovens ou velhas, naqueles pacientes com doenças psiquiátricas, e naqueles sob tratamento crônico, especialmente quando a doença provoca poucos sintomas, como por exemplo, a hipertensão arterial.

A falta de aderência pode ser suspeitada em pacientes que não respondem a uma dose razoável da droga, a qual pode ser confirmada pela medida dos seus níveis plasmáticos ou urinários.

O uso de drogas como instrumento para a reversão de um quadro patológico, exerce um papel fundamental, ainda quando os conhecimentos sobre os seus mecanismos de ação sejam limitados. Entretanto, o constante desenvolvimento de drogas eficazes e seletivas, mas potencialmente perigosas, obriga ao estudo minucioso dos regimes de dosificação.

Baseado nas premissas de que:

- i. o efeito terapêutico de uma droga correlaciona-se melhor com a concentração plasmática do que com a dose;
- ii. existe uma faixa de valores de concentração plasmática na qual a maioria dos pacientes experimenta um benefício clínico máximo, com efeitos tóxicos e/ou colaterais mínimos;
- iii. por ajuste da dose e o tempo de administração, com base nas medidas de concentração plasmática, o atingimento e manutenção da

faixa terapêutica ótima conduz a um benefício para o paciente maior daquele obtido só com a avaliação clínica;

surgiu a necessidade da monitorização de drogas, cujo objetivo é conseguir um controle individual sobre os aspectos já expostos que influenciam o efeito farmacológico de uma droga, atingindo no final um regime ótimo de dosificação .

As técnicas analíticas utilizadas são diversas e dependem, principalmente, do tipo de composto, das suas características químicas, e do nível de sensibilidade pretendido.

Entre elas encontram-se as seguintes: 1) testes colorimétricos, 2) imunoensaios, 3) cromatografia em camada delgada, 4) cromatografia gasosa, 5) cromatografia líquida de alta pressão, 6) espectrofotometria (visível, ultravioleta, fluorescência, infravermelho), 7) espectrometria de massa, 8) espectrometria de ressonância magnética nuclear, 9) ensaios biológicos.

A maioria das drogas são monitorizadas pela concentração atingida no plasma ou soro, mas isto não deve ser tomado como regra geral, já que dependendo do tipo de droga, às vezes uma medida da concentração sanguínea, como por exemplo da ciclosporina, é muito mais representativa.

As concentrações urinárias são úteis para avaliar a aderência ao tratamento.

As concentrações em saliva, apesar de ser um material abundante e fácil de colher, em poucos casos tem alguma correlação com a ação farmacológica. As concentrações salivares de um fármaco são expressão da porção livre do mesmo. Mas os valores de concentração salivar correlacionam-se com os plasmáticos só na fase de eliminação, ou seja quando a absorção já foi completada e o equilíbrio atingido entre os diversos tecidos e fluídos (distribuição; Fagiolino, 1990).

Como na maior parte dos casos os efeitos tóxicos ou terapêuticos de uma droga dependem da sua concentração plasmática, as diferenças de biodisponibilidade entre formulações e/ou preparações farmacêuticas são de relevância clínica. Os problemas devidos à falta de bioequivalência são frequentemente encontrados nos pacientes submetidos a terapia a longo prazo. Quando estes pacientes, estabilizados com um dado produto

farmacêutico, recebem um substituto não equivalente, níveis plasmáticos sub ou supraterapêuticos aparecem, resultando nas respectivas ausência de efeito terapêutico ou aparecimento de efeitos tóxicos.

Para normatizar esta substituição, a Food and Drug Administration (FDA, EEUU;1985) tem regulamentado os procedimentos para a determinação da biodisponibilidade de uma formulação ou preparação nova relativa a outra, tomada como referência.

Ao longo da presente tese são descritos dois estudos de avaliação de bioequivalência entre formulações do metronidazol (capítulo II) e do verapamil (capítulo III). Estes estudos foram realizados na Unidade de Farmacologia Clínica "Miguel Servet" do Hospital das Clínicas (UNICAMP) durante o período compreendido entre Julho de 1990 e Janeiro de 1991.

CAPÍTULO II:

BIOEQUIVALÊNCIA DE QUATRO FORMULAÇÕES DE METRONIDAZOL

INTRODUÇÃO

O metronidazol [1 - (2-hidroxietil) - 2 - metil - 5 -nitroimidazol] é um agente antibacteriano e antiprotozoário sintético amplamente usado no tratamento de infecções causadas por bactérias, amebas e tricomonas (Brogden e col., 1978; Shank e Amerson, 1981). O metronidazol encontra-se sob a forma não-iônica em pH fisiológico e é rapidamente incorporado por organismos anaeróbicos e células (Muller e Lindmark, 1976; Brogden e col., 1978). Adicionalmente, o metronidazol também apresenta efeitos anti-inflamatórios tais como redução do edema inflamatório e alívio da dor em pacientes com úlcera de pele, e inibição do edema de pata de rato induzido por formalina (Tanga e col., 1975). A terapia tópica é efetiva para o tratamento da rosácea (Bleicher e col., 1987; Gamborg Nielsen, 1988). O metronidazol parece ter alguma atividade imunossupressora seletiva, com inibição de alguns, mas não de todos, parâmetros da imunidade celular, como por exemplo, a supressão da formação de granuloma (Grove e col., 1977). Uma melhora na migração de neutrófilos *in vitro* foi reportada em pacientes com doença de Crohn, mas não foi observado qualquer efeito nos leucócitos de pacientes normais (Gnarpe e col., 1981).

Em humanos, a droga é completamente absorvida após a administração oral (pelo menos após doses terapêuticas de até 2 g; Anderson, 1981), e extensamente metabolizada pelo(s) citocromo(s) P-450 (ainda não totalmente identificado(s); Loft e col., 1991). A oxidação mediada por P450 dá origem a dois metabólitos principais: o hidroximetronidazol (tem aproximadamente 65% da atividade farmacológica do metronidazol) e o derivado acético (inativo; Haller, 1982). A excreção renal da droga *in natura* e a glucuronidação parecem ser vias de eliminação menos importantes (Ralph, 1983).

Como o metronidazol apresenta propriedades farmacocinéticas atrativas como modelo de estudo do metabolismo xenobiótico, vários estudos descrevendo diferentes métodos para a sua quantificação tem sido relatados: bioensaios (Ralph e col., 1974), espectrofotometria, cromatografia de camada delgada (TLC; Gattavecchia e col., 1981), polarografia, cromatografia gasosa (GLC; Midha e col., 1973) e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC; Lanbeck e Lindstrom, 1979;

Jensen e Gugler, 1983; Adamovics, 1984; Roux e col., 1984; Rona e Gachalyi, 1987).

No presente estudo, os perfis farmacocinéticos de três diferentes doses de uma formulação de metronidazol ainda não comercializada (Trichomol) são comparados com o do comercialmente disponível Flagyl[®] em voluntários sadios, usando um método de HPLC de fase reversa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos voluntários

Quatorze voluntários sadios do sexo masculino, idade entre 19 e 30 anos (média = 24 ± 3), peso entre 55 e 100 Kg (média = 73 ± 3) e dentro do 15% do peso corporal ideal, participaram do estudo. Todos os voluntários assinaram o termo de consentimento esclarecido (vide APÊNDICE), e o protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética do nosso Hospital Universitário (vide APÊNDICE).

Os voluntários não apresentavam sinais ou sintomas evidentes de doenças cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica ou psiquiátrica, com base na história clínica, nos exames físico e psiquiátrico e nos seguintes exames laboratoriais: glicemia, uréia, creatinina, SGOT, SGPT, fosfatase alcalina, gamma GT, colinesterase, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, ácido úrico, sódio, potássio, cloreto, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células brancas, velocidade de sedimentação eritrocitária e exame de urina e protoparasitológico.

Protocolo clínico

O estudo foi conduzido segundo um delineamento aleatório cruzado de quatro períodos (vide sequência de administração no APÊNDICE), com um período de sete dias entre cada uma das doses ("washout").

Ao longo de cada período, os voluntários foram hospitalizados às 23:00 h após um jantar padrão. Depois de uma noite de jejum, receberam (às 8:00 h) uma dose única de metronidazol (comprimidos) [200 mg (Tri200), 400 mg (Tri400), 500 mg (Tri500), ou Flagyl 400 mg

(Fla400)] com 200 ml de água potável. Quatro horas após a administração, um almoço padrão foi servido, seguido de um jantar padrão 10 h após a dose. Não foi permitida a ingestão de outros alimentos durante o período de internação. Após o almoço, a ingestão de líquidos foi *ad libitum*, mas bebidas contendo xantinas (incluindo chá, café e coca-cola) foram evitadas.

Análise das concentrações plasmáticas de metronidazol

As amostras de sangue (3 ml) foram coletadas através de "butterfly" heparinizado colocado em veia antecubital cateterizada, e colocadas em tubos contendo EDTA como anticoagulante 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 8 e 12 h após a administração do metronidazol. Os voluntários voltaram ao hospital na manhã seguinte para uma coleta de sangue adicional de 24 h. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 g durante 5 min e os plasmas foram separados e guardados à -20 °C até serem analisados. Todas as amostras pertencentes ao mesmo voluntário foram analisadas num mesmo dia.

A curva padrão foi construída a partir de um plasma branco ao qual foram adicionadas quantidades conhecidas de metronidazol.

As concentrações plasmáticas foram medidas por HPLC de fase reversa com detecção por absorção no ultravioleta, segundo a descrição de Jensen e Gugler (1983).

50 μ l do padrão interno (tinidazol 25 μ g/ml, dissolvido em etanol) foram adicionados a 200 μ l de plasma (pontos da curva padrão e amostras dos voluntários). Após a mistura, a desproteinização foi realizada por adição de 50 μ l de ZnSO₄ (solução aquosa 0.1 M). Os tubos foram vigorosamente agitados em vórtex durante 15 s e colocados no freezer à -20 °C até congelamento. Posteriormente os tubos foram centrifugados (2000 g durante 10 min), e 20 μ l da fase sobrenadante foram injetados no cromatógrafo.

Os sistemas isocráticos de HPLC utilizados foram os seguintes: bomba Waters M450 acoplada a um detector UV-visível Dupont (série 8800) com sinal de saída registrado num registrador potenciométrico; bomba Milton Roy (Constametric 3000) acoplada a detector UV-visível LDC Analytical (spectroMonitor 3100) e sinal de saída registrado num

integrador computadorizado Milton Roy CI4000. Um injetor automático de amostras Milton Roy autosampler foi utilizado com este último sistema.

A coluna utilizada foi de fase reversa, C₁₈, 250 x 4.6 mm, tamanho médio de partícula 10 µm, precedida por uma pré-coluna (fase reversa C₁₈, 15 x 4.6 mm, 7 µm).

A fase móvel [tampão KH₂PO₄ (5 mM, pH 4.5) / metanol / tetrahidrofurano (82.6 / 16.5 / 0.9)] foi bombeada a um fluxo de 1.4 ml/min, e os picos de metronidazol e tinidazol foram detectados a 324 nm (sensibilidade, 0.02 AUFS).

As razões das alturas dos picos de metronidazol / padrão interno foram obtidas. As concentrações plasmáticas das amostras foram derivadas a partir da equação de regressão da reta obtida com a curva padrão (concentração de metronidazol em função das razões de alturas).

Análise Estatística e Farmacocinética

As curvas individuais de concentração plasmática de metronidazol em função do tempo foram obtidas para cada uma das formulações. A constante de eliminação terminal de primeira ordem (K_e) foi estimada a partir da equação de regressão linear entre o logaritmo da concentração (foram selecionadas aquelas que descreviam uma fase terminal de decaimento linear) e o tempo. A estimativa da meia-vida ($T_{1/2}$) foi derivada a partir desta constante de eliminação ($\ln 2 / K_e$).

A concentração máxima atingida (C_{max}) e o tempo ao qual a mesma aparece (T_{max}) foram obtidas. As áreas sob as curvas de concentração de metronidazol-tempo desde 0 a 24 h ($AUC_{[0-24]}$) foram calculadas aplicando a regra linear dos trapézios (vide APÊNDICE). A extrapolação desta área a tempo infinito ($AUC_{[0-\infty]}$) foi realizada somando o valor C_{24}/K_e à $AUC_{[0-24]}$ previamente calculada (onde C_{24} corresponde à concentração plasmática 24 h após a dose).

Os dados obtidos de C_{max} e $AUC_{[0-24]}$ (e as razões individuais entre formulações) foram analisados estatisticamente utilizando testes paramétricos (teste de ANOVA de uma via para dados não-transformados e transformados por logaritmo) e não-paramétricos (teste de Wilcoxon; Steinijans e Diletti, 1985).

Os seguintes softwares foram usados:

Biobequivalence Program For Two-Period Cross-Over Studies
Version 3.4., January 29, 1990 by Herman P. Wijnan, Holanda.

SIPHAR - An integrated computer system for pharmacokinetic data
analysis, by SIMED, França.

Todos os valores foram expressos como média $\pm$ EP exceto quando
especificado de outra forma.

RESULTADOS

Todas as formulações de metronidazol foram bem toleradas, não
tendo sido registradas quaisquer intercorrências. Os valores de
laboratório clínico após o estudo permaneceram dentro do intervalo de
valores de referência.

A figura 1 mostra um exemplo dos cromatogramas obtidos. Os
tempos de retenção foram 4.6-4.9 min para o metronidazol e 6.0-6.4 min
para o padrão interno. O limite de sensibilidade sob as nossas condições
experimentais foi 0.05 $\mu\text{g/ml}$. A curva de calibração foi linear na faixa
0.05 a 25 $\mu\text{g/ml}$, os coeficientes de regressão foram iguais ou maiores
que 0.999 e os interceptos não foram significativamente diferentes de
zero. A variação inter-ensaio (como coeficiente de variação percentual,
%CV) variou entre 1.1 e 3.2% para concentrações de metronidazol na
faixa de 0.7-18.5 $\mu\text{g/ml}$, e alcançou o 15% para as concentrações
menores que 0.4 $\mu\text{g/ml}$ (n=9). Dez amostras de cada valor de
concentração: baixo (0.4 $\mu\text{g/ml}$), médio (1.85 $\mu\text{g/ml}$) e alto (12.8 $\mu\text{g/ml}$),
foram ensaiadas durante a mesma corrida cromatográfica, e os valores
de %CV intra-ensaio obtidos foram 1.6, 1.1 e 3.0%, respectivamente.

As curvas individuais de concentração plasmática de metronidazol
em função do tempo são mostradas no APÊNDICE. A figura 2 mostra as
curvas das médias das concentrações plasmáticas de metronidazol em
função do tempo para as quatro formulações (dados da tabela I). Não
foram observadas diferenças significativas entre valores de T_{max} obtidos
(tabela III). Como é mostrado nesta tabela, os valores médios de $T_{1/2}$
situaram-se na faixa 10.1 a 12.6 h com superposição dos intervalos de
confiança do 95%.

Os valores das médias aritméticas de $C_{\max}$ para Tri200, Tri400, Fla400 e Tri500 foram 4.5, 10.2, 9.5 e 12.2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (tabela III). As médias geométricas das razões individuais de $C_{\max}$ foram calculadas, assim como seus intervalos de confiança de 90 e 95%. Nenhum intervalo de confiança das razões percentuais de $C_{\max}$ entre quaisquer das formulações situou-se compreendido na faixa 80-120%, segundo determinado por estatística paramétrica e não-paramétrica (Tabela II).

As médias aritméticas das $\text{AUC}_{[0-24]}$ foram comparadas entre as formulações, e diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre Tri200 e Tri400 (49.5 ± 3.6 vs 106.6 ± 9.0 ; $p < 0.001$), Tri200 e Fla400 (96.4 ± 4.6 ; $p < 0.001$), Tri200 e Tri500 (134.7 ± 7.8 ; $p < 0.001$), Tri400 e Tri500 ($P < 0.05$) e entre Fla400 e Tri500 ($p < 0.001$). Não houve diferenças significativas entre Tri400 e Fla400 (tabela II). A tabela II mostra que os intervalos de confiança das razões percentuais de $\text{AUC}_{[0-24]}$ para Tri400/Fla400 coincidiram com a faixa 80-120%. As razões para Tri400/Tri200, Tri500/Tri200, Tri500/Tri400, Tri500/Fla400 e Tri200/Fla400 ficaram excluídas da faixa considerada de bioequivalência. A análise da variância não mostrou efeito significativo devido ao período.

As figuras 3 e 4 mostram as correlações entre a dose ingerida e as $C_{\max}$ ($r=0.69$, $\text{df}=54$) e $\text{AUC}_{[0-24]}$ ($r=0.77$, $\text{df}=54$) individuais, respectivamente, sendo ambas inclinações significativamente diferentes de zero ($p < 0.001$).

DISCUSSÃO

O uso do ZnSO_4 para a precipitação de proteínas seguido de congelamento e centrifugação resultou num sobrenadante suficientemente limpo que pode ser injetado diretamente na pré-coluna sem perda considerável de eficiência ou aumento na pressão do sistema cromatográfico, mesmo após mais de 500 análises. O uso de um injetor automático foi possível devido à ausência de formação de precipitados tardios durante o período de um dia normal de trabalho. Estas considerações permitiram evitar o emprego de solventes orgânicos para a extração (Lanbeck e Linstrom, 1979; Roux e col., 1984), assim como materiais tão custosos como colunas adsorventes de sílica ou membranas para ultrafiltração (Adamovics, 1984).

A correlação entre a dose ingerida e os valores individuais de C_{max} e $\text{AUC}_{[0-24]}$, e a sobreposição das faixas das médias de $T_{1/2}$ e as medianas de T_{max} indicam que não existem quaisquer diferenças nos perfis de absorção e/ou eliminação entre as formulações testadas.

As conclusões sobre a bioequivalência das formulações foi baseada nos requerimentos da FDA (1985), como por exemplo a análise farmacocinética dos valores de C_{max} e $\text{AUC}_{[0-24]}$. Os tratamentos estatísticos dos dados de C_{max} e $\text{AUC}_{[0-24]}$, bem como as razões individuais, mostraram resultados semelhantes, seja quando testes paramétricos ou não paramétricos foram utilizados.

Em síntese, no presente estudo nós usamos uma metodologia de HPLC que ofereceu as vantagens de ser tão precisa, reproduzível e sensível quanto outras descritas na literatura que requerem, entretanto, volumes de amostra tão grandes quanto 1 ml (Adamovics, 1984; Roux e col., 1984; Rona e Gachalyi, 1987). Este método simples e rápido permite a análise de todas as amostras pertencentes ao mesmo voluntário no mesmo dia, evitando assim as variações inter-dias. Os nossos resultados demonstraram que a formulação Tri400 é bioequivalente à formulação comercial Flagyl 400 mg, segundo os requerimentos da FDA.

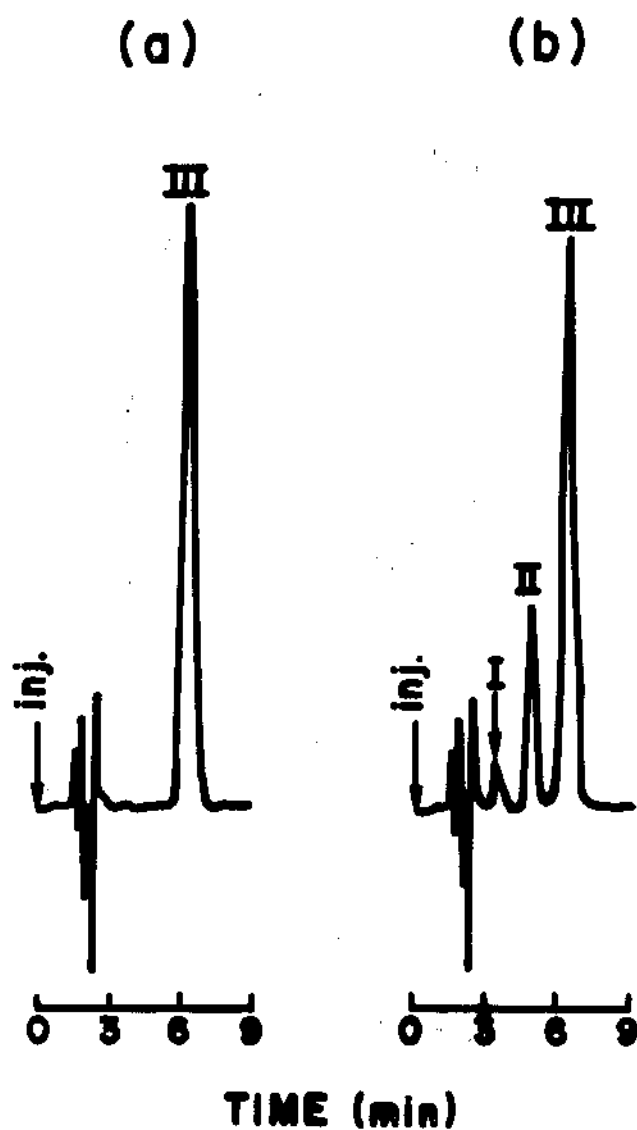


Figura 1 - Cromatogramas típicos de HPLC mostrando: (a) amostra de plasma previo à administração do metronidazol, (b) amostra de plasma obtida 8 h após uma dose de 500 mg de metronidazol (concentração , 7.8 $\mu\text{g/ml}$). I, Hidroximetronidazol ; II, metronidazol ; III, tinidazol (padrão interno).

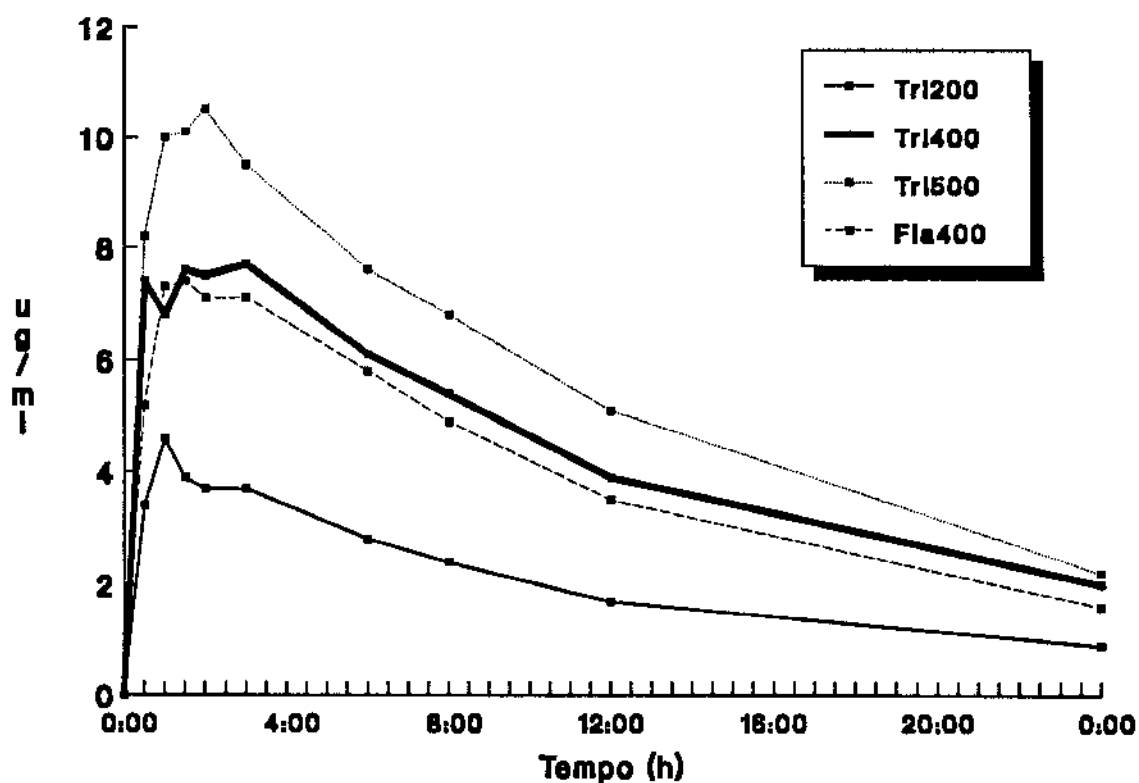


Figura 2 - Concentrações plasmáticas médias de 4 formulações de metronidazol em função do tempo. Os dados correspondem a média de 14 voluntários. Tri200 = Trichomol (200 mg); Tri400 = Trichomol (400 mg); Tri500 = Trichomol (500 mg); Fla400 = Flagyl (400 mg).

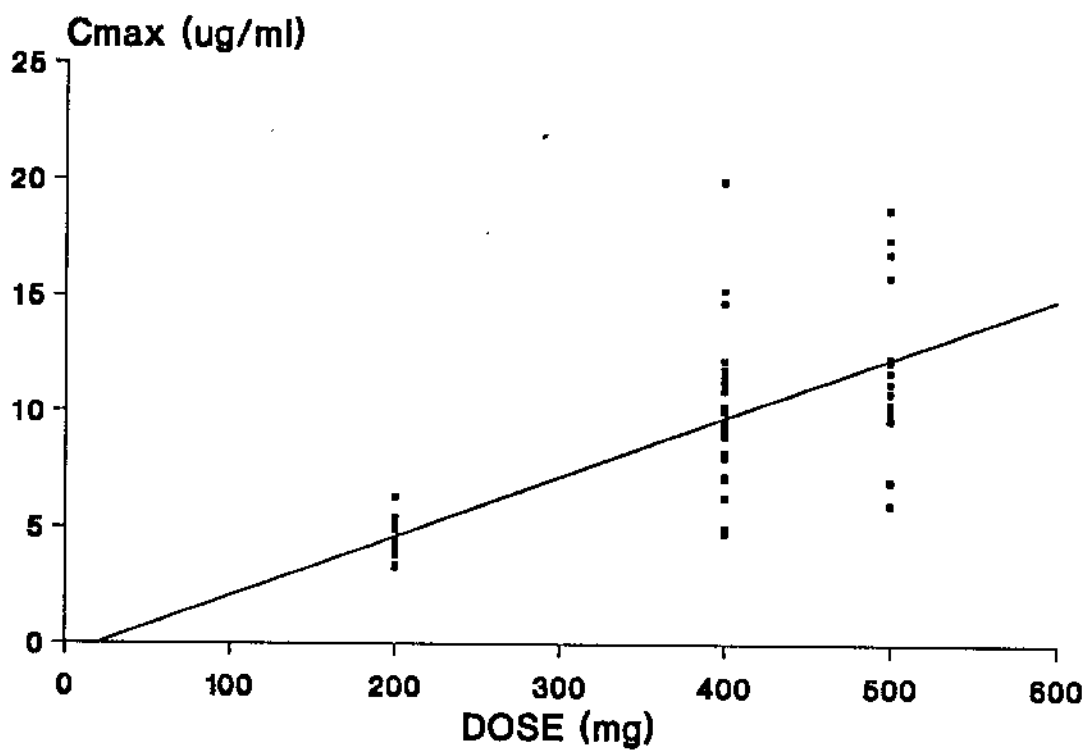


Figura 3 - Dados individuais de C_{max} em função da dose de metronidazol ingerida. ($r=0.69$, $p<0.001$, $df=54$)

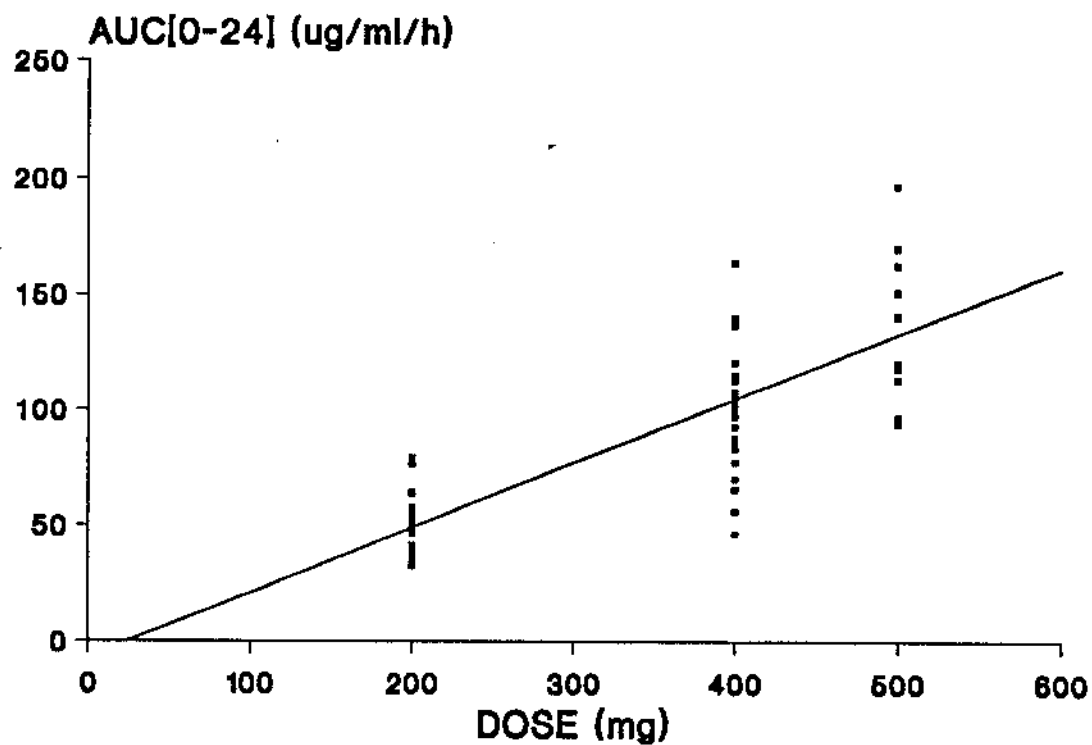


Figura 4 - Dados individuais de AUC_[0-24] em função da dose de metronidazol ingerida. ($r=0.77$, $p<0.001$, $df=54$)

Tabela I - Concentrações plasmáticas de metronidazol [média (DP); $\mu\text{g/ml}$] de quatro formulações para quatorze voluntários humanos.

Tempo (h)	Tri200	n	Tri400	n	Tri500	n	Fla400	n
0	0.0 (0.0)	14	0.0 (0.0)	14	0.0 (0.0)	14	0.0 (0.0)	14
0.5	3.4 (1.5)	14	7.4 (4.9)	14	8.2 (4.8)	14	5.2 (4.5)	13
1	4.6 (3.9)	14	6.8 (1.9)	14	10.0 (3.0)	13	7.3 (3.7)	14
1.5	3.9 (1.1)	13	7.6 (2.4)	14	10.1 (3.3)	14	7.4 (2.9)	14
2	3.7 (0.9)	12	7.5 (1.8)	14	10.5 (3.3)	13	7.1 (2.2)	14
3	2.8 (0.6)	14	7.7 (2.7)	14	9.5 (2.6)	14	7.1 (2.7)	14
6	2.8 (0.6)	14	6.1 (2.2)	14	7.6 (2.2)	14	5.8 (1.2)	14
8	2.4 (0.7)	14	5.4 (2.3)	14	6.8 (1.1)	14	4.9 (1.0)	14
12	1.7 (0.6)	14	3.9 (1.5)	14	5.1 (1.1)	14	3.5 (0.8)	14
24	0.9 (0.6)	14	2.0 (1.4)	14	2.2 (1.1)	14	1.6 (0.5)	14

Tabela II - Análise estatística das razões individuais de $AUC_{[0-24]}$ e C_{max} para as quatro formulações de metronidazol.

RAZÃO	Tri200/Fla400	Tri400/Fla400	Tri500/Fla400	Tri400/Tri200	Tri500/Tri200	Tri500/Tri400
$AUC_{[0-24]}$						
Média geom	50.6	106.9	139.3	211.3	275.5	130.4
IC 90% (np)	45.9-55.6	94.8-118.3	126.3-152.8	194.2-234.8	254.2-305.2	116.8-143.7
IC 90% (p)	46.5-55.1	96.9-117.9	127.9-151.7	191.9-232.7	251.7-301.4	118.4-143.5
IC 95% (p)	45.6-56.1	94.8-120.5	125.5-154.6	187.8-237.7	246.8-307.4	115.9-146.6
C_{max}						
Média geom	48.5	109.6	126.2	215.9	260.2	120.5
IC 90% (np)	43.8-54.1	92.0-135.6	110.2-146.7	185.7-250.1	240.7-296.4	103.2-146.3
IC 90% (p)	43.9-53.6	91.8-130.7	108.4-146.8	188.2-247.8	229.5-294.9	102.5-141.6
IC 95% (p)	42.9-54.7	88.3-135.9	104.9-151.8	182.5-255.4	223.3-303.2	99.0-146.7

np, Análise não-paramétrica segundo Steinijans e Diletti (1985); p, análise paramétrica ; IC, intervalo de confiança

Tabela III - Principais parâmetros farmacocinéticos de quatro formulações de metronidazol obtidos em 14 voluntários normais sadios.

	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC_[0-24] ($\mu\text{g h mL}^{-1}$)				
média aritmética	49.5	106.6	134.7	96.4
(EP)	(3.6)	(9.0)	(7.8)	(4.6)
AUC_[0-inf] ($\mu\text{g h mL}^{-1}$)				
média aritmética	67.7	119.6	169.8	121.7
(EP)	(8.8)	(10.9)	(13.6)	(6.7)
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)				
média aritmética	4.5	10.2	12.2	9.5
(EP)	(0.2)	(1.0)	(1.0)	(0.6)
T_{1/2} (h)				
média aritmética	10.8	12.6	10.1	10.2
(IC 95%)	(8.0-13.6)	(6.8-18.4)	(8.5-11.7)	(8.5-12.9)
T_{max} (h)				
mediana	1.5	1.5	1.5	1.5
[faixa]	[0.5-3]	[0.5-8]	[0.5-3]	[0.5-3]

CAPÍTULO III:

BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES DE VERAPAMIL

INTRODUÇÃO

O verapamil, 5-[(3,4-dimetoxifenetil) metilamino]- 2- (3,4-dimetoxifenil)-2- isopropilvaleronitrila, é um bloqueador dos canais lentos de cálcio (Fleckenstein, 1977) amplamente usado como agente antiarrítmico para controle das taquiarritmias supraventriculares (Krikler e Spurrel, 1974; Singh e col., 1980). Devido aos seus potentes efeitos vasodilatador e inotrópico negativo, é também usado no tratamento da hipertensão e doença cardíaca isquêmica (Anavekar e col., 1981; Gould e col., 1982).

O verapamil existe como mistura racêmica das formas enantioméricas *L* e *D*, das quais a forma *L* é dez vezes mais potente que o isômero *D* (Raschack, 1976).

Quando administrado por via oral (como cloridrato), é quase completamente absorvido a partir do trato gastrointestinal (aproximadamente 90%; Schomerus e col., 1976), mas apenas 20% da dose alcança a circulação sistêmica (na qual se encontra 90% ligado às proteínas plasmáticas; Mc Gowan e col., 1983) devido ao rápido metabolismo de primeira passagem (Schomerus e col., 1976; Mc Allister e Kirsten, 1982). Quando são administradas formulações de liberação prolongada, consideráveis variações interindividuais são observadas nas concentrações plasmáticas (Woodcock e col., 1980).

A N- e O-desalquilação dá origem a, aproximadamente, doze metabólitos, dos quais o N-desmetilverapamil (norverapamil) é o único que aparece no plasma em concentrações maiores que traços (Neugebauer, 1978). Os metabólitos são excretados na urina (70%) e fezes (15%), e menos de 5% do verapamil é excretado *in-natura* durante um período de 48 h após uma dose (Schomerus e col., 1976; Eichelbaum e col., 1979).

Vários trabalhos têm mostrado que as concentrações plasmáticas de verapamil correlacionam-se fortemente com as variações nos intervalos P-R do ECG em humanos (Eichelbaum e col., 1980; Somogyi e col., 1981), assim como com as variações no fluxo coronariano observado em cães anestesiados (Neugebauer, 1978), motivos pelos quais, as

concentrações plasmáticas de verapamil são de relevância clínica para o ajuste de dose.

Neste capítulo comparam-se as biodisponibilidades de duas preparações de verapamil de liberação prolongada (uma formulação teste não comercial contra outra formulação comercial tomada como referência) em voluntários adultos, utilizando um método de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção por fluorescência para medir as concentrações de verapamil nas amostras plasmáticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos voluntários

Participaram do estudo quatorze voluntários sadios do sexo masculino, com idade entre 21 e 45 anos (média = 27 ± 6), peso entre 55 e 95 Kg (média = 79 ± 13) e dentro do 15% do peso corporal ideal. Todos os voluntários assinaram um termo de consentimento esclarecido (vide APÊNDICE), e tendo o Protocolo Clínico sido aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da UNICAMP (vide APÊNDICE).

A higidez dos voluntários foi avaliada segundo descrito no capítulo II, sendo que os voluntários foram submetidos a exame electrocardiográfico antes da administração de cada comprimido.

Protocolo clínico

O estudo foi realizado de acordo com um delineamento cruzado aleatório de dois períodos (vide sequência de administração no APÊNDICE), com sete dias de intervalo ("washout") entre as doses.

Durante cada período, os voluntários foram hospitalizados às 23:00 h havendo já recebido uma refeição padrão, e depois de uma noite de jejum receberam, às 8:00 h, uma dose única de verapamil 240 mg (comprimido) [Geangin retard 240 mg (Gca; formulação teste), ou Dilacoron 240 mg retard (Dil; formulação de referência)] com 200 ml de água. Três horas após a administração, receberam 200 ml de água, mas abstiveram-se de alimento nas 4 h seguintes à administração do fármaco, quando receberam uma refeição padrão. Um jantar padrão foi

servido 10 h após a dose. Não foram permitidos outros alimentos durante o período de internação.

Alimentos líquidos foram permitidos *ad libitum* após o jantar, mas bebidas contendo xantinas (incluindo chá, café, coca cola) foram evitadas. Ao longo das 6 primeiras horas após a ingestão do verapamil, a função cardíaca foi continuamente monitorizada por ECG.

Análise das concentrações plasmáticas de verapamil

As amostras de sangue (5 ml) foram colhidas 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 e 24 h após a administração do verapamil, através de "butterfly" heparinizado colocado em veia antecubital, e colocadas em tubos contendo EDTA.

As amostras foram centrifugadas a 2000 g durante 5 min e o plasma foi separado e mantido a -20 °C até serem processados para análise do fármaco. Todas as amostras pertencentes a um mesmo voluntário foram analisadas no mesmo dia, a fim de evitar as variações inter-ensalo. A curva padrão foi construída por adição de quantidades conhecidas de verapamil a um plasma branco.

As concentrações plasmáticas de verapamil foram medidas por HPLC com detecção por fluorescência.

A 1ml de plasma (curva de calibração e amostras de voluntários), foram adicionados 200 μ l do padrão interno (flecainida, 3 μ g/ml) e 50 μ l de NaOH 1 M. Após breve agitação por vórtex, foram agregados 3 ml de n-heptano e a extração realizada por agitação com vórtex durante 1 min. Os tubos foram depois centrifugados (2000 g durante 5 min) e a fase orgânica transferida a outra bateria de tubos secos para serem re-extraídos com 400 μ l de tampão NaH_2PO_4 0.05 M, pH 4.5 por agitação com vórtex durante 1 min. Depois de uma breve centrifugação (2000 g durante 2 min), a fase orgânica foi descartada e 200 μ l da fase aquosa foram injetados no cromatógrafo. A cromatografia foi realizada usando uma coluna de fase reversa C₈, 250 x 4.6 mm (Lichrospher 100 RP-8), tamanho médio de partícula de 5 μ m, precedida por uma pré-coluna (fase reversa C₁₈, 15 x 4.6 mm, 7 μ m. A fase móvel [tampão NaH_2PO_4 (0.05 M, pH 4.5) / acetonitrila = 55 / 45] foi bombeada a um fluxo de 1 ml/min. Os picos de verapamil e flecainida foram detectados por

fluorimetria (filtro de comprimento de onda de excitação = 214 nm; comprimento de onda de emissão = 326 nm).

As concentrações de verapamil foram calculadas segundo o método do padrão interno descrito no capítulo II.

O sistema isocrático de HPLC utilizado consistia de uma bomba (Constametric 3000) acoplada a um detetor fluorimétrico (fluoroMonitor III) e o sinal de saída era registrado num integrador computadorizado (CI4000), todos fabricados pela Milton Roy.

Análises estatística e farmacocinética

A partir das curvas individuais de concentração plasmática de verapamil em função do tempo, foram obtidos os valores de C_{max} , T_{max} e $AUC_{[0-24]}$ para cada formulação segundo a descrição feita no capítulo II.

A análise estatística para a avaliação da bioequivalência, assim como os softwares empregados, já foram detalhados no capítulo II.

Todos os valores são expressos como média aritmética $\pm$ D.P., exceto quando especificados de outra forma.

RESULTADOS

Nenhum efeito adverso foi relatado com quaisquer das formulações de verapamil. Os resultados dos exames laboratoriais realizados após o ensaio clínico permaneceram dentro da faixa dos valores de referência. Não houve alterações na monitorização por ECG durante o período observado.

A figura 5 mostra um exemplo de cromatograma obtido. Os tempos de retenção foram 10.2-10.8 min para o padrão interno, 13.0-13.6 min para o norverapamil e 14.2-14.9 min para o verapamil. O limite de sensibilidade sob as nossas condições foi de 5 ng/ml. A variação inter-ensaio (%CV) situou-se na faixa 1.7-8.7% para concentrações de verapamil variando de 5.0 até 300 ng/ml. Dez amostras de concentração baixa (10 ng/ml), média (100 ng/ml) e alta (300 ng/ml) foram analisadas durante o mesmo ensaio, e os %CV intra-ensaio obtidos variaram entre 2 e 4%. As curvas de calibração apresentaram-se lineares na faixa de concentrações 10 - 300 ng/ml, e os coeficientes de regressão obtidos

foram iguais ou maiores que 0.998, com o intercepto não significativamente diferente de zero.

A maioria dos voluntários mostraram concentrações plasmáticas de verapamil não detectáveis até 1 h após a administração, conforme ilustrado pelos dados de concentrações médias (tabela IV e figura 6) e individuais (vide APÊNDICE). A tabela V mostra os principais parâmetros farmacocinéticos para ambas formulações. Não foram observadas diferenças entre as formulações em relação aos T_{max} , existindo superposição entre as faixas de valores. As C_{max} individuais, bem como as suas razões, apresentaram uma ampla faixa de valores, resultando assim em diferenças estatisticamente não-significativas entre formulações, tanto quando analisadas como dados não-transformados bem como transformados por logaritmo (tabelas V e VI). Os dados individuais de $AUC_{[0-24]}$ apresentaram também uma grande dispersão, mas as razões individuais entre as duas formulações (quando analisadas após transformação por logaritmo) foram suficientemente grandes para mostrarem diferenças significativas quando analisadas tanto por testes paramétricos como não-paramétricos (tabela VI). O efeito do período não foi significativo, segundo o resultado do ANOVA.

DISCUSSÃO

A extração do verapamil do plasma por solventes orgânicos a pH alcalino tem sido relatada em várias publicações (Harapat e Kates, 1979; Cole e col., 1981; Plotrovskii e col., 1983; Kacprowicz e col., 1985; Kapur e col., 1985; Chu e Wainer, 1989). Em algumas delas, relata-se a evaporação da fase orgânica e a posterior ressuspensão do resíduo com fase móvel (Chu e Wainer, 1989). Outros reportam um segundo passo de extração com uma solução aquosa ácida (Harapat e Kates, 1979; Kapur e col., 1985), e ainda um terceiro passo de extração com solvente orgânico após a alcalinização da fase aquosa (Kacprowicz e col., 1985). Cole e col. (1981) injetaram diretamente uma alíquota do primeiro extrato orgânico no circuito cromatográfico, mas este procedimento somente é possível quando a cromatografia é de fase normal. Sob as nossas condições, uma única extração com posterior evaporação do n-heptano, não rendeu um

cromatograma livre de picos interferentes aos tempos de retenção dos compostos de interesse, sendo portanto incapaz de detectar pequenos valores de concentração como aqueles que aparecem nos primeiros pontos da curva concentração-tempo.

Nos procedimentos reportados de dupla extração usam-se soluções de ácidos fortes para re-extrair o verapamil do solvente orgânico, tais como ácido sulfúrico ou fosfórico 0.1 M. Nós verificamos que estas soluções extraem não somente o verapamil, mas também substâncias interferentes menos básicas que o verapamil. Apesar do fato que estes procedimentos dão uma recuperação maior do verapamil, o segundo passo de extração com uma solução tamponada de pH 4.5 deveria deixar menos que 0.1% do verapamil na forma não-ionizada (e portanto na fase orgânica), segundo cálculos baseados em dados de pH de soluções de cloridrato de verapamil. Outra vantagem desta escolha é o fato de que tem a mesma composição da porção aquosa da fase móvel, resguardando portanto a coluna de mudanças de pH.

A detecção do verapamil por absorbância UV tem sido reportada por Rustum (1990). Este método apresenta a principal desvantagem de ser escassamente sensível quando se analisam amostras de baixa concentração, como aquelas encontradas nos primeiros momentos após a administração de uma dose única de verapamil de liberação retardada. Outro inconveniente é a necessidade de uma exaustiva purificação dos reagentes, assim como o cuidado especial na lavagem do material de vidro, utilizados na desproteção das amostras. A vantagem da fluorescência reside no bem estabelecido espectro de emissão e absorção do verapamil, e a falta de substâncias com este padrão nas amostras de plasma após a extração. Embora a maioria dos autores que utilizam este método de detecção, usam um reagente quimicamente relacionado ao verapamil como padrão interno (5-[(3,4-dimetoxifenetil) metilamino]- 2-(3,4- dimetoxifenil)-2- isopropilbutironitrila), a flecainida por nós utilizada demonstrou ser um bom substituto. Apesar do seu tempo de retenção ser mas curto do que do verapamil e norverapamil, o perigo de uma superposição com algum metabólito foi superado com uma limpeza adequada da amostra.

Os C_{max} variaram amplamente entre os voluntários, assim como os tempos de ocorrência (T_{max}), razão pela qual não foram encontradas diferenças significativas. Contudo, valores de C_{max} e T_{max} maiores foram a tendência para a formulação Gea.

Também as $AUC_{[0-24]}$ mostraram um alto grau de variabilidade, mas quando as razões individuais foram analisadas após uma transformação por logaritmo, os intervalos de confiança de 90% das médias não incluíram significativamente o intervalo 80-120%, como é condição para concluir a bioequivalência entre formulações. Esta última inferência é reforçada pelas probabilidades dadas pelo teste de t duplo monocaudal (tabela VI).

Em resumo, no presente estudo desenvolveu-se uma metodologia de HPLC suficientemente sensível, reproduzível e fácil para analisar amostras de plasma provenientes de voluntários após a ingestão de uma única dose de 240 mg de verapamil. As conclusões sobre a falta de bioequivalência entre o Dilacoron 240 mg retard e o Geangin retard 240 mg foram baseadas nos requerimentos da Food and Drug Administration (1985).

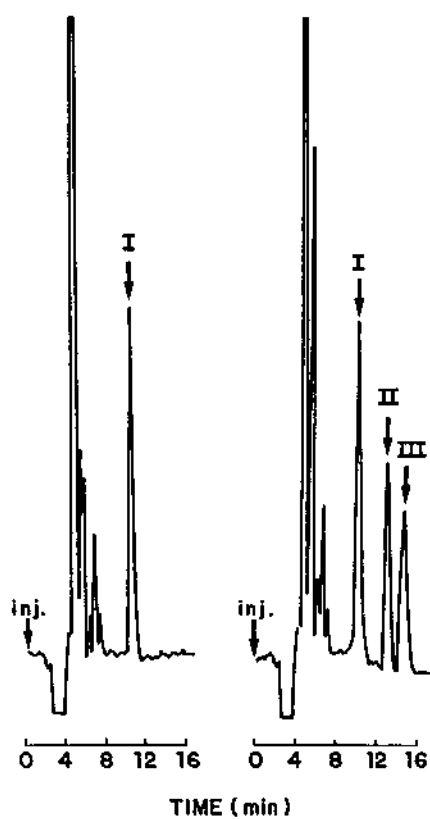


Figura 5 - Cromatogramas típicos de HPLC mostrando: (a) amostra de plasma prévio à administração do verapamil, (b) amostra de plasma após a ingestão de 240 mg de verapamil. I, Flecaínida (padrão interno); II, norverapamil; III, verapamil.

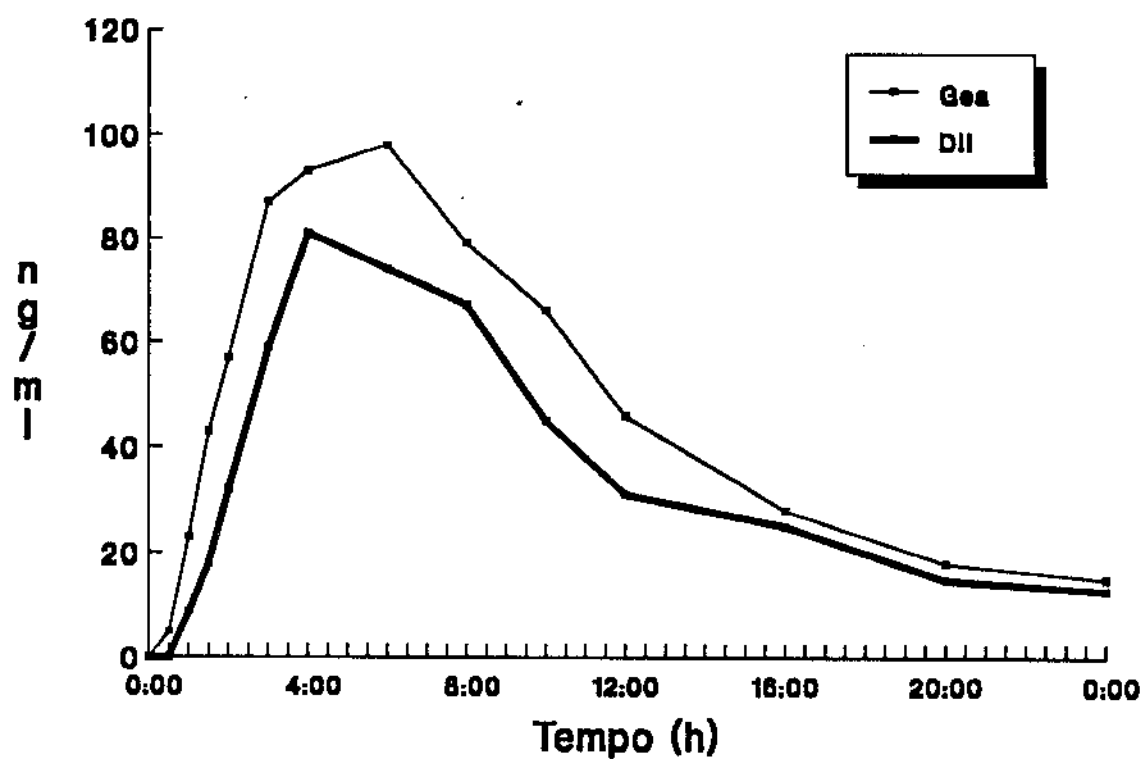


Figura 6 - Média das concentrações plasmáticas de verapamil em função do tempo para duas formulações de verapamil administradas a 14 voluntários normais

Tabela IV - Concentrações plasmáticas de verapamil [média (DP) em ng/ml] das duas formulações de liberação prolongada de verapamil (240 mg) para quatorze voluntários .

Tempo (h)	Gea	n	Dil	n
0	0 (0)	14	0 (0)	14
0.5	5 (10)	14	1 (3)	14
1	23 (31)	14	9 (10)	14
1.5	43 (56)	14	18 (21)	14
2	57 (50)	14	32 (41)	14
3	87 (80)	14	59 (59)	13
4	93 (62)	14	81 (86)	14
6	98 (86)	14	74 (58)	14
8	79 (41)	14	67 (58)	14
10	66 (37)	14	45 (30)	14
12	46 (23)	14	31 (19)	14
16	28 (15)	14	25 (23)	14
20	18 (12)	14	15 (12)	14
24	15 (10)	14	13 (12)	14

Tabela V - Principais parâmetros farmacocinéticos de duas formulações de liberação prolongada de verapamil obtidos em 14 voluntários normais sadios.

	Gca	Dil
AUC_[0-24] (ng h ml⁻¹)		
média aritmética	1142	863
média geométrica	995	696
(%CV)	634 (55.5)	596 (69.0)
C_{max} (ng / ml)		
média aritmética	126	112
média geométrica	102	86
(%CV)	94 (74.4)	87 (78.2)
T_{max} (h)		
mediana	6	4
(faixa)	(3-12)	(3-6)

Tabela VI - Análise estatística das razões individuais de $AUC_{[0-24]}$ e C_{max} para as duas formulações de liberação prolongada de verapamil.
(IC: intervalo de confiança; np: não paramétrico)

Razões Gca/Dil	$AUC_{[0-24]}$	C_{max}
Média aritmética	1.324	1.130
IC 90% (Westlake, 1976)	0.459-1.541	0.564-1.436
IC 90% (Mandallaz e Mau, 1981)	1.033-1.726	0.787-1.651
Teste de t duplo monocaudal		
$P\{0.8 < r < 1.2\}$	0.226	0.550
$P\{r < 0.8\}$	0.003	0.074
$P\{r > 1.2\}$	0.771	0.375
$P\{0.75 < r < 1.25\}$	0.326	0.656
$P\{r < 0.75\}$	0.002	0.050
$P\{r > 1.25\}$	0.672	0.293
Média geométrica	1.430	1.186
IC 90% (Westlake, 1976)	0.226-1.774	0.435-1.565
IC 90% (clássico)	1.077-1.898	0.824-1.706
Teste de t duplo monocaudal		
$P\{0.8 < r < 1.2\}$	0.145	0.484
$P\{r < 0.8\}$	0.002	0.040
$P\{r > 1.2\}$	0.853	0.477
$P\{0.75 < r < 1.25\}$	0.207	0.577
$P\{r < 0.75\}$	0.001	0.022
$P\{r > 1.25\}$	0.792	0.400
IC 90% (np) (Steinijans e Diletti, 1985)	1.060-1.675	0.797-1.685

CAPITULO IV:
DISCUSSÃO GERAL

Segundo a Food and Drug Administration (1985), **biodisponibilidade** é a velocidade e quantidade à qual o ingrediente ativo de uma droga ou espécie terapêutica é absorvido a partir de um produto farmacêutico para ser disponível no sítio de ação da droga. A biodisponibilidade usualmente é determinada por medida: 1) da concentração do ingrediente ativo da droga, ou espécie terapêutica, ou do(s) seu(s) metabólito(s), em fluidos biológicos, como uma função do tempo; 2) da excreção urinária da espécie terapêutica ou do(s) seu(s) metabólito(s), como uma função do tempo, ou 3) de um efeito farmacológico agudo apropriado. A aproximação mais sensível, exata e reproduzível para determinar a biodisponibilidade de um produto é o teste *in vivo* em humanos, por medida da concentração do ingrediente ativo da droga ou espécie terapêutica ou do(s) seu(s) metabólito(s), em sangue total, plasma, soro, ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo. Esta aproximação é particularmente aplicável a aquelas formas que fornecem o ingrediente ativo da droga ou espécie terapêutica à corrente sanguínea para distribuição sistêmica dentro do corpo, como por exemplo, drogas injetáveis, a maioria das formas orais, a maioria dos supositórios, certas drogas administradas por inalação, e algumas drogas administradas por aplicação local nas membranas mucosas.

Equivalentes farmacêuticos são produtos que contêm quantidades idênticas do mesmo ingrediente ativo da droga, por exemplo o mesmo sal ou éster da mesma espécie terapêutica, em idênticas formas farmacêuticas, mas não necessariamente contendo os mesmos ingredientes inativos, e que apresentam a mesma qualidade, pureza, potência, uniformidade de conteúdo e velocidade de desintegração e/ou dissolução.

Produtos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos cuja velocidade e grau de absorção não mostram diferenças significativas quando são administrados na mesma dose molar da espécie terapêutica sob condições experimentais similares, seja como dose única ou múltipla.

Se o objetivo final é decidir se duas formulações são absorvidas de maneira similar quando administradas em humanos, *a priori* poderia-se esperar que os dados de desintegração e dissolução observados *in vitro* estejam correlacionados com a absorção que ocorre *in vivo*. Isto seria ótimo se levássemos em consideração o risco não desprezível e custo econômico que envolve todo estudo clínico de bioequivalência. Nesse contexto, vários trabalhos tem sido publicados (Langenbucher, 1982a, 1982b; Langenbucher e Moller, 1983a, 1983b), mas a complexidade dos algoritmos e o excesso de suposições feitas em relação ao ideal do modelo biológico suposto, fazem destas proposições teoremas de matemática aplicada de reduzida aplicabilidade farmacológica.

Por outro lado, a grande variabilidade individual na resposta à uma dada droga (exposta no capítulo I), é acompanhada de uma grande variabilidade individual no comportamento farmacocinético. Portanto dificulta-se a decisão sobre a bioequivalência de diferentes formulações, apesar do extremo cuidado nas condições experimentais.

A FDA (1985) admite uma diferença de até 25% nas biodisponibilidades de "batches" diferentes de um mesmo produto, para serem considerados bioequivalentes. Ou seja, que o mesmo critério teria aplicação sobre produtos equivalentes de diferentes marcas.

A biodisponibilidade comparativa entre duas formulações administradas como doses únicas, a partir de dados de concentrações sanguíneas, deve ser determinada a partir dos valores de concentração máxima atingida pela espécie farmacologicamente ativa, e a área sob a curva. Em estudos que comparam formulações orais, os tempos de coleta de amostras devem ser idênticos.

Estes requerimentos da FDA foram seguidos, assim como outros referentes a voluntários, que incluem higiene e administração dos fármacos em jejum, e ao delineamento do protocolo clínico.

Mas apesar de levar em consideração e cuidar de todos os detalhes já enunciados, a variabilidade inter-indivíduos, e também aquela variabilidade biológica não controlável de cada indivíduo fazem que até hoje discuta-se e proponha-se testes estatísticos quase exclusivos para análise dos dados deste tipo de estudos.

Basicamente, os testes estatísticos aplicados dividem-se em dois grupos: os paramétricos (levam em consideração algum tipo de distribuição populacional), e os não-paramétricos (independentes do tipo de distribuição).

O objetivo de todos esses métodos é o mesmo: obtida uma razão (formulação teste / formulação de referência) para C_{max} e/ou AUC, expressa como um valor médio (transformado por logaritmo ou não) contido num intervalo de confiança de probabilidade variável (90 ou 95%), analisar a inclusão ou superposição deste com intervalos do tipo 0.80-1.20 ou 0.75-1.25. Contudo, é muito arriscado decidir sobre a bioequivalência a partir dos dados de C_{max} obtidos, já que o C_{max} verdadeiro pode aparecer no intervalo de tempo compreendido entre duas coletas. Isto justifica a transformação por logaritmo desta variável previamente ao tratamento estatístico (Steinijans, 1990). Este autor propõe a extensão desta transformação a todas as variáveis farmacocinéticas, com exceção de T_{max} .

Westlake (1976) assume a posição de tomar como hipótese nula a existência de bioequivalência entre as formulações, pelo qual os intervalos de confiança para as razões são simétricas e centradas no valor 1.0. Esta metodologia resulta de difícil aplicação nos casos de bioinequivalência entre as formulações e com grande variabilidade entre os indivíduos, já que os intervalos resultantes são grandes e, portanto, a superposição existente com o intervalo 0.8-1.2 leva a confusão.

A obtenção de intervalos de confiança centrados na média das razões (método clássico, assumindo uma distribuição t de Student) é, ao nosso entender, o método estatístico de escolha, já que os intervalos assim obtidos são de amplitude menor, com a consequente facilidade na interpretação dos resultados.

Mandallaz e Mau (1981) e Fluehler e col. (1983) propõem os métodos bayesianos para a obtenção de probabilidades para qualquer intervalo dado (probabilidades posteriores) baseados nos dados experimentais em vez de intervalos de confiança para as médias. As decisões tomadas segundo esta metodologia deveriam ser, ao nosso entender, complementadas e/ou confirmadas com outros testes já enunciados, já que, devido à grande variabilidade, é muito difícil obter

por este método intervalos com probabilidade de 95% que sejam medianamente estreitos.

Outra aproximação, é aquela da consideração de biodisponibilidades individuais (Anderson e Hauck, 1990), baseado na proporção de indivíduos com razões de AUC e/ou C_{max} compreendidas no intervalo 0.75-1.25, considerando as formulações como bioequivalentes se esta proporção é igual ou maior que 75% dos indivíduos (regra do 75/75 da FDA, 1988). Neste caso o grau de dispersão dos valores é o determinante do número de indivíduos participantes do protocolo clínico. Nós temos observado uma concordância deste método com os já expostos num estudo de biodisponibilidade comparativa de diazepam levado a cabo em quatorze voluntários, onde a dispersão das razões foi muito baixa. Mas não foi possível chegar a uma conclusão num estudo de bioequivalência de lincomicina onde as razões teste/referência (tanto para C_{max} quanto para AUC) variaram entre 0.3 e 3.0. Neste caso, o número de indivíduos ascenderia a mais de 300 para chegar a uma conclusão definitiva; número inviável economicamente para as indústrias interessadas.

Em muitas ocasiões, distribuições multimodais são observadas nas biodisponibilidades comparativas de diferentes formulações. Steinijans e Diletti (1985), têm proposto um método de análise dos resultados independente do tipo de distribuição, baseado no teste de Wilcoxon ("signed-ranks"). Este teste também proporciona um intervalo de confiança para as razões observadas, e é ao nosso parecer um teste apropriado para confirmar os dados obtidos por algum dos testes enunciados anteriormente.

Em conclusão, o fato da particularidade destes estudos, obriga a uma incessante procura e desenvolvimento de novos testes que sejam capazes de definir a presença ou ausência de biodisponibilidade na hora do veredito. Uma maior interrelação entre farmacêuticos, farmacologistas e estatísticos é a base para uma definição conclusiva. A indústria farmacêutica e os organismos reguladores internacionais não podem ficar alheios a esta problemática.

SUMMARY

Differences in manufacture processing and raw materials among formulations of a given drug account for some of the main causes of variability in individual response to a drug. The assessment of bioequivalence between different pharmaceutical formulations and/or preparations of a given drug is of critical importance for the proper adjustment of dosing regimes.

In this work, two studies of compared bioavailability in normal healthy male volunteers are presented. The first concerns four metronidazol formulations at different dosages, and the second two slow-release formulations of verapamil.

Plasma drug concentrations were analyzed by HPLC (with detection by UV absorbance in the case of metronidazol and by fluorescence emission for verapamil).

Pharmacokinetic data were obtained, and the statistical analysis performed by applying different methods.

The results show bioequivalence between metronidazole formulations with the same drug content, and lack of bioequivalence among those formulations containing different amounts of the drug. The two verapamil formulations were found to be non-bioequivalent. These conclusions were based on the Food and Drug Administration criteria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOVICS J (1984). Rapid determination of metronidazole in human serum and urine using a normal-phase high-performance liquid chromatographic column with aqueous solvents. *Journal of Chromatography*, **309**: 436-440.

ALMON RR, ANDREW CG E APPEL SH (1974). Serum globulin in myasthenia gravis: inhibition of a α -bungarotoxin binding to acetylcholine receptors. *Science*, **186**: 55-57.

ANAVEKAR SN, CHRISTOPHIDIS N, LOUIS WJ E DOYLE AM (1981). Verapamil in the treatment of hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **3**: 287-292.

ANDERSON KE (1981). Pharmacokinetics of nitroimidazoles. Spectrum of adverse reactions. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Suppl 26*: 60-67.

ANDERSON S E HAUCK WW (1990). Consideration of individual bioequivalence. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **18**: 259-273.

BLASCHKE TF (1977). Protein binding and kinetics of drugs in liver disease. *Clinical Pharmacokinetics*, **2**: 32-44.

BLEICHER PA, CHARLES JH, E SOBER AJ (1987). Topical metronidazole therapy for rosacea. *Archives of Dermatology*, **123**: 609-614.

BROGDEN RN, HEEL RC E SPEIGHT TM (1978). Metronidazole in anaerobic infections: a review of its activity, pharmacokinetics and therapeutic use. *Drugs*, **16**: 387-417.

CHU YQ E WAINER IW (1989). Determination of the enantiomers of verapamil and norverapamil in serum using coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **497**: 191-200.

COCHRAN WG E COX GM (1957). Incomplete latin squares. Em *Experimental designs*. 2a Edição. Editado por John Wiley & Sons Inc.

COLE SCJ, FLANAGAN RJ, JOHNSTON A E HOLT DW (1981). Rapid high-performance chromatography method for the measurement of verapamil and norverapamil in blood plasma or serum. *Journal of Chromatography*, **218**: 621-629.

CRAMMER JL, ROSSER RM E CRANCE G (1974). Blood levels and management of lithium levels. *British Medical Journal*, **3**: 650-654.

EICHELBAUM M, BIRKEL P, GRUBE E, GUTGEMANN U E SOMOGYI A (1980). Effects of verapamil on P-R intervals in relation to verapamil plasma levels following single i.v. and oral administration and during chronic treatment. *Klinische Wochenschrift*, **58**: 919-925.

EICHELBAUM M, ENDE M, REMBERG G, SCHOMERUS M E DENGLE HJ (1979). The metabolism of d,l-¹⁴C-verapamil in man. *Drug metabolism and disposition*, **7**: 145-148.

ELLIS EF, KOYSOOKO R E LEVY G (1976). Pharmacokinetics of theophylline in children with asthma. *Pediatrics*, **58**: 542-547.

EVANS RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**: 889-895.

FAGIOLINO P (1990). Monitorización de fármacos en saliva: ventajas e inconvenientes. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, **9**: 3-13.

FLECKENSTEIN A (1977). Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **17**: 149-166.

FLUEHLER H, GRIEVE AP, MANDALLAZ D, MAU J E MOSER HA (1983). Bayesian approach to bioequivalence assessment: an example. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **72**: 1178-1181.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (4-1-1985 EDITION). Federal Register, **part 320**: Bioavailability and Bioequivalence Requirements, 154-173.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (1988). Report By the Bioequivalence Task Force on recommendations from the bioequivalence hearing conducted by the Food and Drug Administration September 29 - October 1, 1986.

GAMBORG NIELSEN P (1988). Metronidazole treatment of rosacea. *International Journal of Dermatology*, **27**: 1-5.

GATTAVECCHIA E., TONELLI D. E BRECCIA A (1981). Determination of metronidazole, misonidazole and its metabolites in serum and urine on RP-18 high-performance thin-layer chromatographic plates. *Journal of Chromatography*, **224**: 465-471.

GNARPE H, BELSHEIM J E PERSSON S (1981). Influence of nitroimidazole derivatives on leukocyte migration. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **Suppl 26**: 68-71.

GOTHINI G, PENTILCAINEN P, VAPAATALO HI, HACKMAN R E BJORKSTE KA (1972). Absorption of antibiotics: influence of metoclopramide and atropine on serum levels of pivampicillin and tetracycline. *Annals of Clinical Research*, **4**: 228-232.

GOULD BA, MANN S, KIESO H, BALA SUBRAMANIAN V E RAFFERTY EB (1982). The 24-hour ambulatory blood pressure profile with verapamil. *Circulation*, **65**: 22-27.

GROVE DI, MAHMOUD AA E WARREN KS (1977). Suppression of cell-mediated immunity by metronidazole. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, **54**: 422-427.

HALLER I (1982). In vitro activity of the two principal oxidative metabolites of metronidazole against *Bacterioides fragilis* and related species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapeutics*, **22**: 165-166.

HARAPAT SR E KATES RE (1979). Rapid high-pressure liquid chromatographic analysis of verapamil in blood and plasma. *Journal of Chromatography*, **170**: 385-390.

JENSEN JC E GUGLER R (1983). Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of metronidazole and metabolites. *Journal of Chromatography*, **277**: 381-384.

JUSKO WJ (1984). Smoking effects in pharmacokinetics. Em Pharmacokinetic basis for drug treatment (1a edição), editado por LZ Benet, N Massoud e JG Gambertoglio. Raven Press, New York.

KACPROWICZ AT, FULLINFAW RO E BURY RW (1985). High-performance liquid chromatography measurement of verapamil in plasma using a diol column. *Journal of Chromatography*, **337**: 412-415.

KAPUR PA, LAW T E WATSON E (1985). Simultaneous quantitation of verapamil, norverapamil, and N-dealkylated metabolites in human plasma following oral administration. *Journal of Chromatography*, **337**: 160-165.

KRIKLER DM E SPURRELL RAJ (1974). Verapamil in the treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia. *Postgraduate Medical Journal*, **50**: 447-453.

LANBECK K E LINDSTROM B (1979). Determination of metronidazole and tinidazole in plasma and feces by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **162**: 117-121.

LANGENBUCHER F (1982A). Numerical convolution/deconvolution as a tool for correlating *in vitro* with *in vivo* drug availability. *Die Pharmazeutische Industrie*, **44**: 1166-1171.

LANGENBUCHER F (1982B). Improved understanding of convolution algorithms correlating body response with drug input. *Die Pharmazeutische Industrie*, **44**: 1275-1278.

LANGENBUCHER F E MÖLLER H (1983A). Correlation of *in vitro* drug release with *in vivo* response kinetics. Part I: mathematical treatment of time functions. *Die Pharmazeutische Industrie*, **45**: 623-628.

LANGENBUCHER F E MÖLLER H (1983B). Correlation of *in vitro* drug release with *in vivo* response kinetics. Part II: use of function parameters. *Die Pharmazeutische Industrie*, **45**: 629-633.

LOFT S, OTTON SV, LENNARD MS, TUCKER GT E POULSEN HE (1991). Characterization of metronidazole metabolism by human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, **41**: 1127-1134.

MANDALLAZ D E MAU J (1981). Comparison of different methods for decision-making in bioequivalence assessment. *Biometrics*, **37**: 213-222.

MC ALLISTER RG E KIRSTEN EB (1982). The pharmacology of verapamil IV. Kinetic and dynamic effects after single intravenous and oral doses. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **38**: 71-76.

MC GOWAN FX, REITER MJ, PRITCHET ELC E SHAND DG (1983). Verapamil plasma binding: relationship to α_1 -acid glycoprotein and drug efficacy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **33**: 485-490.

MIDHA KK, MCGILVERAY IJ E COOPER JK (1973). Determination of therapeutic levels of metronidazole in plasma by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **87**: 491-497.

MORRIS JGL, PARSONS RL, TROUNCE JR E GROVES MJ (1976). Plasma dopa concentrations after different preparations of levodopa in normal subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **3**: 983-990.

MULLER M E LINDMARK DG (1976). Uptake of metronidazole and its effect on viability in *Trichomonas* and *Entamoeba invadens* under anaerobic and aerobic conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapeutics*, **9**: 696-700.

NEUGEBAUER G (1978). Comparative cardiovascular action of verapamil and its major metabolites in the anesthetized dog. *Cardiovascular Research*, **12**: 247-254.

NIMMO J, HEADING RC, TOTHILL P E PRESCOTT LF (1973). Pharmacological modifications of gastric emptying: effects of propanthelin and metoclopramide on paracetamol absorption. *British Medical Journal*, **1**: 587-589.

POTTAGE A, NIMMO J E PRESCOTT LF (1974). The absorption of aspirin and paracetamol in patients with achlorhydria. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **26**: 144-145.

PIOTROVSKII VK, RUMIANSTEV DO E METELITSA VI (1983). Ion exchange high-performance liquid chromatography in drug assay in biological fluids. II Verapamil. *Journal of Chromatography*, **275**: 195-200.

RALPH ED, CLARKE JT, LIBKE LD, LUTHY RP E KIRBY WMM (1974). Pharmacokinetics of metronidazole as determined by bioassay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapeutics*, **6**: 691-696.

RALPH ED (1983). Clinical pharmacokinetics of metronidazole. *Clinical Pharmacokinetics*, **8**: 43-62.

RASCHACK M (1976). Relationship of antiarrhythmic to inotropic activity and antiarrhythmic qualities of the optical isomers of verapamil. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, **294**: 285-291.

RONA K E GACHALYI B (1987). Simple liquid chromatographic method for the determination of ornidazole and metronidazole in human serum. *Journal of Chromatography*, **420**: 228-230.

ROUX AF, MOIROT E, DELHOTAL B, LEROY JA, BONMARCHE GP, HUMBERT G E FLOUVAT B (1984). Metronidazole kinetics in patients with acute renal failure on dialysis: a cumulative study. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **36**: 363-368.

RUSTUM AM (1990). Measurement of verapamil in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a short octyl column. *Journal of Chromatography*, **528**: 480-486.

SCHMUCKER DL (1985). Aging and drug disposition: an update. *Pharmacological reviews*, **32**: 133-148.

SCHOMERUS M, SPIEGELHALDER B, STIEREN B E EICHELBAUM M (1976). Physiologic disposition of verapamil in man. *Cardiovascular Research*, **10**: 605-612.

SHANK WA JR E AMERSON AB (1981). Metronidazole: an update of its expanding role in clinical medicine. *Hospital Formulations*, **16**: 283-297.

SINGH BN, COLLET JT E CHEW CYC (1980). New perspectives in the pharmacologic therapy of cardiac arrhythmias. *Progress in cardiovascular disease*, **42**: 243-301.

SJOHOLM I, KOBER A, ODAR-CEDERLOF I E BORGA O (1976). Protein binding of drugs in uremic and normal serum: the role of endogenous inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, **25**: 1205-1213.

SOMOGYI A, ALBRECHT M, KLIEMS G, SCHAFFER K E EICHELBAUM M (1981). Pharmacokinetics, bioavailability and ECG response of verapamil in patients with liver cirrhosis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **12**: 51-60.

STEINIJANS VW (1990). Pharmacokinetic characterization of controlled-release formulations. *European Journal of Drug metabolism and Pharmacokinetics*, **15**: 173-181.

STEINIJANS VW E DILETTI E (1985). Generalization of distribution-free confidence intervals for bioavailability ratios. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **28**: 85-88.

TANGA MR, ANTANI JA E KABADE SS (1975). Clinical evaluation of metronidazole as an anti-inflammatory agent. *International Surgery*, **60**: 75-76.

TURNER P, RICHENS A E ROUTLEDGE P (1986). Factors influencing the action of drugs. Em *Clinical Pharmacology* (5a edição), editado por P Turner. Churchill Livingstone, Londres.

WESTLAKE WJ (1976). Symmetrical confidence intervals for bioequivalence trials. *Biometrics*, **32**: 741-744.

WOODCOCK BG, HOPF R E KALTENBACH M (1980). Verapamil and norverapamil plasma concentrations during long-term therapy in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **2**: 17-23.

APÊNDICE

Regra dos trapézios

Este método é usado para o cálculo da área sob curvas traçadas ponto a ponto. Está baseado na divisão da área em porções obtidas traçando linhas verticais dos pontos experimentais até o eixo X. Desta forma cada porção delimitada é um trapézio, cuja área é calculada como segue:

$$A_{(i)} = [Y_{(i)} + Y_{(i+1)}] \times [X_{(i+1)} - X_{(i)}] / 2 \quad \text{onde:}$$

$A_{(i)}$: área da porção i ($1 \leq i \leq n-1$) [$n = N^o$ de pontos]

(Assim, a curva fica dividida em $n-1$ porções)

$Y_{(i)}, Y_{(i+1)}$: valores da ordenada correspondentes aos valores $X_{(i)}$ e $X_{(i+1)}$ respectivamente.

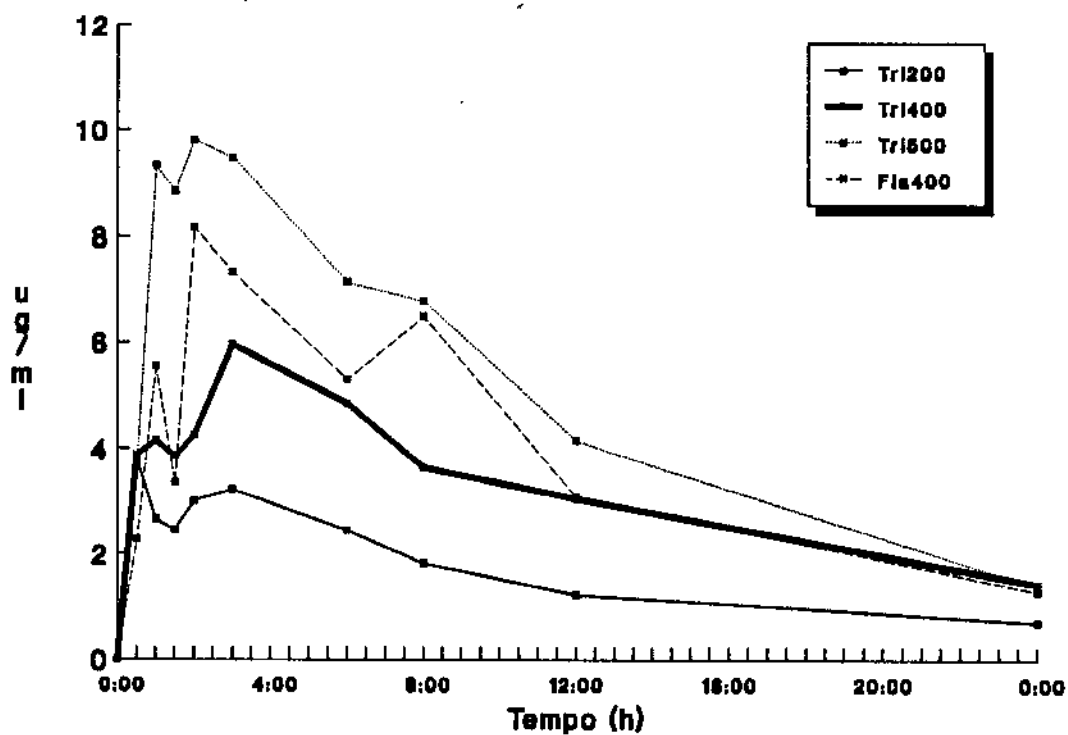
A área sob a curva total é obtida aplicando a somatória sobre todos os valores $A_{(i)}$, desde $A_{(1)}$ até $A_{(n-1)}$.

Sequência de administração de 4 formulações de metronidazol em 14 voluntários normais. Tabela de randomização elaborada através de quadrados latinos (Cochran e Cox, 1957).

Voluntário Nº	Período I	Período II	Período III	Período IV
I	Tri500	Fla400	Tri200	Tri400
II	Fla400	Tri200	Tri500	Tri400
III	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
IV	Tri400	Tri500	Tri200	Fla400
V	Tri400	Tri200	Fla400	Tri500
VI	Tri200	Fla400	Tri400	Tri500
VII	Tri500	Tri400	Fla400	Tri200
VIII	Tri400	Tri200	Fla400	Tri500
IX	Tri400	Tri500	Tri200	Fla400
X	Fla400	Tri500	Tri400	Tri200
XI	Fla400	Tri200	Tri500	Tri400
XII	Tri500	Fla400	Tri200	Tri400
XIII	Tri500	Tri400	Fla400	Tri200
XIV	Tri200	Fla400	Tri400	Tri500

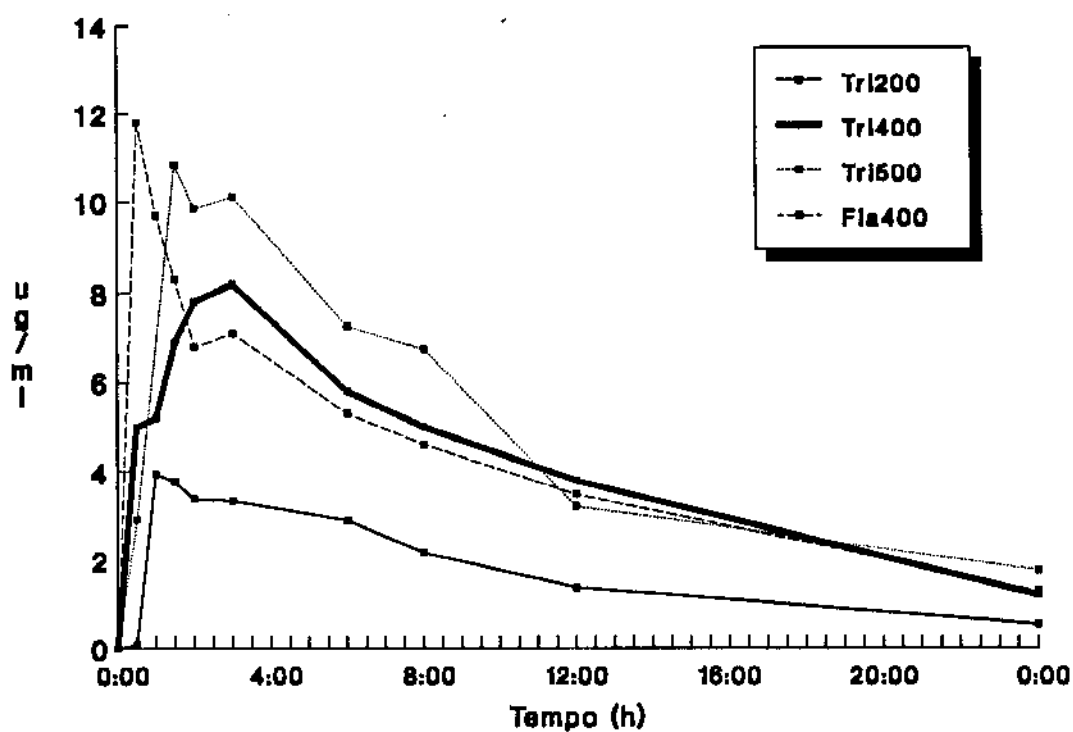
Sequência de administração de 2 formulações de verapamil em 14 voluntários normais. Tabela de randomização elaborada através de quadrados latinos (Cochran e Cox, 1957).

Voluntário Nº	Periodo I	Periodo II
I	<i>Gea</i>	<i>Dil</i>
II	<i>Dil</i>	<i>Gea</i>
III	<i>Dil</i>	<i>Gea</i>
IV	<i>Gea</i>	<i>Dil</i>
V	<i>Gea</i>	<i>Dil</i>
VI	<i>Gea</i>	<i>Dil</i>
VII	<i>Dil</i>	<i>Gea</i>
VIII	<i>Gea</i>	<i>Dil</i>
IX	<i>Dil</i>	<i>Gea</i>
X	<i>Gea</i>	<i>Dil</i>
XI	<i>Gea</i>	<i>Dil</i>
XII	<i>Dil</i>	<i>Gea</i>
XIII	<i>Dil</i>	<i>Gea</i>
XIV	<i>Dil</i>	<i>Gea</i>

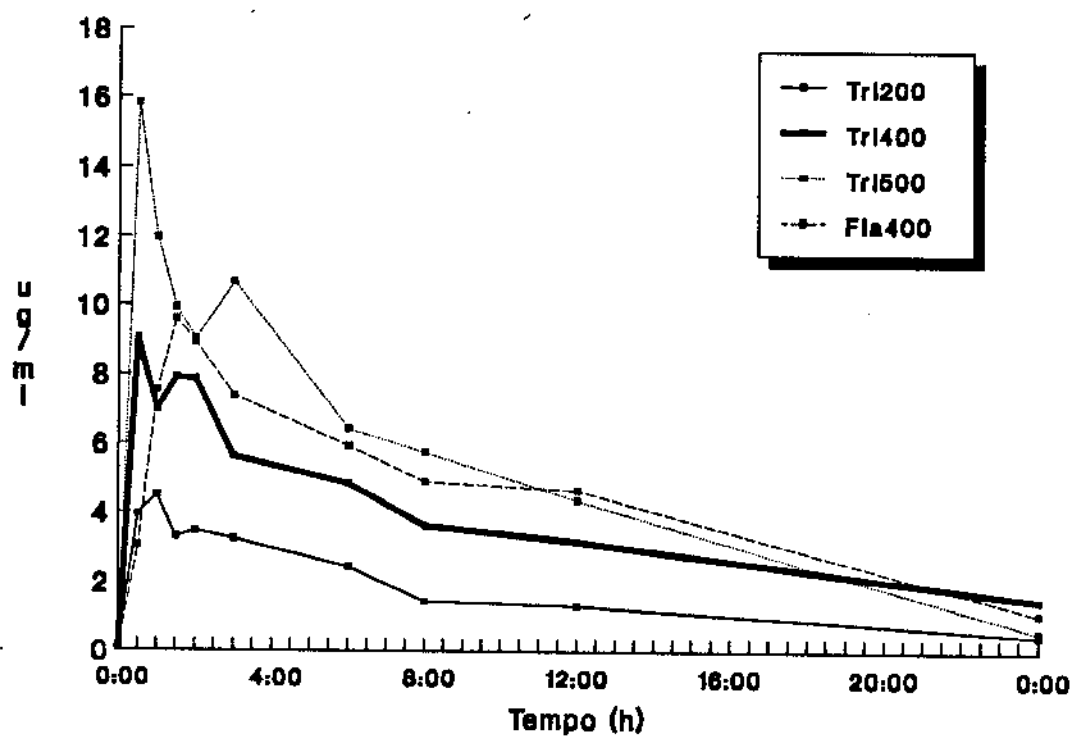


	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{h}$)	37.65	76.68	117.48	91.95
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3.8	6.0	9.8	8.2
T _{max} (h)	0.5	3	2	2

Vol. II - W.F.M.

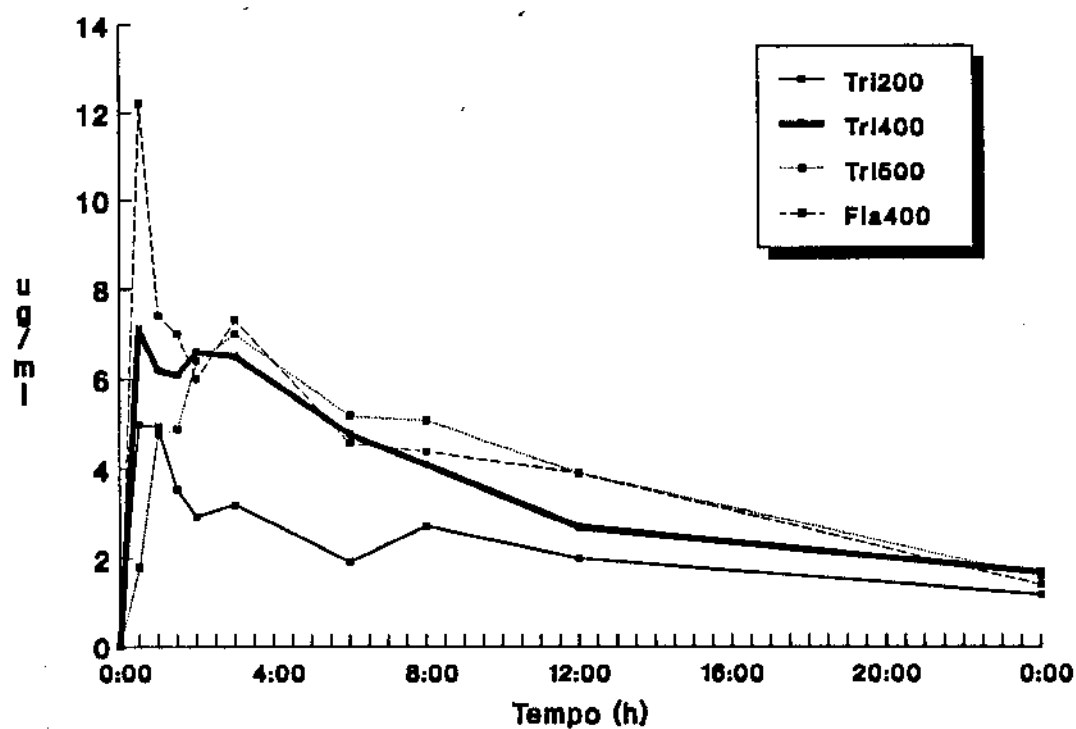


	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{ h}$)	41.10	97.90	112.65	97.05
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3.9	8.2	10.8	11.8
T _{max} (h)	1	3	1.5	0.5

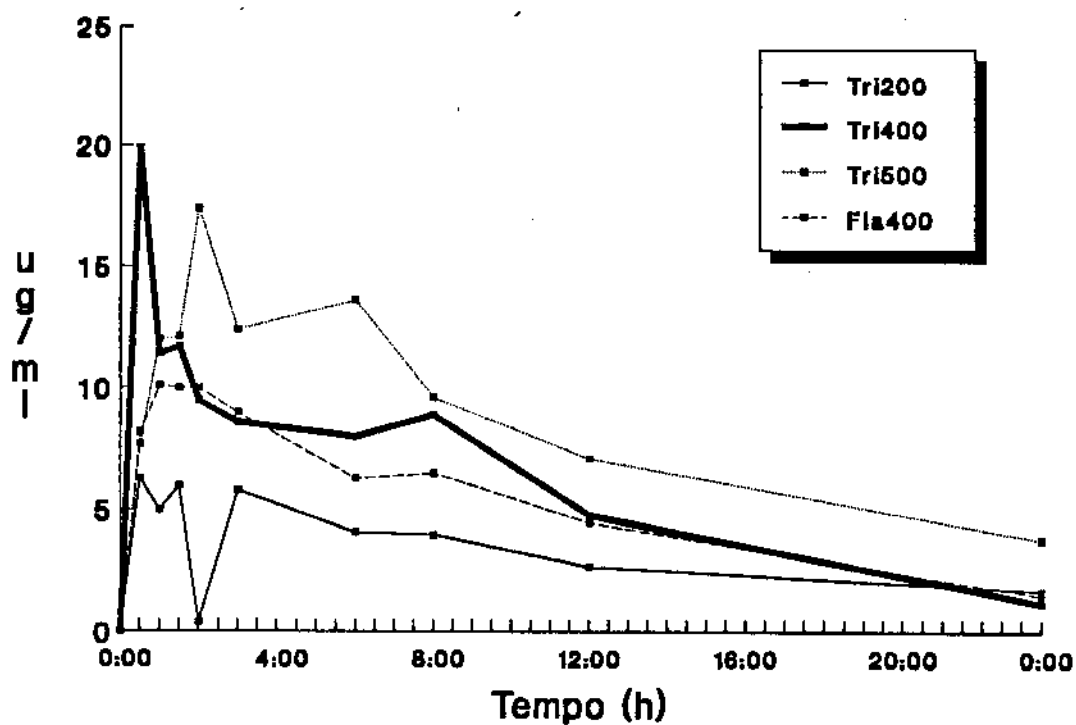


	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{h}$)	38.72	86.47	119.20	105.28
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	4.5	9.0	15.8	9.6
T _{max} (h)	1	0.5	0.5	1.5

Vol. IV - F.L.G.

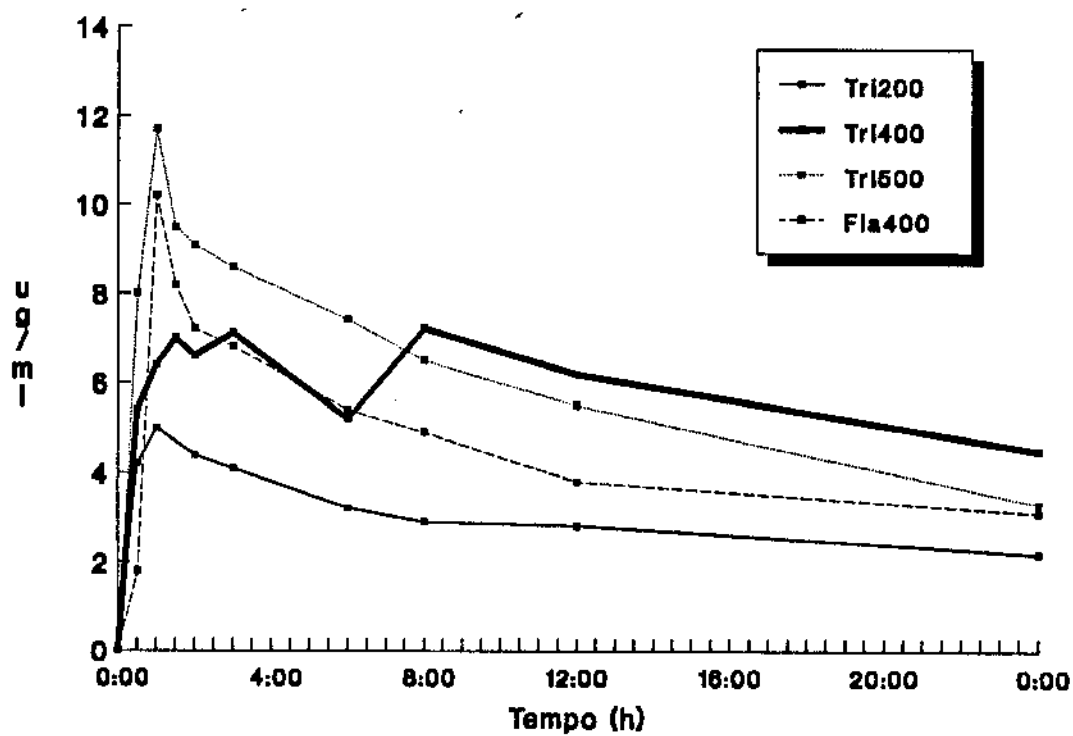


	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{h}$)	51.37	83.75	93.64	96.70
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	5.0	7.1	7.0	12.2
T _{max} (h)	0.5	0.5	3	0.5

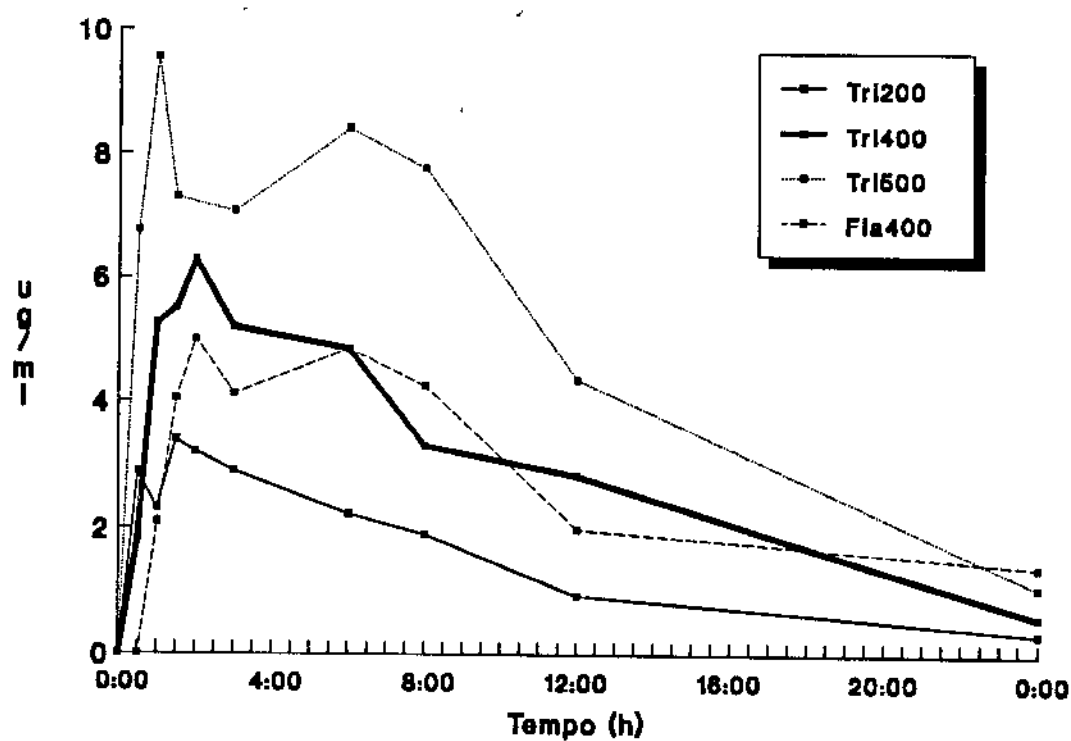


	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{ h}$)	78.35	138.12	196.15	120.2
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	6.3	19.9	17.4	10.1
T _{max} (h)	0.5	0.5	2	1

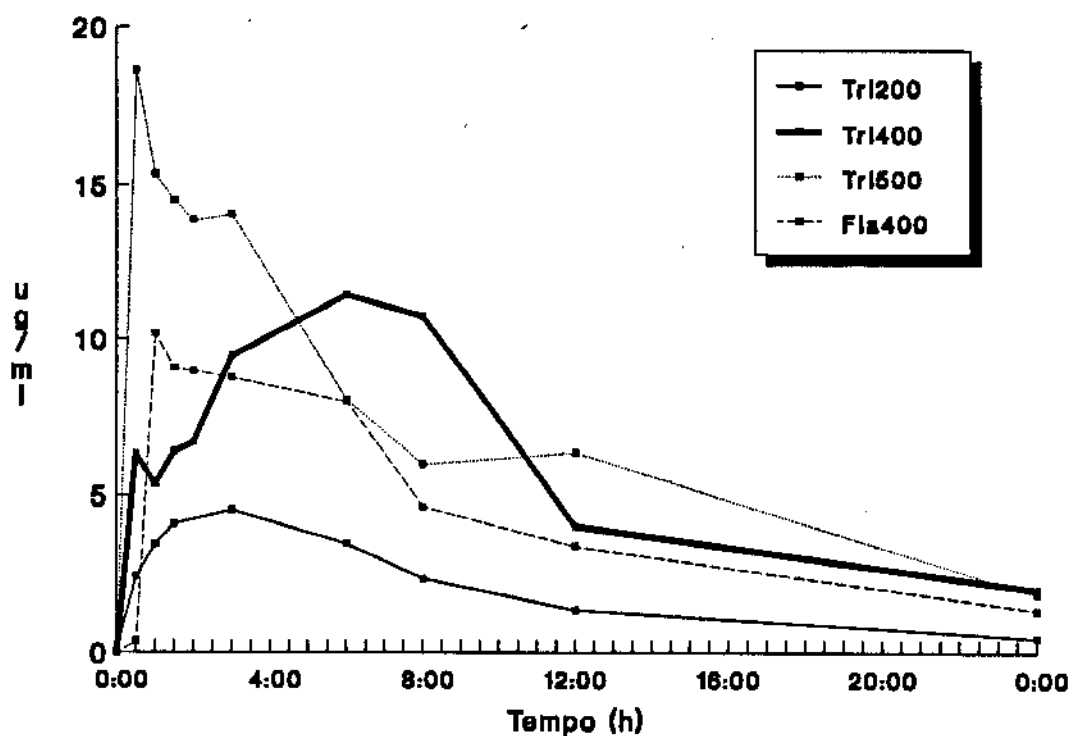
Vol. VI - R.C.S.



	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC_[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{h}$)	75.75	139.75	139.80	140.50
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	4.7	7.2	11.7	10.2
T_{max} (h)	1.5	8	1	1

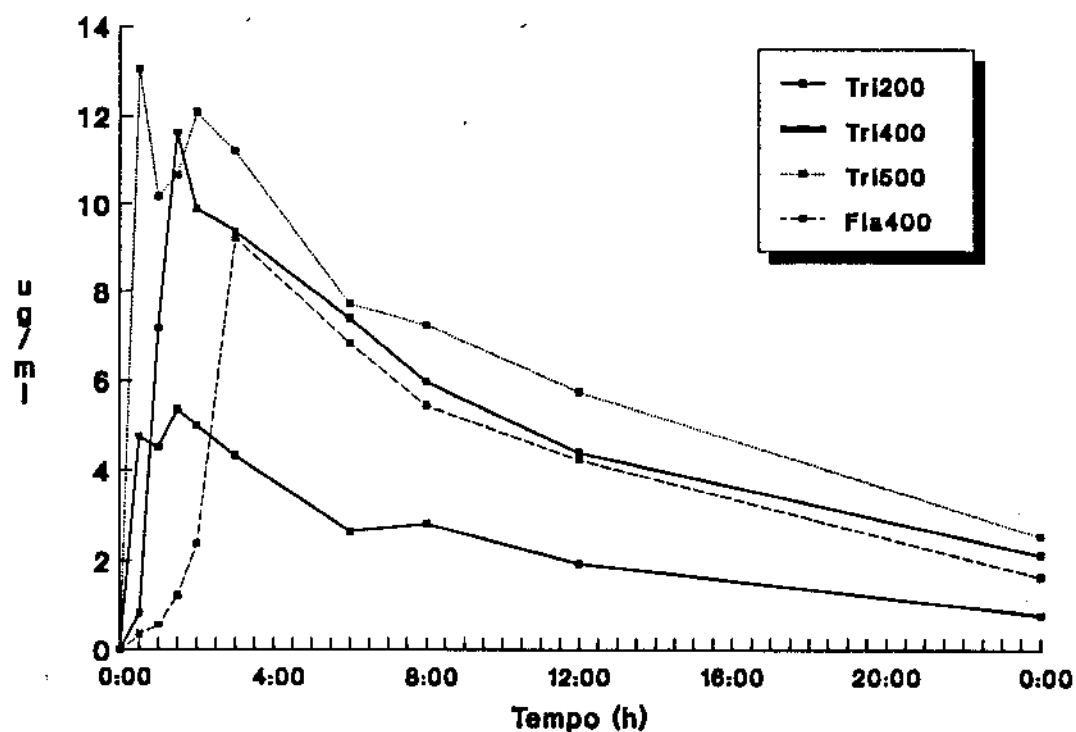


	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{h}$)	32.70	69.57	117.68	65.08
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3.4	6.3	9.6	5
T _{max} (h)	1.5	2	1	2

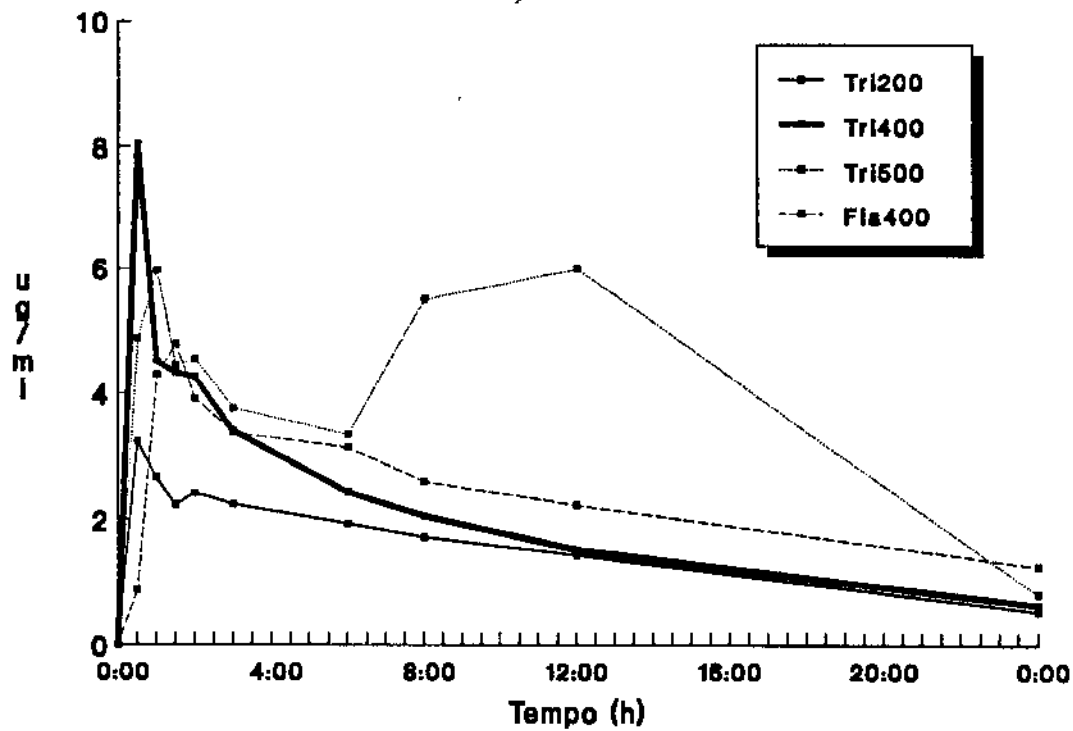


	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{ h}$)	46.18	137.67	161.92	102.47
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	4.5	11.5	18.7	10.2
T _{max} (h)	3	6	0.5	1

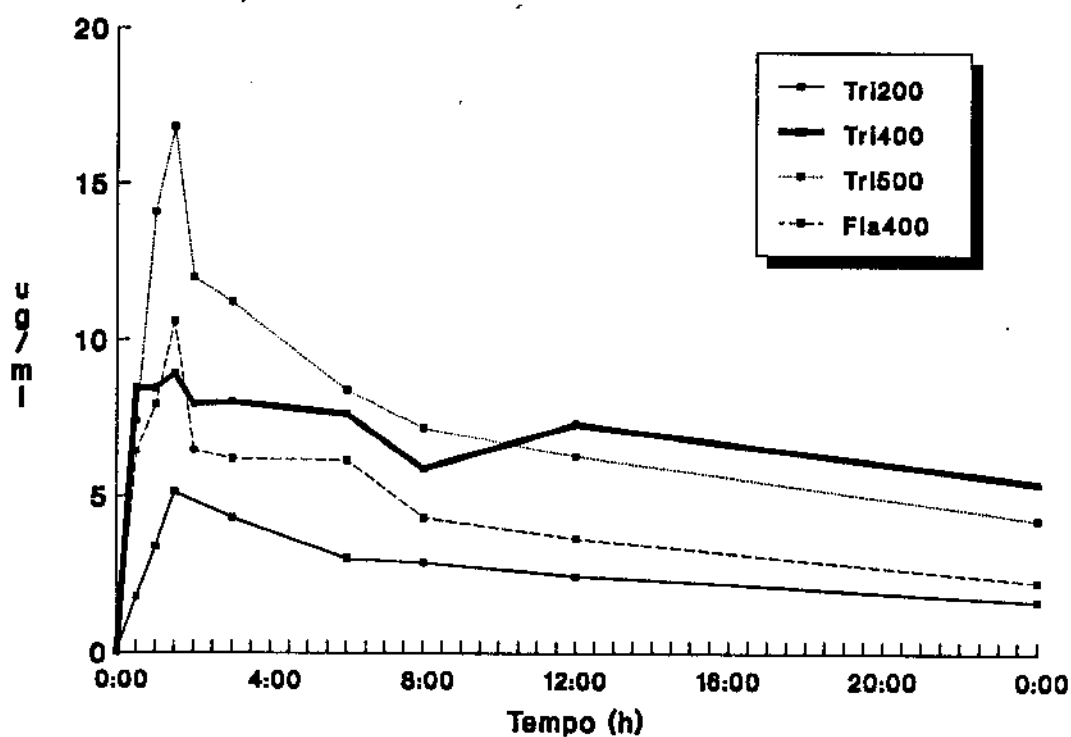
Vol. IX - W.L.L.



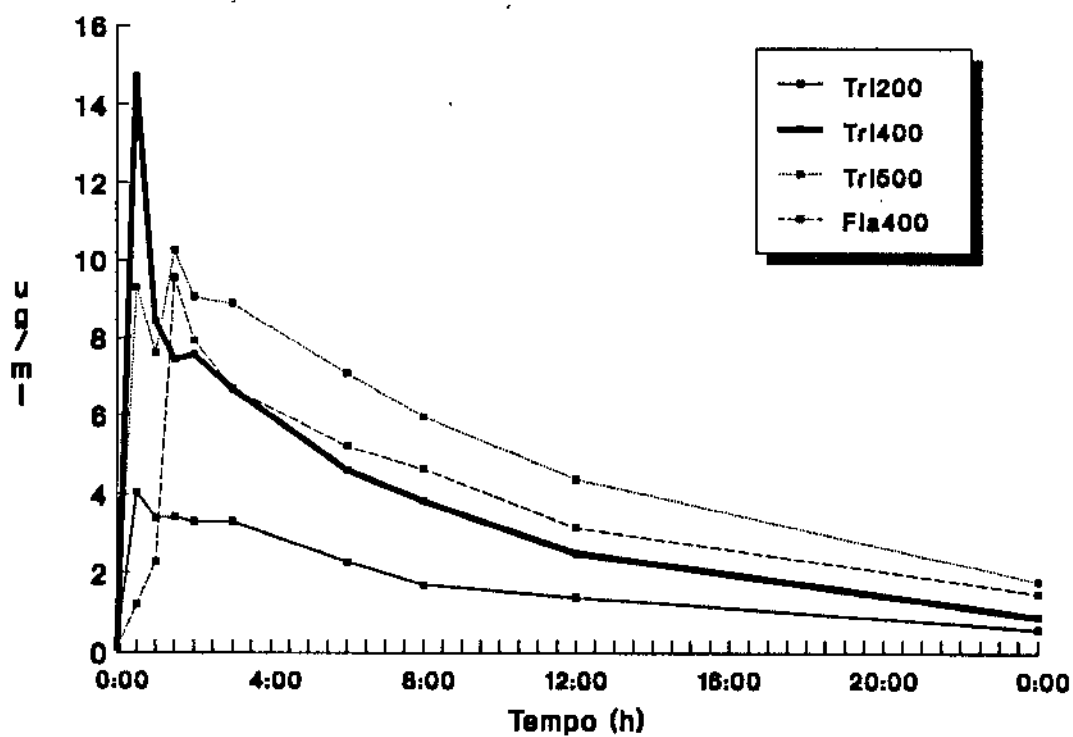
	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{h}$)	54.85	120.32	150.67	98.59
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	5.4	11.6	13.0	9.2
T _{max} (h)	1.5	1.5	0.5	3



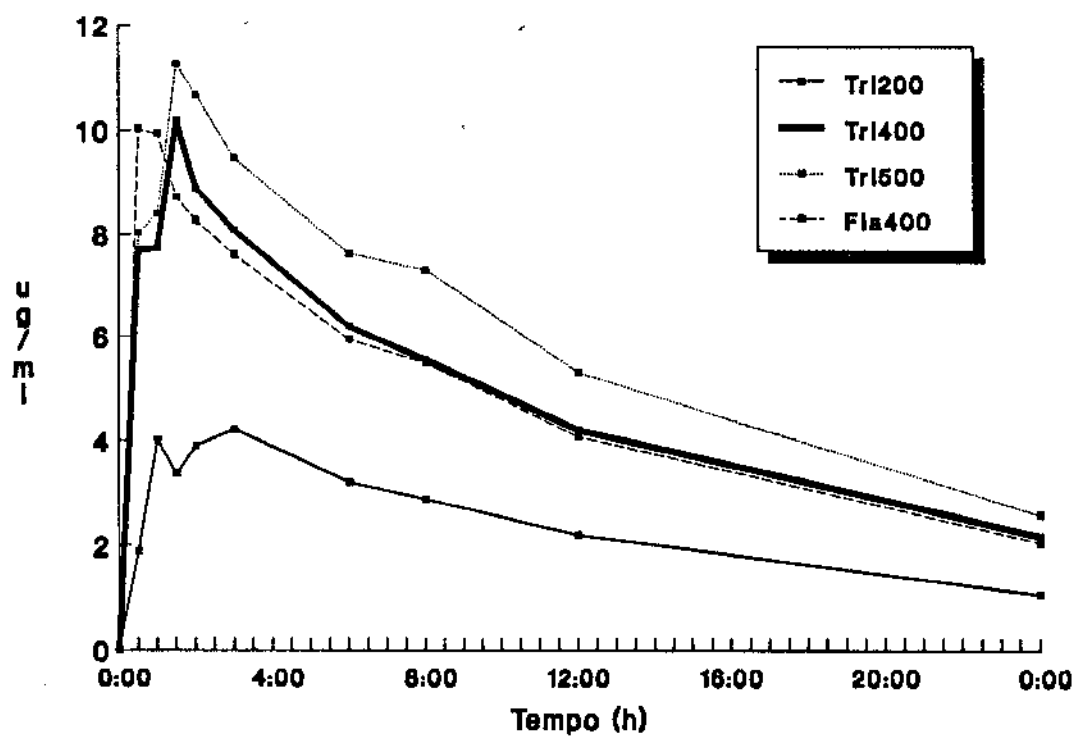
	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{h}$)	34.35	46.33	96.43	55.93
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3.3	8.0	6.0	4.8
T _{max} (h)	0.5	0.5	1	1.5



	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{h}$)	63.47	163.00	169.35	101.52
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	5.1	8.9	16.8	10.6
T _{max} (h)	1.5	1.5	1.5	1.5

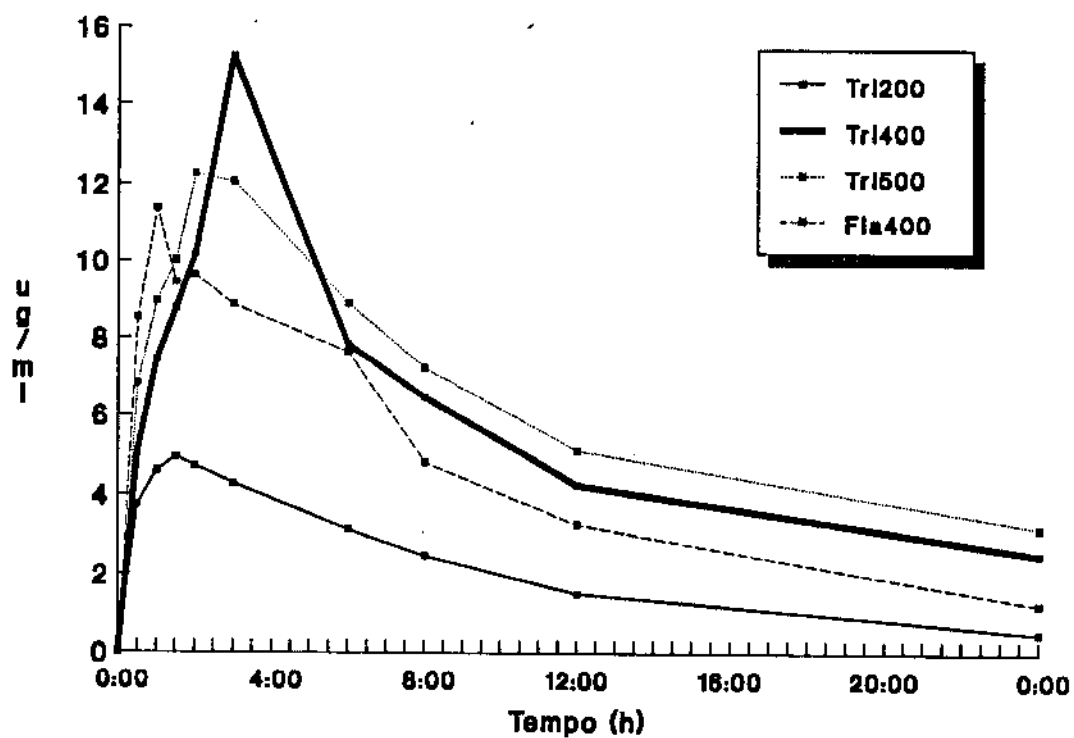


	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] (µg ml ⁻¹ h)	40.17	82.65	119.90	87.23
C _{max} (µg/ml)	4.1	14.7	10.3	9.5
T _{max} (h)	0.5	0.5	1.5	1.5



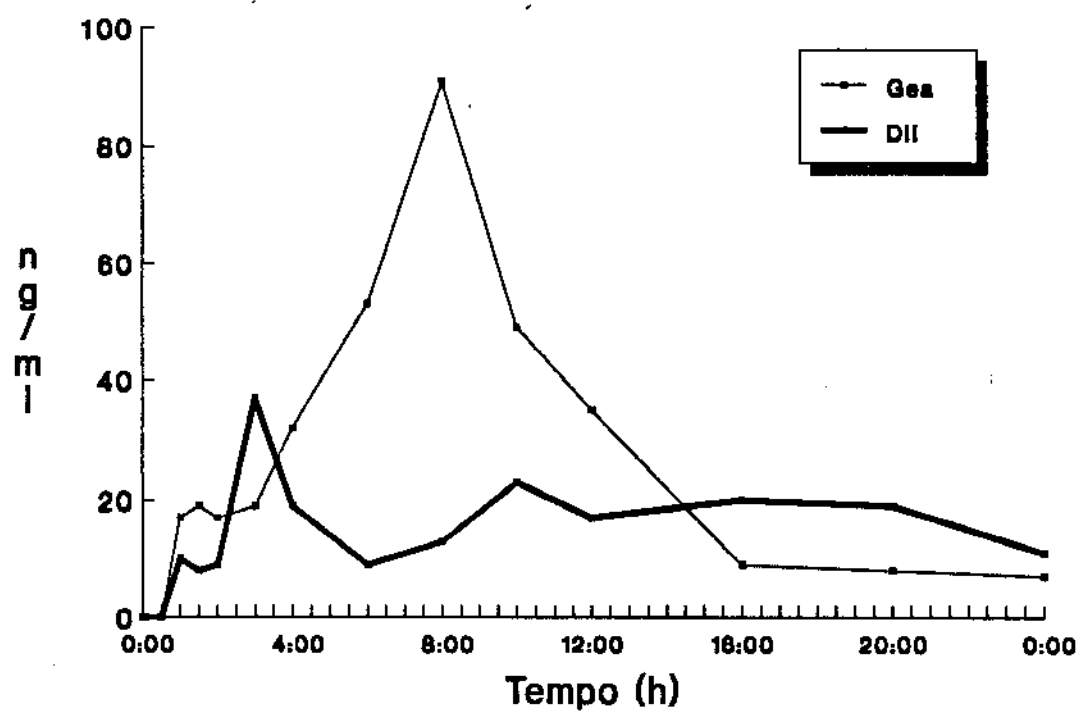
	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{ h}$)	56.92	114.48	139.73	112.37
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	4.2	10.2	11.2	10.0
T_{max} (h)	3	1.5	1.5	0.5

Vol. XIV - MNM



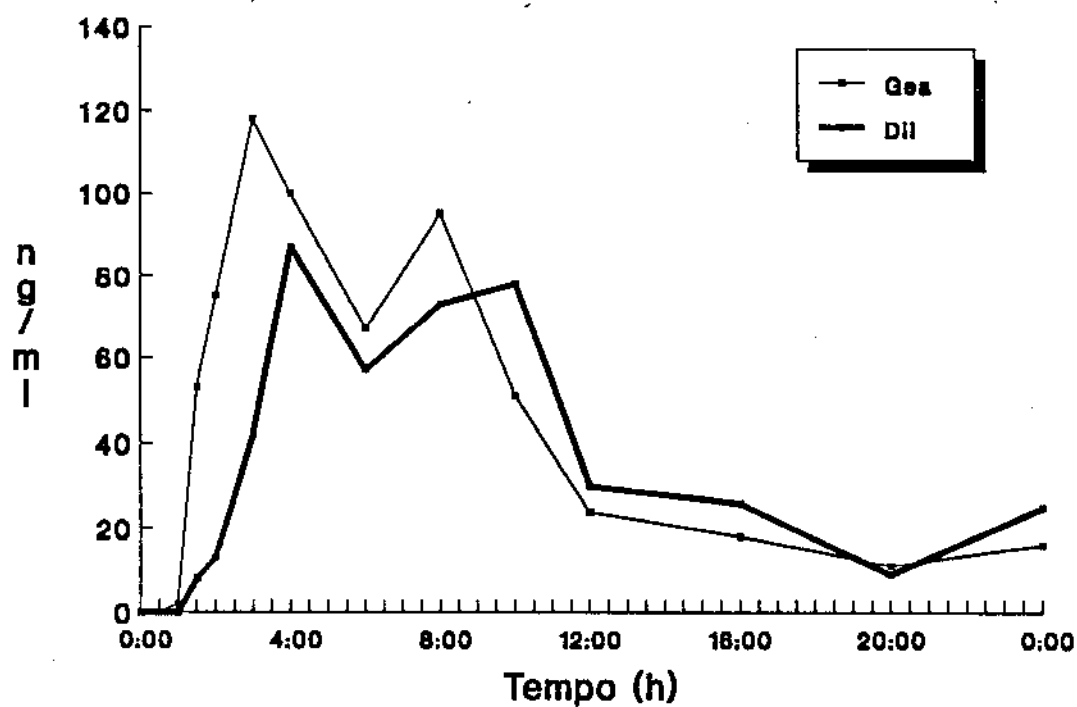
	Tri200	Tri400	Tri500	Fla400
AUC _[0-24] ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{ h}$)	49.03	136.25	150.18	107.25
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	4.9	15.2	12.3	11.4
T _{max} (h)	1.5	3	2	1

Vol. I - A.R.



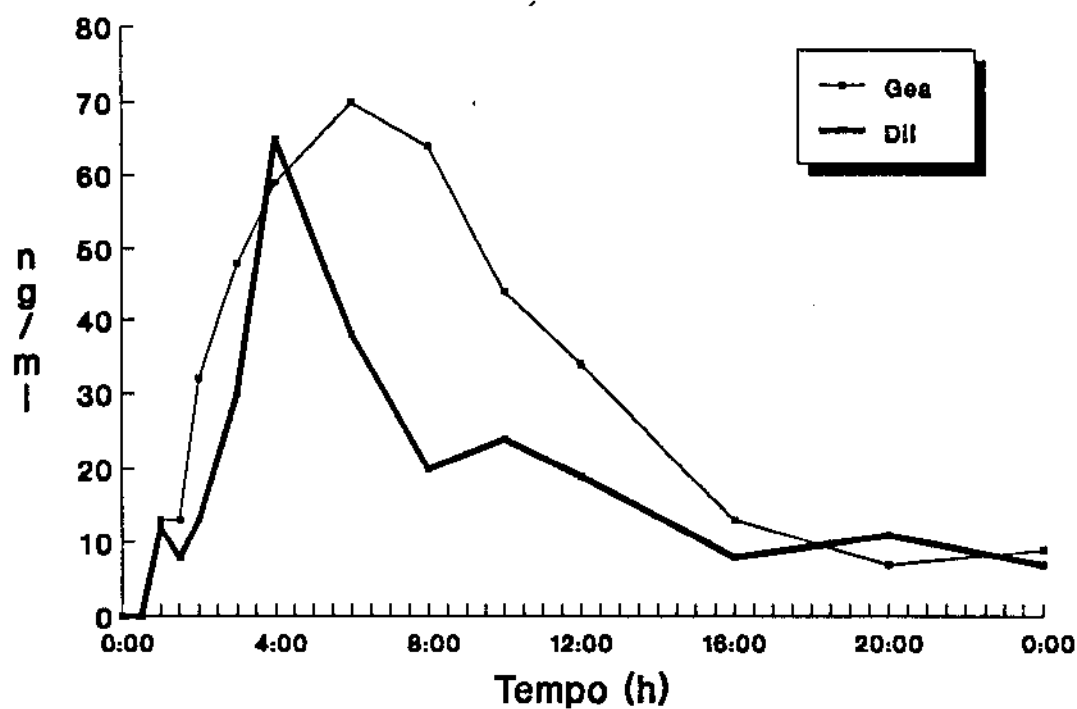
	Gea	Dil
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	670	400
C _{max} (ng/ml)	91	37
T _{max} (h)	8	3

Vol. II - R.S.Q.



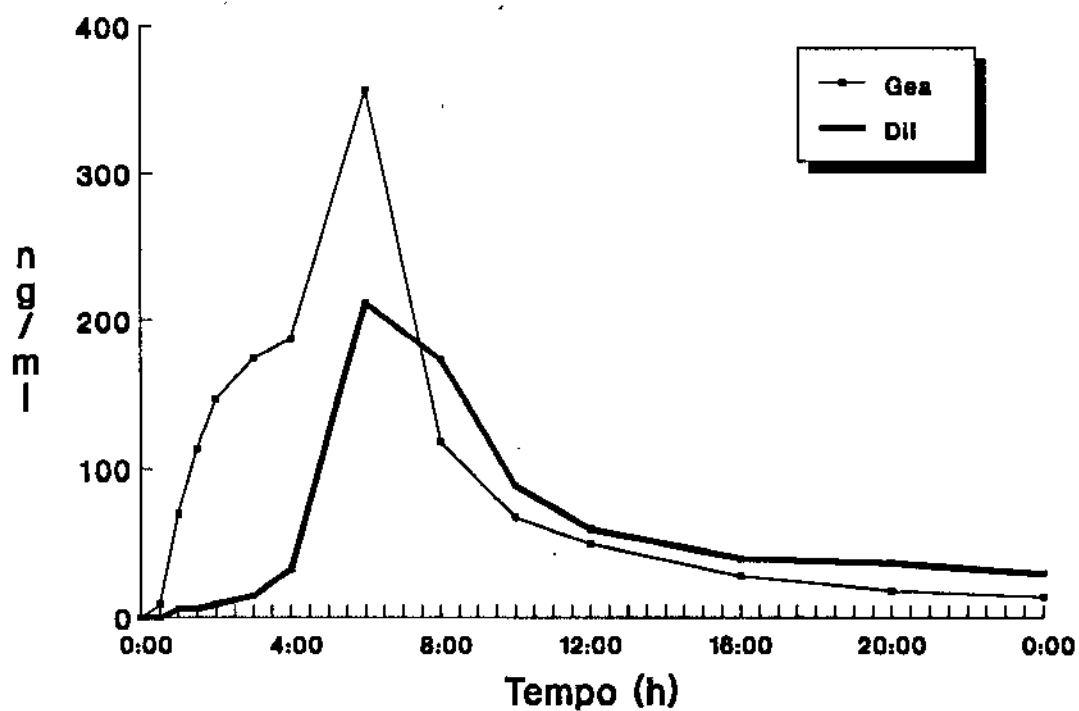
	Gea	Dil
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	996	878
C _{max} (ng/ml)	118	87
T _{max} (h)	3	4

Vol. III - J.A.F.



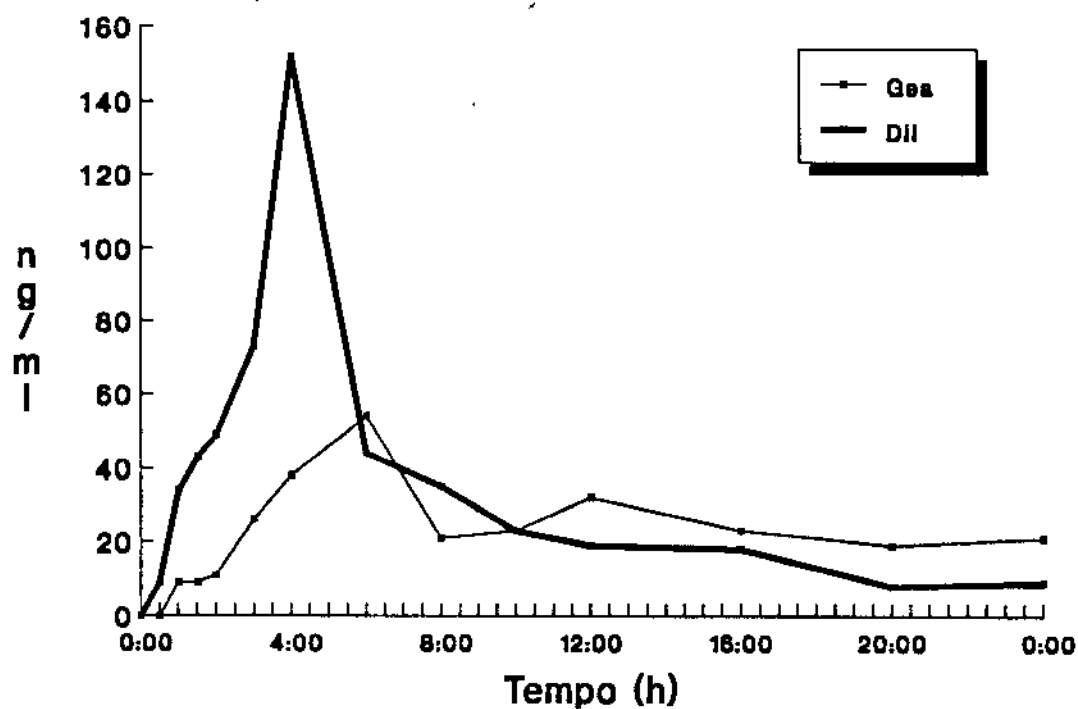
	Gea	Dil
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	729	458
C _{max} (ng/ml)	70	65
T _{max} (h)	6	4

Vol. IV - J.R.M.



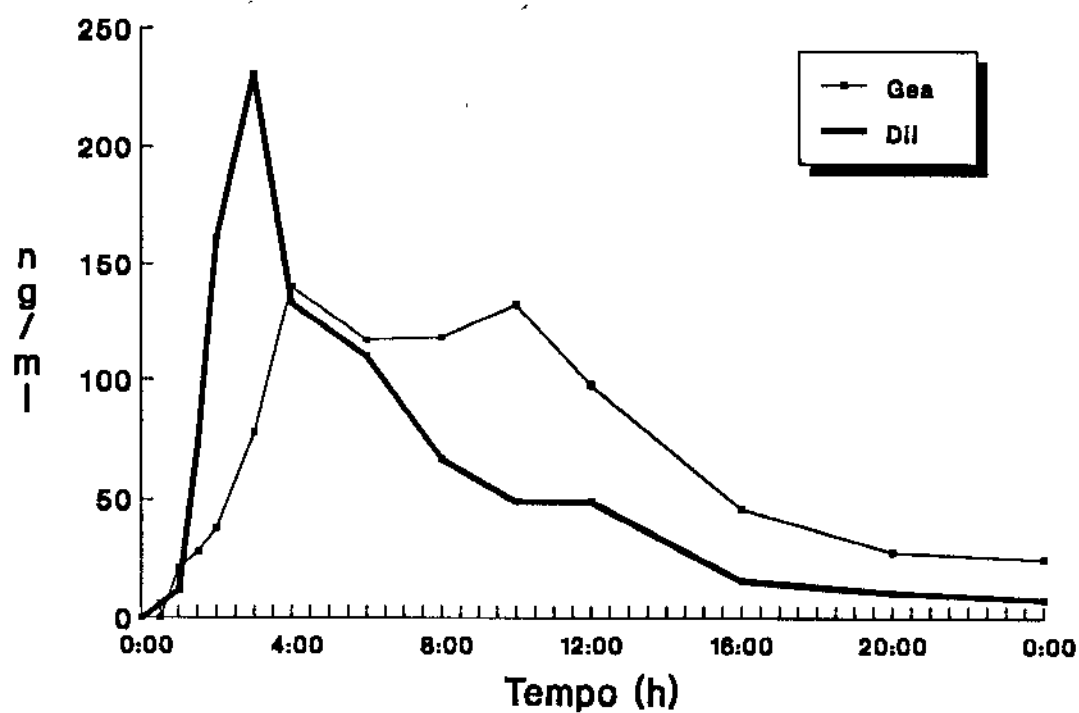
	Gea	Dil
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	2108	1573
C _{max} (ng/ml)	357	212
T _{max} (h)	6	6

Vol. V - J.A.A.



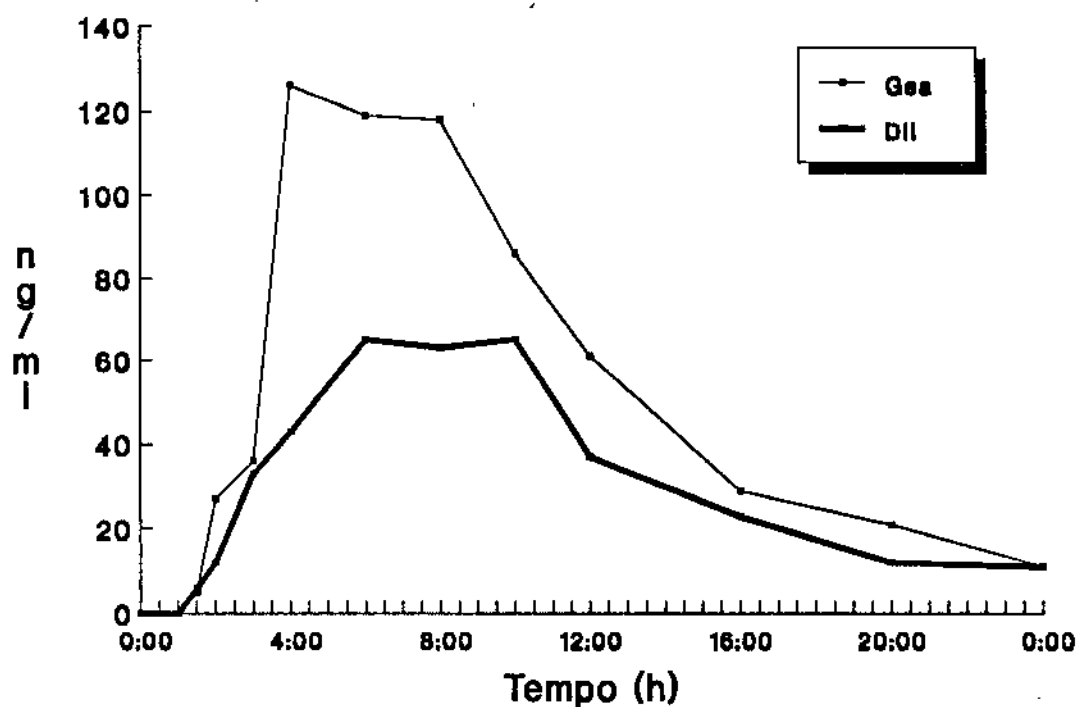
	Gea	DiI
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	602	764
C _{max} (ng/ml)	54	152
T _{max} (h)	6	4

Vol. VI - R.F.A.



	Gea	Dil
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	1715	1320
C _{max} (ng/ml)	140	231
T _{max} (h)	4	3

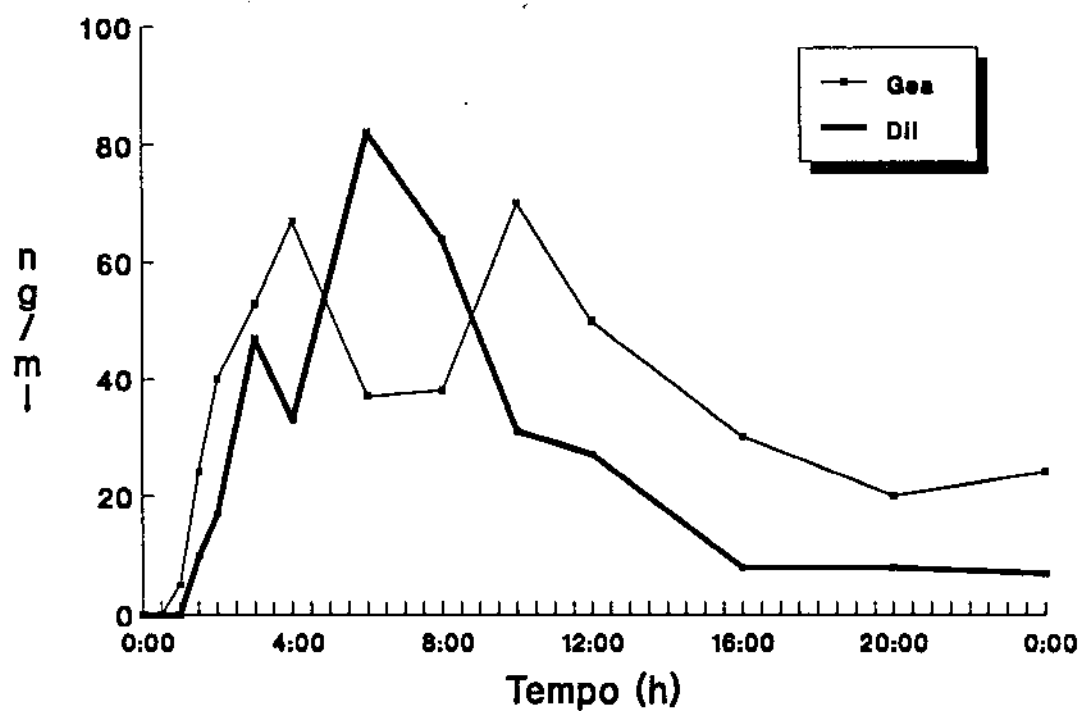
Vol. VII - E.S.M.



	Gea	Dil
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	1299	769
C _{max} (ng/ml)	126	65
T _{max} (h)	4	6

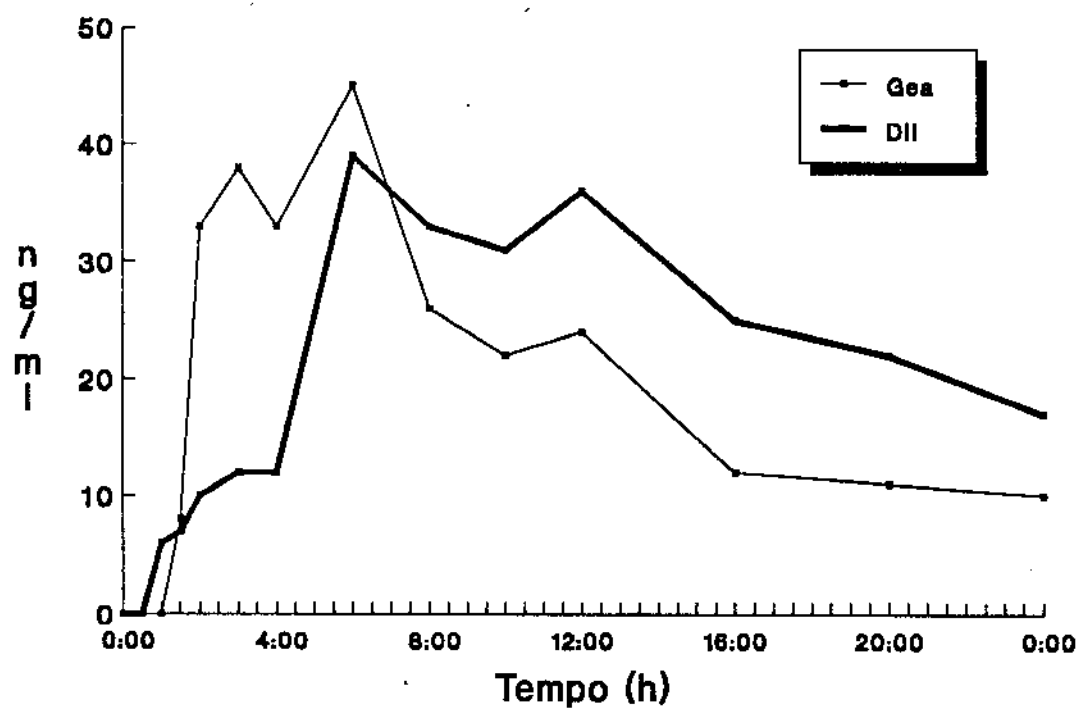
Vol. VIII - C.A.S.

77



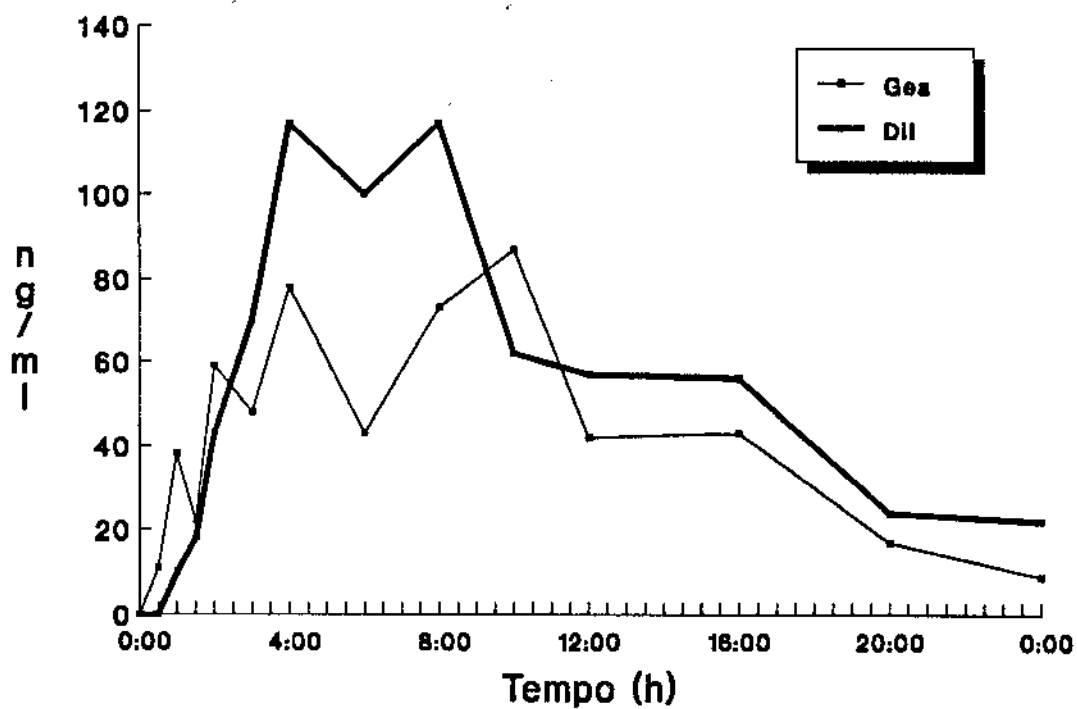
	Gea	Dil
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	886	627
C _{max} (ng/ml)	70	82
T _{max} (h)	10	6

Vol. IX - W.Z.N.



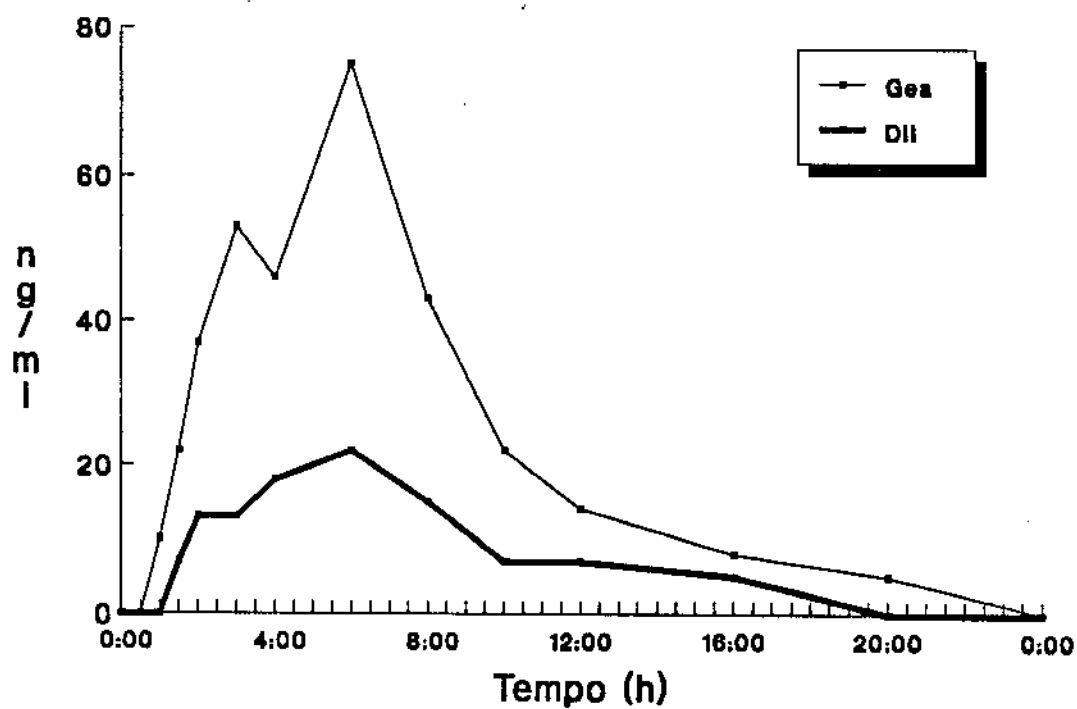
	Gea	DII
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	486	580
C _{max} (ng/ml)	45	39
T _{max} (h)	6	6

Vol. X - L.F.C.



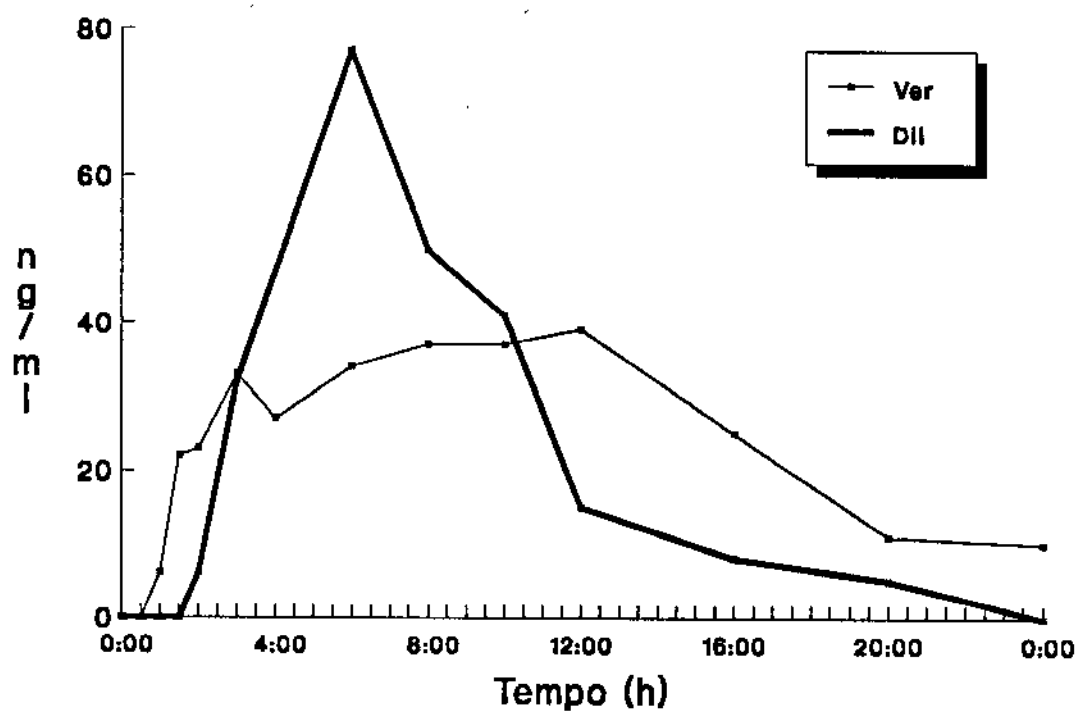
	Gea	Dil
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	1035	1385
C _{max} (ng/ml)	87	117
T _{max} (h)	10	4

Vol. XI - W.C.O.

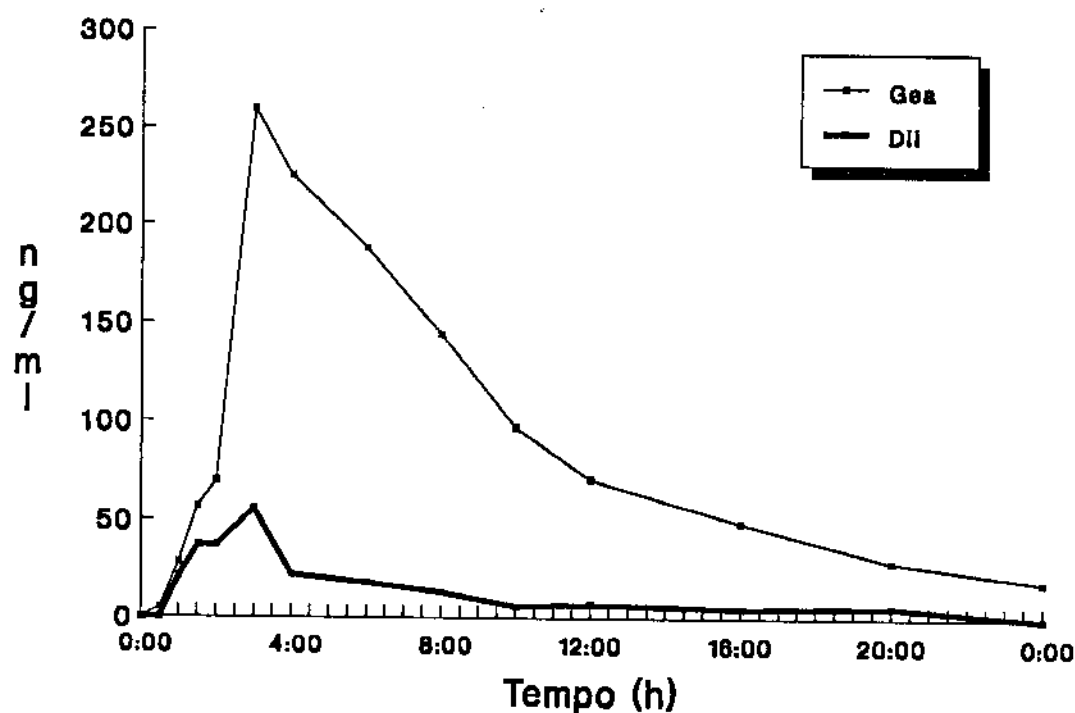


	Gea	DII
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	540	182
C _{max} (ng/ml)	75	22
T _{max} (h)	6	6

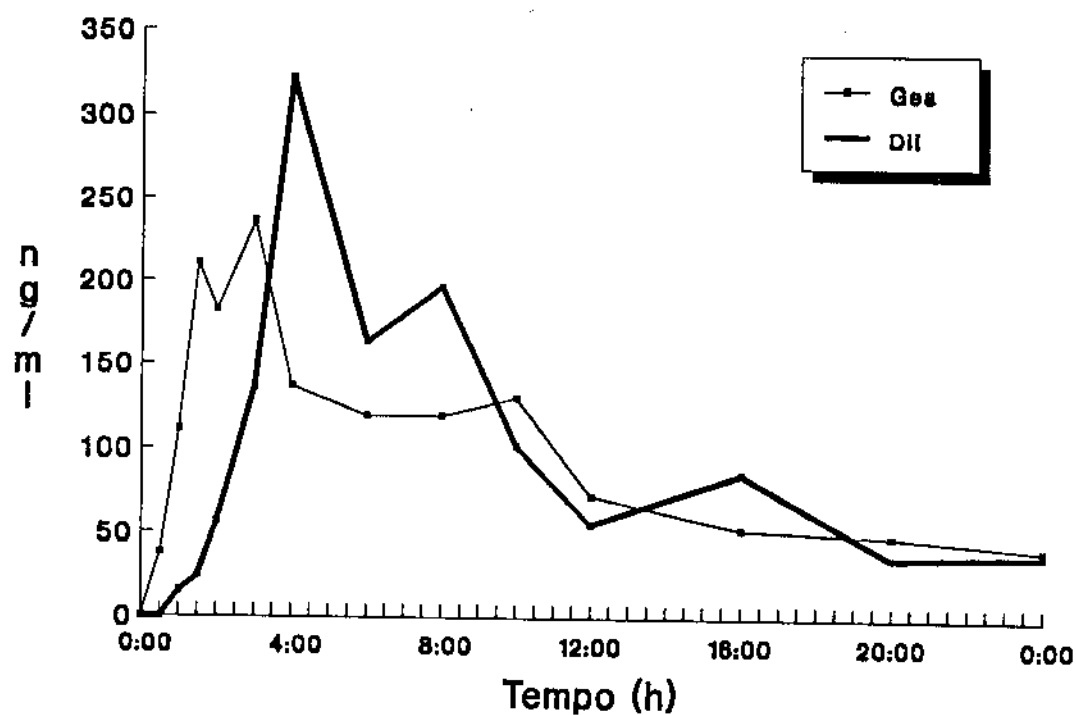
Vol. XII - A.R.M.



	Gea	Dil
AUC[0-24]	602	520
($ng\ ml^{-1}\ h$)		
C_{max}	39	77
(ng/ml)		
T_{max}	12	6
(h)		



	Gea	Dil
AUC _[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	2116	285
C _{max} (ng/ml)	260	56
T _{max} (h)	3	3



AUC[0-24] (ng ml ⁻¹ h)	Gea 2204	Dil 2339
C _{max} (ng/ml)	236	322
T _{max} (h)	3	4

ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE 4 PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE METRONIDAZOL EM VOLUNTÁRIOS SADIOS

Responsáveis: Drs. Marcos A. de Paolis e Gilberto de Nucci

O abaixo-assinado (nome, idade, RG, endereço e HC) declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supra-citado, de responsabilidade dos médicos Marcos A. de Paolis e Gilberto de Nucci, da Unidade de Farmacologia Clínica - HC UNICAMP. O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é verificar que o comprimido de metronidazol elaborado pelos Laboratórios Abbott atinge níveis plasmáticos de metronidazol equivalentes ao comprimido vendido comercialmente pelos Laboratórios Rhodia.

ii - Durante o estudo, será internado quatro vezes por 24 horas, com intervalo de 7 dias. Em cada ocasião lhe será administrado 1 comprimido de metronidazol por via oral e coletado 10 amostras de sangue de 5 ml cada através de butterfly heparinizado em cada internação.

iii - A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.

iv - A administração oral de metronidazol poderá causar efeitos colaterais como náuseas, vômitos, cefaléia. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações idiossincráticas imprevisíveis.

v - Será submetido antes da primeira internação e após a segunda internação aos seguintes exames laboratoriais: hemograma, transaminases, fosfatase alcalina, bilirrubina total, proteínas totais, uréia, creatinina, urina rotina e eletrocardiograma.

vi - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação do referido ensaio clínico.

vii - Está livre para interromper a participação no ensaio clínico a qualquer momento, a não ser que esta interrupção seja contraindicada por motivo médico.

viii - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade de Farmacologia Clínica.

ix - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e a Unidade de Farmacologia Clínica não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

x - Durante o período de 30 dias a partir da data da assinatura do mesmo, a Unidade de Farmacologia Clínica pagará uma indenização no valor de no caso de morte ou invalidez permanente.

xi - A Unidade de Farmacologia Clínica oferecerá tratamento médico no Hospital das Clínicas da UNICAMP por um período de 6 meses a partir da data da assinatura deste termo, independente do tratamento estar ou não relacionado ao uso da medicação no ensaio clínico.

xii - Caso houver gastos adicionais para tratamento médico, e o motivo do tratamento é decorrente do uso da medicação durante o ensaio clínico, estes gastos serão absorvidos pela Unidade de Farmacologia Clínica.

xiii - A Unidade de Farmacologia Clínica lhe manterá informado em relação ao progresso da pesquisa, caso julgue a informação relevante para o voluntário.

xiv - Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto Socorro do Hospital das Clínicas da UNICAMP e solicitar que o mesmo contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico.

xv - Poderá contactar a Secretaria da Comissão de Ética (fone xxxx) para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

xvi - É condição indispensável para participação no ensaio clínico que esteja em boa saúde, e portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações.

Campinas, de 1991.

Nome do Voluntário

Dr Marcos A de Paolis

Dr Gilberto de Nucci

ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE 2 PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE VERAPAMIL EM VOLUNTÁRIOS SÁDIOS

Responsáveis: Drs. Marcos A. de Paolis e Gilberto de Nucci

O abaixo-assinado (nome, idade, RG, endereço e HC) declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supra-citado, de responsabilidade dos médicos Marcos A. de Paolis e Gilberto de Nucci, da Unidade de Farmacologia Clínica - HC UNICAMP. O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é verificar que o comprimido de Verapamil elaborado pelos Laboratórios Abbott atinge níveis plasmáticos de verapamil equivalentes ao comprimido vendido comercialmente pelos Laboratórios Knoll.

ii - Durante o estudo, será internado duas vezes por 24 horas, com intervalo de 7 dias. Em ambas as ocasiões lhe será administrado 1 comprimido de 240 mg de verapamil por via oral e coletado 14 amostras de sangue de 5 ml cada através de butterfly heparinizado em cada internação.

iii - A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.

iv - A administração oral de verapamil poderá causar efeitos colaterais como náuseas, vômitos, cefaléia. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações idiossincráticas imprevisíveis.

v - Será submetido antes da primeira internação e após a segunda internação aos seguintes exames laboratoriais: hemograma, transaminases, fosfatase alcalina, bilirrubina total, proteínas totais, uréia, creatinina, urina rotina e eletrocardiograma.

vi - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação do referido ensaio clínico.

vii - Está livre para interromper a participação no ensaio clínico a qualquer momento, a não ser que esta interrupção seja contraindicada por motivo médico.

viii - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade de Farmacologia Clínica.

ix - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e a Unidade de Farmacologia Clínica não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

x - Durante o período de 30 dias a partir da data da assinatura do mesmo, a Unidade de Farmacologia Clínica pagará uma indenização no valor de no caso de morte ou invalidez permanente.

xi - A Unidade de Farmacologia Clínica oferecerá tratamento médico no Hospital das Clínicas da UNICAMP por um período de 6 meses a partir da data da assinatura deste termo, independente do tratamento estar ou não relacionado ao uso da medicação no ensaio clínico.

xii - Caso houver gastos adicionais para tratamento médico, e o motivo do tratamento é decorrente do uso da medicação durante o ensaio clínico, estes gastos serão absorvidos pela Unidade de Farmacologia Clínica.

xiii - A Unidade de Farmacologia Clínica lhe manterá informado em relação ao progresso da pesquisa, caso julgue a informação relevante para o voluntário.

xiv - Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto Socorro do Hospital das Clínicas da UNICAMP e solicitar que o mesmo contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico.

xv - Poderá contactar a Secretaria da Comissão de Ética (fone xxxx) para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

xvi - É condição indispensável para participação no ensaio clínico que esteja em boa saúde, e portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações.

Campinas, de 1991.

Nome do Voluntário

Dr Marcos A de Paolis

Dr Gilberto de Nucci

Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
Hospital das Clínicas, 22 de Agosto de 1990

COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA DO HC

CONSULTA No. 41/90

ASSUNTO: " ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE DE PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS DE METRONIDAZOL"

INTERESSADO: DR. GILBERTO DE NUCCI.

RELATOR : DR. EDUARDO ARANTES NOGUEIRA.

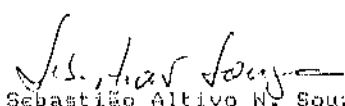
PARECER

Trata-se de estudo de medicamento de uso clínico corrente, cujo o interesse é a comparação da disponibilidade entre quatro preparações farmacêuticas do mesmo sal. O estudo utiliza voluntários sadios, previamente informados do propósito do trabalho bem como dos efeitos da droga e dos transtornos a que serão submetidos com sua inclusão na Pesquisa. No intuito de indenizar os voluntários, foi estabelecida uma quantia em dinheiro.

O trabalho foi considerado passível de realização do ponto de vista ético, inclusive quanto ao valor da indenização, que foi considerado moderado.

Ressalta ainda esta Comissão, que o pesquisador deve atentar para o artigo n. 128 do Código de Ética Médica, na escolha dos voluntários e solicita o envio dos resultados para posterior avaliação e arquivamento.

Dr. Eduardo Arantes Nogueira
Relator


Dr. Sebastião Altivo W. Souza.
Presidente da Comissão de Ética

PARECER APROVADO POR UNANIMIDADE NA REUNIÃO DE 21/08/90



Cidade Universitária "ZEPERINO VAZ" 07.01.91

UNICAMP

Comissão de Ética do hospital das Clínicas da UNICAMP

Assunto: Projeto de pesquisa: "Bioequivalência de 2 preparações de verapamil".

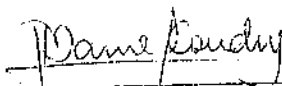
Interessados: Drs. Isac G. Karniol, Alexandre P. Corrado, Marcos A. de Paolis e Gilberto de Nucci.

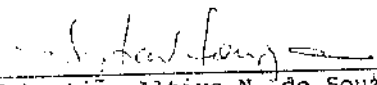
Departamento: Farmacologia clínica.

PARECER:

O análise do projeto em questão em relação a seus objetivos, recursos metodológicos e cronograma de execução, não revelou ressalvas de ordem ética para a sua execução.

Assim sendo, o parecer desta comissão é favorável à realização da pesquisa em questão.


Dr. Jaques Jean Daniel Coudry


Dr. Sebastião Altivo N. de Souza