

LARA CRISTINA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DO 5-MONONITRATO DE ISOSSORBIDA EM
PLASMA HUMANO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE
MASSA COM FOTOIONIZAÇÃO EM PRESSÃO ATMOSFÉRICA**

CAMPINAS

Unicamp

2007

LARA CRISTINA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DO 5-MONONITRATO DE ISOSSORBIDA EM
PLASMA HUMANO POR CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE
MASSA COM FOTOIONIZAÇÃO EM PRESSÃO ATMOSFÉRICA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

CAMPINAS

Unicamp

2007

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

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

Si38q Silva, Lara Cristina
Quantificação do 5-mononitrato de isossorbida em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa com fotoionização em pressão atmosférica / Lara Cristina Silva. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Gilberto de Nucci
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bioequivalência. 2. HPLC. I. Nucci, Gilberto de.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Quantification of isosorbide 5-mononitrate in human plasma by liquid chromatography - tandem mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization

Keywords: • Bioequivalence
• HPLC

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof Dr Gilberto de Nucci

Prof Dr Eduardo Arantes Nogueira

Prof Dr Marcelo Nicolás Muscará

Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal

Profa. Dra. Vera Lúcia Lanchote

Data da defesa: 26 - 11 - 2007



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Prof. Dr. Eduardo Arantes Nogueira

Prof. Dr. Marcelo Nícolas Muscará

Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal

Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

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

Data: 26/11/2007

200804392

*Aos meus queridos pais,
Toninho e Lúcia,
pelo exemplo de
trabalho e
amor.*

*Ao
"pequeno grande homem",
Rafael,
que trouxe luz
para minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela oportunidade e orientação.

A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

A TODOS os colegas, funcionários e professores da Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela significativa contribuição para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

Aos meus queridos amigos e, de modo especial, à Rosemeire Urives Higa, Maria Suzete Blumenthal e Luciene Alves Moreira Marques, pela amizade, incentivo e apoio.

Ao Bruno Amorim Moura, que esteve comigo durante todo este ciclo de vida e que colaborou para uma profunda redescoberta de mim mesma.

Aos meus queridos pais e parentes, pelo apoio, estímulo e carinho.

A Deus, que se faz presente em todos os instantes da minha vida.

*“Em se querendo partir uma pedra,
bateste nela 100 vezes,
e nada conseguiste, e
na 101.^a vez
a pedra se rompeu,
não foi nesta batida
que conseguiu o querias,
mas nas 100 primeiras.”*

	Pág.
RESUMO	xxxv
ABSTRACT	xxxix
1- INTRODUÇÃO	43
1.1- Mononitrato de isossorbida	45
1.1.1- Considerações gerais.....	45
1.1.2- Usos terapêuticos.....	46
1.1.3- Farmacodinâmica.....	47
1.1.3.1- Efeitos celulares.....	47
1.1.3.2- Efeitos cardiovasculares.....	47
1.1.4- Farmacocinética.....	48
1.1.5- Efeitos adversos, precauções e contra-indicações.....	49
1.2- Espectrometria de massas	50
1.2.1- Histórico.....	50
1.2.2- Fotoionização.....	52
1.3- Biodisponibilidade e bioequivalência	55
1.3.1- Medicamento genérico.....	55
1.3.2- Biodisponibilidade.....	57
1.3.3- Bioequivalência.....	59
1.3.4- Critérios de avaliação de bioequivalência.....	61
1.4- Objetivos	63

2.2.3- Protocolo clínico.....	81
2.2.4- Coleta das amostras.....	82
2.2.5- Análise estatística e farmacocinética.....	83
3- RESULTADOS.....	85
3.1- Desenvolvimento do método analítico.....	87
3.1.1- Validação pré-estudo.....	87
3.1.1.1- Teste de sobreposição (“carry-over”).....	87
3.1.1.2- Especificidade.....	87
3.1.1.3- Determinação do limite de quantificação.....	88
3.1.1.4- Linearidade.....	88
3.1.1.5- Precisão e exatidão.....	88
3.1.1.6- Recuperação.....	89
3.1.1.7- Avaliação da supressão de íon.....	89
3.1.1.8- Estabilidade.....	89
3.1.2- Validação das corridas analíticas.....	90
3.1.2.1- Validação intralote.....	90
3.1.2.2- Validação interlote.....	90
3.2- Estudo de bioequivalência.....	106
4- DISCUSSÃO.....	111
4.1- Desenvolvimento do método analítico.....	113
4.2- Estudo de bioequivalência.....	117
5- CONCLUSÃO.....	121
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

7- ANEXO.....	137
7.1- Aprovação do comitê de ética.....	139
8- APÊNDICES.....	141
8.1- Termo de consentimento.....	143
8.2- Seqüência de administração das duas formulações do 5-MNIS em 26 voluntários sadios.....	151
8.3- Refeições servidas aos voluntários durante o período de confinamento para coleta das amostras.....	153
8.4- Dados da validação intralote de todo o estudo.....	155
8.5- Concentrações individuais em função do tempo (figuras) e parâmetros farmacocinéticos (tabelas).....	163
8.6- Trabalhos publicados.....	191
8.6.1- Silva LC, Oliveira LS, Mendes GD et al. Quantification of isosorbide 5-mononitrate in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2006; 832 (2):302-6.....	191
8.6.2- Santos Filho, HO, Ilha, JO; Silva LC, et al."Comparative bioavailability study with two amiodarone tablet formulations administered with and without food in healthy subjects." Submetido e aceito pela revista Arzneimittel-Forschung.....	191

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

γGT	gama glutamil transpeptidase
μL	microlitro
5-MNIS	5-mononitrato de isossorbida (5-MNIS)
ANOVA	Análise de variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	afinidade ao próton
APCI	ionização química em pressão atmosférica ou “atmospheric pressure chemical ionization”
API	ionização em pressão atmosférica ou “atmospheric pressure ionization”
APPI	fotoionização em pressão atmosférica ou “atmospheric pressure photoionization”
ASC	Área sob a curva da concentração plasmática do fármaco em função do tempo
ASC_{0-∞}	Área sob a curva da concentração plasmática do fármaco do tempo 0 até o infinito
ASC_{0-24h}	Área sob a curva da concentração plasmática do fármaco de 0 a 24 horas após administração do fármaco
ASC_{0-t}	Área sob a curva da concentração plasmática do fármaco do tempo 0 até a última concentração quantificável do fármaco (concentração acima do LOQ)
CE	energia de colisão ou “collision energy”

CGAR-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência ou “high performance liquid chromatography (HPLC)”
CLAE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
CLAE-EM-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série ou “liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)”
cm	centímetro
C_{máx}	Concentração máxima atingida
CQ	controle de qualidade
CQA	controle de qualidade baixo
CQB	controle de qualidade médio
CQC	controle de qualidade alto
CXP	potencial de saída da célula colisão ou “collision cell exit potential”
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCI	Denominação Comum Internacional
DP	desvio-padrão
DP*	potencial de desagregação ou “declustering potential”
EI	energia de ionização
EM	espectrometria de massas ou “mass spectrometry (MS)”
EMEA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
ESI	ionização por eletronebulização ou electrospray ionization
FDA	Food and Drug Administration

FP	potencial de focalização ou “focusing potential”
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
h	hora
HCG	Gonadotrofina coriônica humana ou “human corionic gonadotrophine”
HRGC-ECD	cromatografia gasosa de alta resolução com um detector de captura de elétron (“high resolution gas chromatography with an electron-capture detector”)
IC	intervalo de confiança
IS	potencial da fonte de ionização ou “ion transfer voltage”
Ke	Constante de eliminação
L	litro
ln	logarítmo natural
LOQ	limite de quantificação
M	molar
m/z	massa/carga
mg	miligrama
mL	mililitro
MRM	monitoração de reações múltiplas (“Multiple Reaction Monitoring”)
n	número de dados
N₂	nitrogênio
ng	nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde

pH	potencial hidrogeniônico
pKa	constante de dissociação
PS	fotospray negativo
R	referência
T	teste
t_{1/2}	Tempo de meia-vida
T_{máx}	Tempo em que ocorre a concentração plasmática máxima
u.m.a.	unidade de massa atômica
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
USP	United States Pharmacopeia
v/v	volume por volume
vol.	voluntário
vs	versus

LISTA DE TABELAS

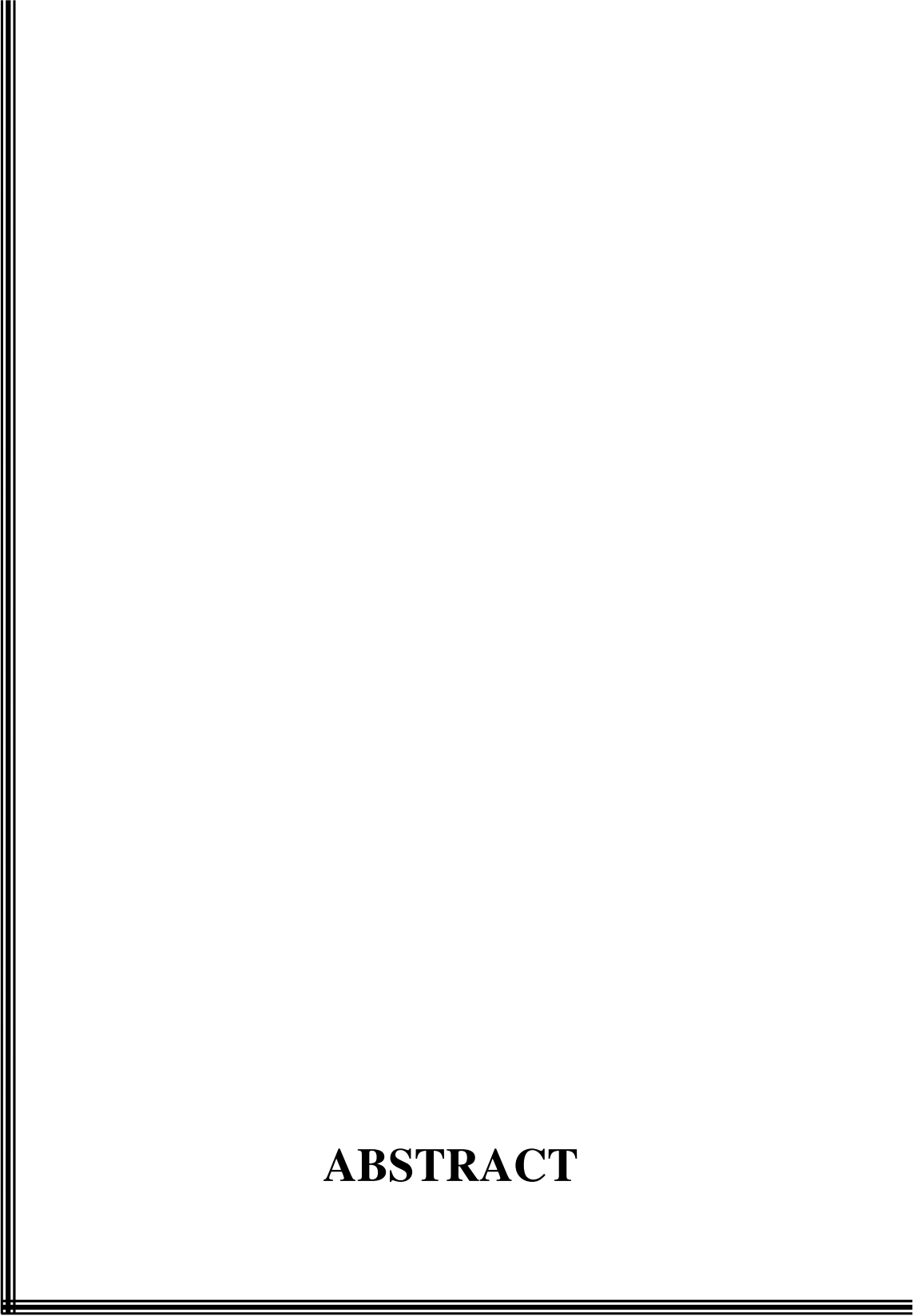
	Pág.
Tabela 1 Dados de validação do LOQ para o 5-MNIS.....	94
Tabela 2 Dados de validação da curva de calibração para o 5-MNIS.....	95
Tabela 3 Dados de validação intra e interlote para o 5-MNIS.....	97
Tabela 4 Dados de validação do processo de reinjeção para o 5-MNIS.....	98
Tabela 5 Valores médios da recuperação do 5-MNIS.....	99
Tabela 6 Resultados do teste de estabilidade pós-processamento.....	101
Tabela 7 Resultados do teste de estabilidade após 4 ciclos de congelamento e descongelamento.....	101
Tabela 8 Resultados do teste de estabilidade a curto prazo.....	102
Tabela 9 Resultados do teste de estabilidade a longo prazo.....	102
Tabela 10 Resultados do teste de estabilidade da solução-mãe de 5-MNIS.....	103
Tabela 11 Resultados do teste de estabilidade das soluções de trabalho de 5-MNIS.....	103
Tabela 12 Exemplo de validação intralote.....	104
Tabela 13 Dados da validação interlote.....	105
Tabela 14 Média (e DP) dos principais parâmetros farmacocinéticos. Os dados correspondem aos 27 voluntários que receberam uma dose única de 40 mg de cada formulação.....	107
Tabela 15 Média (e DP) das concentrações plasmáticas (ng/mL) do 5-MNIS de ambas formulações em função do tempo (n = 27).....	108
Tabela 16 Análise estatística das razões individuais da ASC_{0-24h} , $ASC_{0-\infty}$, ASC_{0-t} e $C_{m\acute{a}x}$ obtidas após a administração de dose única de 40 mg de 5-MNIS (de ambas formulações) em 27 voluntários sadios.....	109

	Pág.
Figura 1 Estrutura química do 5-MNIS.....	46
Figura 2 Espectro de massa do 5-MNIS.....	91
Figura 2A Usando fonte de ionização por fotospray (APPI), voltagem da fonte de íon = -1200 V, equipamento API 3000, mostrando os íons monitorados que correspondem ao aduto com o ânion acetato [M + acetato]- de m/z 249,9 e o íon molecular deprotonado [M – H]- de m/z 189,9.....	91
Figura 2B Usando fonte turbo ionspray (ESI), voltagem da fonte de íon = -4500 V, equipamento API 4000, mostrando que não houve a formação do íon [M + acetato]- de m/z 249,9.....	91
Figura 2C Usando fonte de ionização química (APCI), agulha de descarga corona = 5 µA, equipamento API 4000, mostrando a formação do íon [M + acetato]- de m/z 249,9, mas numa baixa abundância.....	91
Figura 3 Cromatogramas do teste de “carry-over” mostrando que a injeção do padrão mais alto não alterou a linha de base da injeção da amostra branco.....	92
Figura 3A Último cromatograma do extrato da amostra branco da série testada.....	92
Figura 3B Último cromatograma da injeção do padrão mais alto da série testada.....	92
Figura 4 Exemplos de cromatogramas.....	93
Figura 4A Do plasma branco mostrando ausência de interferentes no tempo de retenção do 5-MNIS.....	93
Figura 4B Do plasma contaminado com 20 ng.mL ⁻¹ de 5-MNIS (LOQ) mostrando o tempo de retenção de 1,2 min.....	93

Figura 5	Gráfico representativo da curva de calibração para o 5-MNIS.....	96
Figura 6	Experimento de supressão de íon, mostrando nenhuma supressão significante no tempo em que o analito foi eluído (1,2 min).....	100
Figura 6A	Perfil da linha de base do extrato de plasma branco injetado no sistema enquanto uma solução padrão de 5-MNIS em fase móvel estava sendo infundida, mostrando ausência de supressão de íon.....	100
Figura 6B	Pico padrão do LOQ (20 ng/mL) mostrando o tempo de retenção do 5-ISMN de 1,2 min.....	100
Figura 7	Curva média das concentrações plasmáticas de 5-MNIS em função do tempo para ambas as formulações. Os dados correspondem aos 27 voluntários que receberam dose única de 40 mg de cada formulação.....	107

RESUMO

O 5-mononitrato de isossorbida (5-MNIS) é um nitrato orgânico comumente usado no tratamento da *angina pectoris* em razão de suas propriedades vasodilatadoras. No presente estudo, um novo método foi desenvolvido para determinar e quantificar o 5-MNIS no plasma humano por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em série (CLAE-EM-EM), usando ionização fotospray. O 5-MNIS foi extraído de 0,5 mL de plasma humano por extração líquido-líquido. O método teve um tempo de corrida cromatográfica de 2,0 min usando uma coluna analítica C8 (100 mm × 2.1 mm i.d.). Apesar do método ter apresentado uma curva de calibração não linear (20 to 2000 ng mL⁻¹), a metodologia analítica foi completamente validada ($r^2 > 0.995$). Os resultados do desempenho do método indicam que o método é eficiente, robusto e suficientemente preciso e exato para a determinação de rotina do 5-MNIS em plasma humano. O método desenvolvido aqui foi empregado num estudo de bioequivalência de dois comprimidos de 5-MNIS 40 mg. O estudo de bioequivalência foi aberto, aleatorizado, com dois períodos, cruzado, com um intervalo de uma semana entre os períodos. Ambas as formulações foram bem toleradas. Os parâmetros farmacocinéticos do 5-MNIS foram semelhantes aos descritos na literatura. Os intervalos de confiança (IC) 90% para as médias geométricas de ASC_{0-t} e $C_{máx}$ foram incluídos no intervalo de bioequivalência. Baseado nas regras do FDA e Anvisa para os ensaios de bioequivalência em humanos, a bioequivalência pode ser concluída, tanto para a velocidade como para a extensão da absorção entre ambas as formulações, após administração de dose oral simples (5-MNIS 40 mg).



ABSTRACT

Isosorbide 5-mononitrate (5-ISMN) is an organic nitrate widely used for its vasodilating properties in the treatment of angina pectoris. In the present study, a new method was developed for the determination and quantification of 5-ISMN, in human plasma, by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), using photospray ionization. 5-ISMN was extracted from 0.5 mL human plasma by liquid–liquid extraction (LLE). The method had a chromatographic run of 2.0 min using a C8 analytical column (100 mm ×2.1 mm i.d.). Although the method showed a non linear calibration curve response (20 to 2000 ng mL⁻¹), the analytical methodology was fully validated ($r^2 > 0.995$). The assay performance results indicate that the method is efficient, robust and sufficiently precise and accurate for the routine determination of the 5-ISMN in human plasma. The method herein developed was employed in a bioequivalence study of two tablet formulations of 5-ISMN 40 mg. The bioequivalence study was conducted open, randomized, two-period, crossover, one-week washout period. Both formulations was well tolerated. Pharmacokinetic parameters of 5-ISMN was similar those described in the literature. The 90% confidence interval (CI) for the geometric mean of AUC_{0-t} and C_{max} were included into the bioequivalence range. Based on FDA and Anvisa rules for human bioequivalence trial, can be concluded bioequivalence for both, rate and extent of absorption between both formulations after single oral dose administration (5-ISMN 40 mg).

1- INTRODUÇÃO

1.1- Mononitrato de isossorbida

1.1.1- Considerações gerais

O 5-mononitrato de isossorbida (5-MNIS) é um nitrato orgânico usado na profilaxia da angina. Exerce seu efeito pelo relaxamento do músculo liso vascular, resultando na dilatação das artérias e veias periféricas.

O trabalho de Needleman (Needleman et al., 1972) foi o ponto de partida para a concepção e posterior desenvolvimento do 5-MNIS como um agente antianginoso. Needleman mostrou que nitratos reduziam a pressão arterial quando injetados na veia jugular de ratos, mas não quando injetados na veia porta. Baseado nisto, concluiu que a terapia oral com nitratos orgânicos era um placebo.

Atualmente, esta conclusão genérica seria considerada absurda, mas Needleman estava certo na definição de um ponto farmacológico fraco dos nitratos orais disponíveis naquela época: todos estavam sujeitos a uma grande degradação pelo efeito de primeira passagem pelo fígado. Por exemplo, para a nitroglicerina o efeito de primeira passagem ocorre em cerca de 95% da dose administrada e para o dinitrato de isossorbida, 70 a 80% (Abshagen, 1992).

Estas observações estimularam as investigações sobre o metabolismo de primeira passagem e a vasoatividade do dinitrato de isossorbida e seus metabólitos. O dinitrato de isossorbida é rapidamente metabolizado em 2-mononitrato de isossorbida e 5-MNIS, ambos ativos. O efeito de primeira passagem para o 5-MNIS é menor que 5%, fazendo com que este composto apresente cerca de 100% de biodisponibilidade, após dose oral. O 5-MNIS persiste no plasma por muitas horas após o desaparecimento do dinitrato de isossorbida, apresentando uma longa meia-vida de eliminação (cerca de 5 horas) e não tem metabólito ativo (Chasseaud, 1987). Mostra uma pequena variabilidade interindividual (Major et al., 1984) e, portanto, apresenta níveis séricos mais previsíveis e reprodutíveis. O efeito de primeira passagem, muito pequeno, compensa a menor vasoatividade deste metabólito, comparada ao dinitrato de isossorbida. Sob o ponto de vista farmacocinético, este fármaco tornou-se mais vantajoso que o dinitrato de isossorbida (Abshagen, 1992).

O nome químico do 5-MNIS é D-glucitol, 1,4:3,6-dianidro-,5-nitrato. O 5-MNIS é um pequeno composto alifático bicíclico com fórmula química $C_6H_9NO_6$ e peso molecular de 191,148 u.m.a. A fórmula estrutural do 5-MNIS está representada na Figura 1 (Klasco, 2007a). O 5-MNIS pode explodir se sujeito a percussão ou aquecimento excessivo. Por causa desta propriedade, não está disponível com 100% de pureza, sendo misturado com lactose, manitol ou amido em diferentes proporções para evitar risco de explosão (USP, 2007). O 5-MNIS não diluído é um pó branco, cristalino, fotossensível, facilmente solúvel em água, álcool, acetona e diclorometano (Sweetman, 2006).

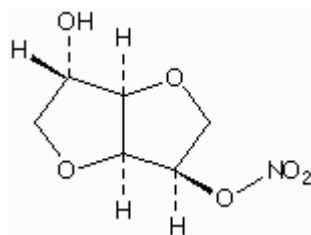


Figura 1- Estrutura química do 5-MNIS

1.1.2- Usos terapêuticos

O 5-MNIS é mais efetivo que o dinitrato de isossorbida no tratamento da angina estável crônica (Bidoggia, 1987). Também apresenta bons resultados no tratamento do infarto agudo do miocárdio e no tratamento do edema pulmonar associado à deficiência ventricular esquerda (Gammage et al., 1986). O 5-MNIS pode ser administrado via oral e intravenosa, com efeitos hemodinâmicos observados em 30 minutos, persistindo por 5 horas ou mais (Klasco, 2007c).

A dose de 20 mg, considerada ótima por dispensar o ajuste individual da dose do paciente, e a farmacocinética favorável são vantagens do 5-MNIS sobre os outros nitratos disponíveis (Optimizing... 1992).

Como acontece com outros nitratos, o desenvolvimento de tolerância foi relatado com o uso de 5-MNIS. Para prevenir a tolerância e conseqüente redução na eficácia, deve-se manter um período sem nitrato todos os dias. Este período deve ocorrer quando o paciente tem menor possibilidade de desenvolver angina, que normalmente é durante o período de sono. Um regime de dose assimétrico (20 mg pela manhã e 20 mg, 7 horas depois) ou o uso de formulações de liberação sustentada podem atenuar o desenvolvimento de tolerância durante a terapia oral crônica (Rudolph et al., 1983; Abshagen, 1992). A forma de liberação sustentada que permite uma dose diária pode também melhorar a adesão ao tratamento.

1.1.3- Farmacodinâmica

1.1.3.1- Efeitos celulares

Os nitratos orgânicos (nitroglicerina, isossorbida, pentaeritritol) atuam no músculo liso vascular onde são convertidos a óxido nítrico, que age como um mensageiro celular induzindo a ativação da guanilato ciclase. Este nucleotídeo induz vasodilatação, provavelmente pela redução da concentração de cálcio livre no citosol. Neste processo, os grupos sulfidrilas reduzidos, provavelmente oriundos da cisteína, atuam como co-fatores; podendo ser a depleção destes grupos durante este processo metabólico o principal fator do desenvolvimento da tolerância aos nitratos, juntamente com os mecanismos fisiológicos compensatórios (Klasco, 2007c). A identidade de enzima(s) comum, responsável pela conversão para óxido nítrico, ainda é desconhecida. (Rinde-Hoffman et al., 1991; Fung, 1993). No entanto, os efeitos dilatadores dos nitratos orgânicos são independentes do endotélio intacto, ao contrário do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico endógeno) (Silber, 1990).

1.1.3.2- Efeitos cardiovasculares

Em virtude de sua ação no músculo liso vascular, os nitratos são chamados nitrovasodilatadores. A dilatação venosa predomina sobre a dilatação das arteríolas.

A dilatação venosa reduz o retorno venoso como resultado da concentração venosa (“pooling” venoso), e redução da pressão e volume do ventrículo esquerdo na diástole (denominada redução na pré-carga). A dilatação das arteríolas, que é menor e menos importante, reduz tanto a resistência vascular periférica quanto a pressão do ventrículo esquerdo na sístole (denominada redução na pós-carga). O efeito conseqüente é uma redução nos determinantes primários da demanda de oxigênio do miocárdio. O efeito da pré-carga não ocorre com betabloqueadores ou com bloqueadores de canais de cálcio. Os nitratos também apresentam um efeito vasodilatador coronário que melhora o fluxo sanguíneo coronário em áreas isquêmicas, resultando na melhora do abastecimento de oxigênio do miocárdio (Silber, 1990).

O 5-MNIS também apresenta efeitos anti-espasmódicos. Efeitos antiplaquetários foram descritos para doses terapêuticas de nitratos, mas o mecanismo ainda continua indefinido (Silber, 1990; Loscalzo, 1992).

1.1.4- Farmacocinética

O 5-MNIS é rapidamente absorvido a partir do trato gastrointestinal. Após administração oral de comprimidos convencionais, níveis plasmáticos de pico são atingidos em 30 a 60 min, com o início de ação em 20 min persistindo por cerca de 8 a 10 horas. Diferente do dinitrato de isossorbida, o 5-MNIS não sofre metabolismo hepático de primeira passagem e sua biodisponibilidade é cerca de 100%. A ligação às proteínas é menor que 5%. Tem um volume de distribuição aparente semelhante ao volume total de água do corpo (0,6 L/Kg), que é consideravelmente menor do que aqueles de compostos mais lipofílicos, como o dinitrato de isossorbida (3,9 L/Kg) e da nitroglicerina (3,3 L/Kg) (Kirsten et al., 1998). É captado pelas células do músculo liso vascular e o grupo nitrato é degradado em nitrito inorgânico e óxido nítrico. É metabolizado a compostos inativos, incluindo isossorbida e glicuronídeo de isossorbida. Somente 2% de 5-MNIS é excretado inalterado na urina, com meia-vida de eliminação de cerca de 5 horas (Abshagen, 1992).

Comparada aos demais nitratos, o fato de não haver metabólitos ativos simplifica a farmacocinética deste nitrato durante o tratamento crônico, já que não ocorre o acúmulo de efeito devido aos metabólitos ativos. Considerando que o 5-MNIS é completamente absorvido e não sofre metabolismo de primeira passagem, seus parâmetros farmacocinéticos são altamente reprodutíveis e previsíveis. A cinética do 5-MNIS é dose-linear, existindo uma correlação evidente entre a dose administrada, a concentração plasmática e a resposta clínica. A farmacocinética não é alterada em idosos ou em pacientes com doença cardíaca coronariana, deficiência renal e disfunção hepática (Abshagen, 1992).

1.1.5- Efeitos adversos, precauções e contra-indicações

O conhecimento dos efeitos adversos, precauções e contra-indicações é de especial importância para garantir a segurança dos voluntários submetidos a um estudo de bioequivalência, como o apresentado neste trabalho. Segue abaixo, estes dados de forma resumida (Klasco, 2007b):

Os efeitos adversos mais comuns são: tontura, hipotensão ortostática, taquicardia; do sistema gastrointestinal: constipação, diarreia, náusea, vômito; do sistema neurológico: vertigem, dor de cabeça; efeito psiquiátrico: inquietação (Klasco, 2007b).

Os efeitos adversos mais graves são do sistema cardiovascular: disritmia, deficiência cardíaca e episódio hipotensivo grave.

Contra-indicações: hipersensibilidade ou reação idiossincrática a nitratos orgânicos ou outros nitratos ou nitritos.

Interações medicamentosas contra-indicadas: sildenafil (estabelecida), tadalafil (teórica), vardenafil (estabelecida).

Precauções: infarto agudo do miocárdio; uso de álcool; bloqueadores de canais de cálcio; hemorragia cerebral; uso de sildenafil concomitantemente; deficiência cardíaca congestiva; glaucoma; hipotireoidismo; cardiomiopatia hipertrófica; hipotensão; metemoglobinemia; trauma recente de cabeça; anemia grave; depleção de volume.

1.2- Espectrometria de massas

1.2.1- Histórico

O início da padronização das técnicas analíticas e da difusão comercial da instrumentação analítica deu-se com o surgimento do espectrômetro UV-visível Beckman DU, em meados de 1940. Desde então, a química analítica instrumental, principalmente nos campos da espectrometria e espectroscopia, evoluiu significativamente, aumentando as possibilidades analíticas em níveis de sensibilidade e seletividade impensáveis até poucos anos atrás. Uma das técnicas analíticas que ganhou extrema importância no elenco disponível para a indústria farmacêutica foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Pereira et al., 2005).

A aplicação da espectrometria de massas (EM) na análise de compostos orgânicos não é novidade. Faz mais de 70 anos desde sua primeira aplicação e mais de 30 anos desde o surgimento do primeiro sistema comercial que acoplava a espectrometria de massas à cromatografia gasosa (utilizando colunas capilares). Mesmo com o passar de tantos anos, a EM ainda é tratada, no Brasil, como uma ferramenta analítica praticamente restrita à pesquisa acadêmica (raras exceções), quando já há no mercado brasileiro demanda para profissionais especializados na área. A EM já é uma realidade nos laboratórios analíticos de diversas empresas privadas de diferentes segmentos, sobremaneira do alimentício e do farmacêutico (Pereira et al., 2005).

A EM é uma técnica analítica que permite a determinação qualitativa e quantitativa de vários componentes de uma amostra. A EM produz partículas carregadas (íons) dos analitos na amostra e usa campos elétricos e/ou magnéticos para separar as partículas carregadas de acordo com sua massa/carga (m/z) (AppliedBiosystems, 2006). Dois ou mais EM podem ser acoplados (EM/EM), a fim de fornecer informações estruturais através da fragmentação dos íons isolados e/ou obter melhores seletividade e sensibilidade para análises quantitativas (WatersCorporation, 2007).

As características ideais para um detector para um sistema cromatográfico qualquer são: um sistema com alta sensibilidade e alta seletividade, boa resposta a um grande número de classes de compostos e habilidade na detecção de misturas complexas

permitindo uma alta velocidade de processamento de amostras. Também é indispensável que o detector possa ser utilizado em análises quantitativas. Todas essas características são encontradas no detector por espectrometria de massas (Pereira et al., 2005). O desenvolvimento de técnicas de ionização em pressão atmosférica (“API”: “atmospheric pressure ionization”), tais como a ionização química em pressão atmosférica (“APCI, atmospheric pressure chemical ionization”) e a ionização por eletronebulização (“ESI, electrospray ionization”) possibilitaram a união viável e efetiva de duas poderosas ferramentas analíticas, a espectrometria de massas (EM) com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tornando-as um método (CLAE-EM) robusto e aplicável a uma grande variedade de matrizes (Pereira et al., 2005).

A ESI produz íons do analito na fase líquida antes deles entrarem no EM. A ionização ocorre através da combinação de um alto campo elétrico (3-5 kV) com nebulização pneumática (Chen et al., 2005). É usado para pequenas moléculas polares, peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos e outros compostos de alto peso molecular (AppliedBiosystems, 2006).

A APCI evapora a amostra através de um nebulizador aquecido antes da ionização, que é feita por uma descarga corona. O vapor de solvente também age como um gás reagente para reações de ionização química (Chen et al., 2005). O APCI é freqüentemente usado para moléculas termicamente estáveis que necessitam maior energia de ionização. É útil para pequenos compostos polares e neutros (AppliedBiosystems, 2006).

A CLAE-EM combina o poder de separação da CLAE, que remove as interferências da amostra que poderiam prejudicar a ionização, com o poder de detecção da EM, ligados por uma interface que elimina o solvente e gera os íons em fase gasosa. Nas técnicas de ionização em pressão atmosférica, a eliminação do solvente e os passos de ionização são combinados na fonte e ocorrem à pressão atmosférica (WatersCorporation, 2007).

Mais recentemente, com o surgimento dos primeiros equipamentos comerciais com sistema de fotoionização (“APPI: atmospheric pressure photoionization”), a técnica CLAE-EM tornou-se uma ferramenta analítica universal capaz de analisar desde

componentes de baixa massa molecular como aminoácidos até de alto peso molecular, como proteínas (Pereira et al., 2005).

No Brasil, um segmento que vem ganhando cada vez mais importância econômica, inclusive trazendo divisas com a prestação de serviços na área de química analítica, é a análise de fármacos em amostras de plasma, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (CLAE-EM/EM) para desenvolvimento de medicamentos genéricos. O impacto e a velocidade de crescimento da CLAE-EM-EM são tão grandes que, mesmo para moléculas tradicionalmente analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM), como é o caso dos esteróides, a CLAE-EM-EM apresenta enormes vantagens, principalmente em relação à simplicidade da preparação da amostra e tempo de análise, normalmente inferior a 5 min (Pereira et al., 2005).

1.2.2- Fotoionização

A fotoionização em pressão atmosférica (APPI) é o mais novo método de ionização branda na EM (Robb et al., 2000), portanto, ainda com poucos trabalhos publicados. No entanto, a fotoionização não é uma técnica revolucionária. Foi introduzida há aproximadamente 30 anos atrás, como um método de detecção na cromatografia gasosa (Driscoll, 1976; Driscoll e Clarici, 1976; Driscoll e Spaziani, 1976; Driscoll, 1977), e quase uma década depois, na cromatografia líquida (Locke et al., 1982; Driscoll et al., 1984)

A APPI é semelhante à APCI, exceto pelo uso de fótons para ionizar as moléculas do analito e aplicação de maior energia de ionização. Isto pode levar a melhores limites de detecção para compostos de baixa polaridade (AppliedBiosystems, 2006).

Resumidamente, são três os passos principais para detecção por fotoionização em fase gasosa:

- * vaporização do eluente;
- * produção de fotoíons pela interação entre um fóton (emitido por uma fonte UV) e os analitos; e
- * detecção (que também pode ser feita pelo EM) (Raffaelli e Saba, 2003).

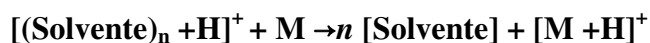
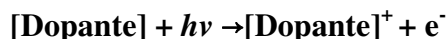
A fonte APPI, como a APCI, vaporiza a amostra com um nebulizador aquecido (300 - 500°C) para gerar uma nuvem densa de analitos em fase gasosa (Chen et al., 2005). É um processo de vaporização rápida com um mínimo de decomposição térmica que preserva a identidade molecular da amostra. A amostra gasosa e as moléculas de solvente são levadas para a fonte de ionização por meio de um fluxo de gás secundário (gás auxiliar) (AppliedBiosystems, 2002).

A emissão dos fótons para ionização é feita com uma lâmpada de fotoionização (Chen et al., 2005). Um grande número de reações pode ocorrer no processo de fotoionização, com a produção de íons esperados ou não. A diferenciação dos íons formados entre solvente e analito é possível. Para tanto, a fonte UV deve ser selecionada para que a energia de emissão de fóton seja maior do que a energia de ionização (EI) das moléculas alvo e menor que EI dos constituintes do ar e dos solventes mais comuns (Raffaelli e Saba, 2003). A lâmpada mais conveniente é a de Kr (10 eV), já que tem uma energia de fóton menor que a dos principais componentes do ar (N₂: 15,58 eV, H₂O: 12,62 eV e O₂: 12,07 eV) e de alguns dos solventes mais comumente usados (p. ex: acetonitrila: 12,20 eV, metanol: 10,84 eV, hexano: 10,13 eV) e maior que a maioria dos compostos investigados. Outras fontes UV são: Ar, com EI de 11,2 eV e Xe, de 8,4 eV (Raffaelli e Saba, 2003).

Um composto dopante, normalmente o tolueno, é vaporizado no gás auxiliar dentro do nebulizador aquecido. Quando a mistura vaporizada entra na região de ionização, a molécula dopante captura a maioria da radiação UV e é predominantemente ionizada devido sua alta concentração no gás auxiliar (AppliedBiosystems, 2002).

O uso de um dopante melhora a sensibilidade de detecção do APPI. Muitas substâncias podem ser usadas como dopante, mas os mais comuns na literatura são o tolueno (EI: 8,83 eV) e a acetona (EI: 9,7 eV). Enquanto o tolueno aumenta a sensibilidade do APPI para compostos com baixa e alta AP (afinidade de próton), a acetona atua somente para aqueles com alta AP (Raffaelli e Saba, 2003). A reação de transferência de próton ocorre somente se a afinidade de próton (AP) do solvente é maior do que a do dopante e a AP do analito é maior do que a do solvente (Hsieh).

A reação inicial no APPI é a formação de um radical cátion do dopante pelo fóton emitido pela lâmpada (por exemplo, Kr de 10 eV). Para esta reação ocorrer, a energia de ionização do dopante precisa ser mais baixa do que a energia do fóton. Então, os radicais cátions do dopante ionizam os analitos através da troca de carga (Kauppila et al., 2002). A reação de protonação de um dado analito M, envolvendo as moléculas de dopante e de solvente, num modo íon positivo é proposto da seguinte forma (Chen et al., 2005):



Ao usar CLAE em fase reversa, uma redução no conteúdo de água do eluente pode aumentar a sensibilidade. Como regra geral, variáveis como aditivos, pH e composição da fase móvel influenciam fortemente os tempos de retenção do analito e o limite de detecção (Raffaelli e Saba, 2003; Chen et al., 2005). Ao contrário das fontes ESI e APCI, a fonte APPI é compatível com ambas as condições de fase normal e de fase reversa, sem a preocupação de um potencial explosivo (Chen et al., 2005).

Atualmente, com o APPI foi possível estender os campos de aplicação do CLAE-EM para aquelas moléculas que ou não são ou são pouco tratáveis com as técnicas de ESI e APCI (Raffaelli e Saba, 2003), abrindo uma nova possibilidade para que compostos pequenos e frágeis, como o 5-MNIS, fossem analisados por CLAE-EM/EM. Possibilidade esta que foi explorada neste trabalho, uma vez que outros métodos analíticos publicados para quantificação de 5-MNIS em plasma humano, apresentam algumas desvantagens como grande volume de amostra, tempos de corrida analítica longos e necessidade de troca freqüente de pré-colunas. O uso da fonte APPI para o desenvolvimento de um novo método analítico para a quantificação do 5-MNIS (CLAE-APPI-EM/EM) ocorreu em razão da necessidade de dosar um grande número de amostras provenientes de um estudo de bioequivalência de duas formulações de 5-MNIS, com o intuito de gerar mais um medicamento genérico para o mercado brasileiro.

1.3- Biodisponibilidade e bioequivalência

1.3.1- Medicamento genérico

Quando consideramos a existência de um novo fármaco, podemos considerar três períodos de vida. O primeiro deles é anterior à sua aprovação para uso público, quando estudos pré-clínicos e clínicos são realizados, visando avaliar sua eficácia e segurança. O segundo centra-se no período de vigência de sua patente, na qual a exclusividade de comercialização ainda existe. O último período inicia-se após o término da patente, quando outras empresas podem comercializar o produto, seja como medicamento similar ou genérico. Assim, várias companhias podem manufaturar e comercializar diferentes formulações de uma mesma substância ativa, apresentando qualidade e desempenho semelhantes, de tal forma que a intercambiabilidade entre as diferentes formulações, quando administradas em doses equivalentes, apresente as mesmas segurança e eficácia (Anvisa, 2002).

Até o início da década de 60, era comum associar-se à eficácia clínica do medicamento apenas à atividade intrínseca do fármaco. Entretanto, várias evidências demonstraram que os componentes da formulação e as técnicas de fabricação também influenciam, sendo indispensável que a forma farmacêutica libere o fármaco na quantidade e na velocidade adequadas ao objetivo terapêutico do produto, o que está diretamente relacionado à sua biodisponibilidade (Pereira et al., 2005).

Bases científicas e tecnológicas possibilitam a produção regular e reprodutível de formulações com as mesmas características farmacêuticas, bem como fornecem a confirmação de sua segurança, eficácia e intercambiabilidade (Anvisa, 2002). A confirmação de intercambiabilidade é dada através dos estudos de equivalência farmacêutica e/ou bioequivalência (Anvisa, 2002). A equivalência farmacêutica entre dois medicamentos relaciona-se à comprovação de que ambos contêm o mesmo fármaco (mesma base, sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa), na mesma dosagem e forma farmacêutica, o que pode ser avaliado por meio de testes *in vitro* (WHO, 1996; Shargel e Yu, 1999). Tanto do ponto de vista dos órgãos regulatórios quanto da indústria, estudos de biodisponibilidade/bioequivalência podem ser solicitados mesmo após a concessão do registro do medicamento.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) encoraja políticas para promover o uso de genéricos que, comparado aos medicamentos de referência, tem preços mais baixos e qualidade equivalente. Na década de 1990, a política de medicamentos genéricos foi identificada como uma alternativa viável para o mercado farmacêutico de países em desenvolvimento, a fim de reduzir a dependência externa e os custos dos medicamentos (Bermudez, 1994). Identifica-se na política de genéricos uma forma de regulação do mercado, permitindo a concorrência de preços com os produtos de marca e com os medicamentos inovadores (King e Kanavos, 2002).

A política de medicamentos genéricos foi instituída no Brasil, em 1999, com a publicação da Lei nº 9.787 (Brasil, 1999), sob intensa divulgação do governo em relação à redução dos custos dos tratamentos com medicamentos genéricos.

Essa lei define medicamento genérico como:

medicamento similar a um produto de referência ou inovador, que pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela Denominação Comum Brasileira (DCB) ou, na sua ausência, pela Denominação Comum Internacional (DCI).

E define medicamento similar como:

aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, preventiva ou diagnóstica do medicamento de referência registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca.

Desde a promulgação da referida lei até hoje, o mercado de medicamentos genéricos tem crescido no Brasil. Em 2006, pela primeira vez, desde a instituição dos genéricos, as vendas atingiram mais de 1 bilhão de dólares. Houve um aumento de 52,5 % comparado a 2005, de acordo com a IMS Health. Além disso, as vendas totais de unidades de medicamentos genéricos alcançaram 194 milhões, um aumento de 27,8 % comparado a 2005. Em termos de valores, os genéricos alcançaram 10,7 % do mercado e, em termos de unidades vendidas, 13,5%. Segundo Odnir Finotti, vice-presidente da Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos, estima-se um aumento de 20% nas unidades vendidas, em 2007 (People'sDailyOnline, 2007).

A Anvisa tem editado uma série de normas (resoluções e portarias), a fim de viabilizar o registro, a produção, a prescrição e a dispensação do medicamento genérico, nortando todo o processo de implementação da política desses medicamentos no Brasil. Os genéricos estão ganhando mercado e têm contribuído para a redução dos custos dos tratamentos (Anvisa, 2004). O Brasil, desafiando interesses de vários segmentos, tem empreendido importantes esforços para melhorar o acesso aos medicamentos, componente crítico de uma estratégia do setor de saúde, tentando, dessa forma, promover a equidade na saúde da sua população (Carvalho et al., 2006).

No Brasil, as pesquisas de biodisponibilidade e bioequivalência começaram na década de 90, graças ao pioneirismo do Dr. Gilberto de Nucci, por meio da implantação da Unidade de Farmacologia Clínica Miguel Servet no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Campinas-SP. Muitos dos profissionais que atuam na área de farmacologia clínica no Brasil realizaram parte de sua formação acadêmica sob orientação do prof. Dr. Gilberto de Nucci (Anvisa, 2002).

1.3.2- Biodisponibilidade

Muitos medicamentos são produzidos e comercializados por mais de uma indústria farmacêutica. O método de fabricação e a formulação final podem afetar a concentração do fármaco que atinge o local de ação e, conseqüentemente, oferecer riscos

das doses se tornarem subterapêuticas ou tóxicas (Zanine e Oga, 1994). A fim de avaliar a segurança e eficácia destes medicamentos, são propostos os estudos de biodisponibilidade. Estes são indicados também para avaliação de medicamentos com novos princípios ativos e para aqueles com novas formulações, forma farmacêutica ou química que contenham substâncias ativas (ou porção terapêutica) já aprovados para comercialização.

Os estudos de biodisponibilidade iniciaram-se a partir de 1945, com a primeira publicação do conceito de disponibilidade biológica. O desenvolvimento de novas técnicas analíticas, durante a década de 1960, possibilitou o desenvolvimento de métodos sensíveis o suficiente para permitir a quantificação de drogas ou metabólitos, inicialmente na urina, e posteriormente no plasma, o que possibilitou a avaliação e comparação de biodisponibilidade de diferentes formulações em voluntários, bem como a demonstração de que diferenças significativas entre estas podem ocorrer.

Desde então, o termo biodisponibilidade contou com várias definições. As seguintes podem ser citadas:

Segundo o Food and Drug Administration (FDA, 2003):

Biodisponibilidade é a velocidade e a extensão com que o princípio ativo, ou porção terapêutica, é absorvido a partir de um produto farmacêutico e se torna disponível no local de ação. Para produtos farmacêuticos que não se pretende atingir a corrente sanguínea, a biodisponibilidade pode ser avaliada por medidas que reflitam a velocidade e a extensão ao qual o princípio ativo ou porção terapêutica torne-se disponível no local de ação.

Além disso, os estudos de biodisponibilidade fornecem outras informações farmacocinéticas úteis relacionadas à distribuição, eliminação, efeitos dos nutrientes sobre a absorção do fármaco, proporcionalidade da dose, linearidade na farmacocinética da porção terapêutica e se, necessário, da porção não terapêutica, além de informações anteriores a entrada do fármaco na circulação sistêmica, tais como, permeabilidade e influência das enzimas pré-sistêmicas e/ou transportadores (por ex.: p-glicoproteína) (FDA, 2003).

Segundo a nota do guia da União Européia sobre investigação de biodisponibilidade e bioequivalência (EMEA, 1998):

Biodisponibilidade é a velocidade e a extensão na qual a substância ativa ou porção terapêutica é absorvida a partir de uma forma farmacêutica e se torna disponível no local de ação. Já que na maioria dos casos pretende-se que as substâncias exibam efeitos terapêuticos sistêmicos, uma definição mais prática pode ser dada, levando em consideração o intercâmbio da substância entre a circulação geral e o local de ação: biodisponibilidade é a extensão e a velocidade com que uma substância ou porção terapêutica é liberada a partir de uma forma farmacêutica para a circulação geral.

Deve-se distinguir biodisponibilidade “absoluta”, que é a comparação de uma dada forma farmacêutica com a administração intravenosa (100%), e a biodisponibilidade “relativa”, que é a comparação de duas formulações farmacêuticas diferentes, ambas diferentes da via intravenosa.

1.3.3- Bioequivalência

Segundo o FDA (FDA, 2003), bioequivalência é definida como:

a ausência de uma diferença significativa na velocidade e extensão em que o princípio ativo ou porção ativa, em alternativas ou equivalentes farmacêuticos, torna-se disponível no local de ação do fármaco, quando administrado na mesma dose molar, sob condições semelhantes num estudo apropriadamente desenhado.

A nota do guia da União Européia sobre estudos de biodisponibilidade e bioequivalência (EMEA, 1998), dá a seguinte definição de bioequivalência:

Dois produtos medicinais são bioequivalentes se são alternativas ou equivalentes farmacêuticos e se suas biodisponibilidades (velocidade e extensão de absorção), após administração na mesma dose molar, são semelhantes num grau em que seus efeitos com relação à eficácia e segurança sejam essencialmente os mesmos.

Alternativas farmacêuticas são produtos medicinais que contêm a mesma porção terapêutica, mas que diferem na forma química desta ou na forma farmacêutica. A “porção terapêutica” pode ser usada na forma de sais, ésteres, etc (EMEA, 1998). Já equivalentes farmacêuticos são produtos medicinais com o mesmo princípio ativo (mesmo sal, éster ou forma química), concentração, forma farmacêutica e via de administração. Devem apresentar padrões idênticos (potência, qualidade, pureza e identificação), mas podem diferenciar em características, tais como: cor, sabor, forma, empacotamento, conservantes, validade e rotulagem (dentro de certos limites) (Shargel e Yu, 1999). A equivalência farmacêutica não implica, necessariamente, em bioequivalência já que diferenças nos excipientes e/ou processo de fabricação podem levar a uma dissolução e/ou absorção mais rápida ou mais lenta.

Equivalentes terapêuticos são produtos medicinais que contêm a mesma substância ativa ou “porção terapêutica” e que, clinicamente, exibe a mesma eficácia e segurança do produto referência, com eficácia e segurança já estabelecidas.

Na prática, a demonstração de bioequivalência é, geralmente, o método mais apropriado para constatação de equivalência terapêutica entre produtos medicinais que sejam alternativas ou equivalentes farmacêuticos, contanto que eles contenham excipientes reconhecidos como não influentes na segurança e eficácia. Em alguns casos, em que velocidades diferentes de absorção são observadas, os produtos - então considerados não bioequivalentes - podem ser julgados terapeuticamente equivalentes, desde que as diferenças na velocidade de absorção não sejam de relevância terapêutica (EMEA, 1998).

1.3.4- Critérios de avaliação de bioequivalência

Quando um medicamento contendo um único fármaco é administrado intravenosamente, ele atinge de modo quase imediato o máximo de concentração, sendo progressivamente eliminado.

Todavia, após a administração oral de um fármaco, ocorre um aumento progressivo de sua concentração sanguínea, ao mesmo tempo em que se inicia a sua eliminação. Se após a administração oral forem coletadas amostras de sangue para determinação da concentração em tempos diferentes, obter-se-á uma curva de nível sanguíneo (sérico ou plasmático) do fármaco em função do tempo.

A concentração da droga no sangue, em determinado momento, é função das seguintes constantes farmacocinéticas: absorção, distribuição, biotransformação e excreção. Portanto, o nível sanguíneo reflete a dinâmica da droga nos diversos compartimentos orgânicos. Assim, numa primeira fase em que ocorre ascensão do nível sanguíneo, há predomínio da absorção do fármaco, enquanto que na fase de eliminação estão predominando a distribuição, a biotransformação e a excreção.

Na curva de nível sanguíneo existem três parâmetros considerados de maior importância para o estudo comparativo de bioequivalência de duas formulações que contenham o mesmo princípio ativo:

- * pico de concentração máxima ($C_{máx}$);
- * tempo em que ocorre o pico de concentração máxima ($T_{máx}$);
- * área sob a curva de nível sanguíneo em função do tempo (ASC).

O pico de concentração máxima ($C_{máx}$) representa a concentração mais elevada alcançada dentro do compartimento intravascular após administração do fármaco. O tempo em que ocorre o pico de concentração máxima ($T_{máx}$) está intimamente relacionado com a velocidade de absorção. Para que o fármaco seja terapeuticamente eficiente, é importante que atinja, por tempo suficiente, o nível plasmático efetivo, que é o nível mínimo para que atue eficientemente. E, para evitar riscos de reações tóxicas, não deve ultrapassar a concentração máxima tolerada (Zanine e Oga, 1994).

A área sob a curva das concentrações sanguíneas em função do tempo (ASC) reflete a quantidade de medicamento que alcança a circulação sistêmica. Alterações no volume aparente de distribuição não influenciam o valor da ASC. A ASC é necessária para estimar outros parâmetros cinéticos, tais como a fração da dose do medicamento que alcança a circulação sistêmica, o volume aparente de distribuição, o “clearance” e o fluxo sanguíneo hepático. Emprega-se, também, para avaliar se a cinética do fármaco é de primeira ordem (Naranjo et al., 1992).

O método estatístico para avaliar a bioequivalência é baseado no intervalo de confiança de 90% para a razão das médias (teste/referência) para os parâmetros considerados, que deve estar dentro do intervalo de variação de 80-125%. Este método é equivalente ao procedimento do teste t bicaudal com a hipótese nula da bioinequivalência no nível de significância de 5%. A análise de estatística (ANOVA) deve levar em consideração as fontes de variação que podem ser responsáveis por algum efeito sobre a resposta.

A validade das hipóteses subjacentes à análise estatística (p.ex. aditividade, normalidade) pode, freqüentemente, ser melhorada pela transformação dos dados antes da análise, preferivelmente usando a transformação logarítmica. Isto é sugerido para os parâmetros farmacocinéticos que derivam de medidas de concentração, p.ex. ASC, $C_{m\acute{a}x}$, etc. Os métodos estatísticos para $T_{m\acute{a}x}$ devem ser não paramétricos.

Em casos específicos, como para fármacos altamente variáveis, normalmente para $C_{m\acute{a}x}$, o critério acima pode ser ajustado para um intervalo maior que 80-125%, de 70-143% (Marzo e Balant, 1995; EMEA, 1998).

Outros parâmetros farmacocinéticos que podem ser avaliados para fornecer informações adicionais (Naranjo et al., 1992):

$T_{1/2}$: O tempo de meia-vida de eliminação indica o tempo necessário para que 50% do fármaco seja eliminado do organismo. Este depende do volume aparente de distribuição e do “clearance”. A vida média tem várias aplicações práticas:

- * para calcular o intervalo entre as doses e determinar a fração que deve ser administrada em cada intervalo;
- * para prever o tempo necessário para alcançar o estado de equilíbrio;
- * para prever o tempo necessário para eliminar totalmente o fármaco do organismo, e
- * para calcular o fator de acumulação de um fármaco depois da administração de doses múltiplas.

K_e : é a constante de eliminação, que indica a fração de fármaco eliminado por unidade de tempo e reflete a somatória das constantes de velocidade de excreção (renal, hepática, etc).

1.4- Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo método analítico para a quantificação do 5-MNIS, explorando a nova possibilidade que a fonte APPI abriu para que um composto pequeno e frágil como este fosse analisado por CLAE-EM/EM.

O objetivo secundário foi comparar a biodisponibilidade de duas formulações de 5-MNIS - comprimidos de 40 mg dos Laboratórios Biosintética (teste) e Monocordil[®] dos Laboratórios Baldacci (referência) - e avaliar a bioequivalência em voluntários sadios de ambos os sexos, após administração oral de dose única de 40 mg. Para tanto, foi utilizado o método desenvolvido para quantificar o 5-MNIS nas amostras deste estudo.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Desenvolvimento do método analítico

2.1.1- Reagentes e outros

O 5-mononitrato de isossorbida foi obtido dos Laboratórios Biosintética Ltda. (lote n.º 01116848, validade: 10/2006, São Paulo, SP, Brasil). Acetonitrila (grau HPLC), metanol (grau HPLC), acetona (grau HPLC), ácido acético (grau de análise) e acetato de amônio (grau de análise) foram adquiridos da J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA) e hexano (grau de análise) e dietil éter (grau de análise) da Mallinckdrodt (USA). Água ultrapura foi obtida do sistema Gradient Millipore (São Paulo, Brasil).

As amostras de plasma branco (3 de plasma normal, 1 lipêmica e 1 hemolizada) foram coletadas de voluntários sadios que não faziam uso de qualquer fármaco e fornecidas pelo Hemocentro de São Paulo. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue tratado com heparina sódica como anticoagulante. A mistura de plasma foi preparada e estocada a aproximadamente - 70°C.

2.1.2- Padrões de calibração e controles de qualidade

A solução estoque de 1 mg.mL⁻¹ de 5-MNIS foi preparada em acetonitrila/água 1:1. Todas as soluções foram estocadas a 4°C. A exatidão nas pesagens foi de cerca de 0,01 mg.

A curva de calibração para 5-MNIS foi preparada em plasma humano branco contaminado com concentrações de 20, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 ng.mL⁻¹ e realizadas em duplicata em cada lote.

As amostras do controle de qualidade foram preparadas no plasma branco e definidas da seguinte maneira:

* Controle de qualidade baixo (CQA, concentração com cerca de 3 x LOQ) = 60 ng.mL⁻¹;

* Controle de qualidade médio (CQB, concentração entre a baixa e a alta) = 300 ng.mL⁻¹;

- * Controle de qualidade alto (CCQ, concentração entre 75% a 90% do ponto mais alto da curva de calibração) = 1800 ng.mL^{-1} ;
- * Controle de qualidade de diluição (CQD, concentração mais alta que o limite superior da curva de calibração, usada só no caso de necessidade de diluir uma amostra por esta ultrapassar o limite superior da curva) = 3600 ng.mL^{-1} .

2.1.3- Método analítico

2.1.3.1- Preparação da amostra

O 5-MNIS foi extraído das amostras de plasma humano através de um processo de extração líquido-líquido. Este processo de extração foi utilizado tanto para as amostras de concentrações desconhecidas, como também para as das curvas padrão e dos controles de qualidade.

Alíquotas de plasma humano (0,5 mL), sem a adição de padrão interno, foram agitadas em vórtex por 20 s e mantidas em repouso em temperatura ambiente por 2 min. Após adição de 4 mL de dietil éter:hexano (80:20, v/v), os tubos foram agitados em vórtex por mais 40 s (capela) e levados ao freezer por -70°C por 15 min, para congelar a fase aquosa. A camada superior foi transferida para tubos limpos e o solvente foi evaporado sob fluxo de Nitrogênio, a 40°C (capela). O resíduo seco foi ressuspensão com 200 μL de acetonitrila:água (50:50, v/v) e agitado em vórtex por 15 s. As amostras foram transferidas para pequenos tubos de vidros, tampados e colocados num injetor automático de amostra.

2.1.3.2- Condições cromatográficas e de espectrometria de massa

O sistema CLAE (LC10AD, Shimadzu, Japan) consistiu de uma bomba e um sistema de injeção de amostra automático. Foi utilizada uma coluna analítica Gênesis C₈ (100 mm x 2.1 mm de diâmetro interno, com partículas de 4 μm) e a fase móvel foi uma mistura de acetonitrila:água:acetona (80:15:5, v/v/v, com acetato de amônio 20 mM e

ácido acético 0,1%) num fluxo de 350 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$. Pressão de 60 Bar e “void time” de 0,8 min. O tempo total de corrida foi 2.0 min. A coluna foi operada à temperatura ambiente. A temperatura do injetor de amostra automático foi mantida a 8.0°C e o volume de injeção foi de 40 μL .

A espectrometria de massa foi realizada num espectrômetro de massa com quadrupolo de triplo estágio Sciex API 3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipado com uma fonte APPI, operando em modo negativo (PS-). A temperatura da fonte foi mantida em 400°C e a voltagem de fotoionização do capilar em 1.2 kV. O gás de colisão foi o nitrogênio. Os dados foram adquiridos pelo programa Analyst[®] (v. 1.4, Applied Biosystems).

As condições de MRM (monitoração de reações múltiplas) no APPI, em modo negativo para o 5-MNIS, foram:

Transição (m/z): 249.92/189.9;

Temperatura da fonte: 400°C;

IS (potencial da fonte de ionização): - 1200 V;

DP * (potencial de desagregação): - 80 V;

FP (potencial de focalização): - 160 V;

CE (energia de colisão): - 26 e V;

CXP (potencial de saída de colisão): - 21 V.

As curvas de calibração para o analito foram construídas usando a área do pico do 5-MNIS via uma regressão linear dos mínimos quadrados (com peso $1/x^2$). As áreas dos picos foram interpoladas a partir da curva de calibração para fornecer as concentrações do 5-MNIS. Estes cálculos foram feitos no programa Analyst 1.4.

2.1.4- Validação pré-estudo

2.1.4.1- Teste de sobreposição (“carry-over”)

O sistema cromatográfico foi testado para verificar a possibilidade de “carry-over”. O teste foi realizado, injetando-se na seguinte sequência:

- 1) dois extratos de amostras branco;
- 2) duas amostras do padrão mais alto;
- 3) dois extratos de amostras branco.

Os passos 2 e 3 foram repetidos por, pelo menos, mais três vezes e os cromatogramas foram avaliados.

2.1.4.2- Especificidade / Seletividade

Especificidade é a capacidade para se avaliar de modo inequívoco o analito na presença de compostos endógenos. Enquanto, seletividade inclui a capacidade de separar o analito dos produtos de degradação, metabólitos e fármacos co-administrados (Bressolle et al., 1996).

O cromatograma do plasma contaminado com uma concentração bem baixa do 5-MNIS (LOQ) foi comparada com amostras do branco de cinco diferentes conjuntos de plasma, incluindo um hiperlipêmico e outro hemolizado, para avaliar a ocorrência de interferentes no tempo de retenção do analito, usando o mesmo processo de extração e condições analíticas descritas.

2.1.4.3- Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) mede a capacidade do método em detectar pequenas concentrações (Bressolle et al., 1996). O LOQ foi definido, levando em consideração a sensibilidade do método, a precisão e a exatidão. Para avaliar a precisão e a exatidão, amostras de controle de qualidade foram incluídas no procedimento de validação.

Embora a sensibilidade fosse suficiente para quantificar valores mais baixos, o importante foi garantir um LOQ próximo a 1 a 3% do valor antecipado de C_{max} .

As condições para aprovação do valor final do LOQ foram:

- 1) nenhuma interferência observada nos brancos no tempo de retenção do analito ou, tendo interferência, que a resposta do LOQ fosse sete vezes maior que qualquer interferência observada nos brancos, no tempo de retenção do analito;
- 2) que o pico do analito fosse identificável, com uma exatidão entre 80 e 120% em relação à concentração padrão nominal;
- 3) precisão e exatidão de 20%, calculada entre as duplicatas, quando ambas aprovadas;
- 4) o controle de qualidade com a mesma concentração do LOQ, com a precisão e exatidão mencionadas.

2.1.4.4- Linearidade

O desenvolvimento da curva de calibração seguiu os seguintes critérios:

- 1) desvio < 20% da concentração nominal para o LOQ, em pelo menos uma das duplicatas;
- 2) desvio < 15% para os demais padrões, em pelo menos uma das duplicatas;
- 3) pelo menos 75% dos padrões não-zero de cada concentração nominal concordando com os itens 1 e 2;
- 4) coeficiente de correlação (r) da curva de calibração ≥ 0.98 .

2.1.4.5- Precisão e exatidão

Na validação pré-estudo, foram avaliadas a precisão e a exatidão do método desenvolvido, intra- (mesmo dia de análise) e interlote (dias diferentes de análise).

Para cada concentração, o valor aceitável da precisão foi de até 15% e da exatidão de 85 a 115%. Os testes foram feitos em lotes contendo:

- 1) curva de calibração em duplicata,
- 2) oito amostras de cada controle de qualidade (CQs). As amostras dos CQs foram preparadas independentemente, ou seja, de diferentes soluções-mãe, de diferentes amostras padrão.

O cálculo da precisão ou coeficiente de variação (CV) de um método analítico é feito pela razão entre o desvio-padrão (DP) e a média aritmética dos resultados obtidos (concentrações do analito), multiplicada por 100.

O cálculo da exatidão é feito pela razão entre a média aritmética e o valor nominal da concentração do analito, multiplicada por 100.

2.1.4.6- Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico, dentro de um limite de variação.

Experimentos preliminares foram conduzidos para avaliar a recuperação com o método de extração descrito acima. A eficiência da extração foi avaliada num lote organizado da seguinte maneira:

- A) curva de calibração diluída em fase móvel para quantificar as amostras de CQ;
- B) cinco amostras de cada CQ diluídas em fase móvel;
- C) cinco amostras de cada CQ em amostras de plasma, previamente extraídas pelo procedimento de extração e depois contaminadas com as concentrações do analito;
- D) cinco amostras de cada CQ em amostras de plasma, extraídas pelo processo de extração.

A porcentagem de recuperação foi calculada como a razão da área do pico resultante da extração do plasma branco (previamente contaminado com concentrações padrões de 5-MNIS, 60, 300 e 1800 ng.mL⁻¹, item D) e a área do pico do plasma branco extraído e posteriormente contaminado com as concentrações de 5-MNIS (item C).

A comparação com o branco extraído e contaminado com o 5-MNIS, após extração, foi feita para eliminar o efeito matriz, mostrando uma recuperação verdadeira. O efeito matriz foi determinado pela razão da média destes valores (item C) pela razão da média das áreas dos picos provenientes de soluções de 5-MNIS, em fase móvel (item B).

A recuperação foi também avaliada em diferentes tipos de amostra de plasma, normal, hemolisado e lipêmico para o CQB.

2.1.4.7- Avaliação da supressão de íon

A supressão do sinal EM (supressão de íons) pode ser causada por contaminantes (p.ex: sais, proteínas, aminoácidos,...) que entram no EM, provenientes do eluato, interferindo com o sinal do analito. Estes contaminantes podem ser produzidos por métodos de extração não específicos, como a descrita em nosso trabalho.

Para avaliar o efeito da supressão de íon sobre o sinal do 5-MNIS no EM/EM, o procedimento de extração descrito foi testado. Uma amostra de plasma humano foi extraída como descrito e o extrato reconstituído foi injetado no sistema CLAE, enquanto uma solução do analito em fase móvel estava sendo infundida. Neste sistema, a supressão de íon seria observada como uma depressão do sinal EM.

2.1.4.8- Estabilidade

Os testes de estabilidade avaliam a estabilidade do analito em plasma humano, sob diversas condições de tempo e temperatura, bem como em solução.

Três amostras de controle de qualidade (60, 300 e 1800 ng.mL⁻¹) em plasma humano foram preparadas e divididas em várias alíquotas para testar a estabilidade:

No auto-injetor: a 8 °C por 24 h (tempo igual ou superior ao de uma corrida analítica, no caso, de 10 h);

Por congelamento-descongelamento: 4 ciclos de congelamento a - 20 °C por 24 horas seguido por descongelamento à temperatura ambiente;

A curto prazo: 8 h à temperatura ambiente (tempo igual ou superior ao necessário para o preparo de amostras para uma corrida analítica);

A longo prazo: duas amostras de controle de qualidade (120 e 1200 ng.mL⁻¹) foram mantidas à temperatura de congelamento por 97 dias (tempo igual ou superior ao período entre o 1º dia de coleta de amostras e o dia da análise da última amostra).

Subseqüentemente, as concentrações de 5-MNIS foram medidas e comparadas com amostras recém-preparadas.

Para avaliar a estabilidade na solução-mãe, soluções do analito foram recém-preparadas e comparadas com soluções preparadas a nove dias (período total de estudo).

Para avaliar a estabilidade das soluções de trabalho, as soluções do analito foram preparadas e estocadas por 24 horas, sendo um grupo estocado na mesma temperatura da solução-mãe (4°C) e outro à temperatura ambiente. Após o período de estoque, ambas foram quantificadas e comparadas.

2.1.5- Validação das corridas analíticas

2.1.5.1- Corrida analítica

Cada lote de análise foi organizado da seguinte maneira:

- 1) injeções com solução de 5-MNIS 60 ng.mL⁻¹ em fase móvel (5 replicatas) no início e no fim de cada lote, para avaliar o desempenho cromatográfico e espectrométrico;

- 2) uma curva de calibração, em duplicata, constituída de amostras branco e padrões não-zero;
- 3) amostras teste (com concentrações desconhecidas) em simplicata;
- 4) controles de qualidade (baixo, médio e alto) a cada 10 amostras teste.

Todas as amostras de um mesmo voluntário foram quantificadas na mesma corrida analítica.

A fim de assegurar a qualidade das quantificações das amostras, os seguintes procedimentos foram realizados para validar cada corrida analítica:

As amostras branco foram examinadas em duplicata para descartar a presença de contaminação.

As condições para aceitação do valor mais baixo da curva de calibração, ou seja, o limite de quantificação - LOQ, foram:

- 1) nenhuma interferência observada nos brancos no tempo de retenção do analito ou, tendo interferência, que a resposta do LOQ fosse duas vezes maior que qualquer interferência observada nos brancos no tempo de retenção do analito e
- 2) que o pico do analito fosse identificável e reprodutível, com precisão e exatidão dentro de 20% em relação à concentração nominal.

A condição para rejeição de cada padrão da curva de calibração, exceto o LOQ, foi que o desvio fosse maior que 15% da concentração nominal do padrão. Qualquer ponto da curva seria descartado, se nenhum valor da duplicata fosse aceito.

As condições para rejeição da curva de calibração foram:

- 1) rejeição de mais que 2 dos 6 pontos da curva, ou
- 2) rejeição da concentração mais alta da curva, ou
- 3) coeficiente de correlação (r) proveniente da regressão linear dos pontos da curva de calibração menor que 0.98.

Outras considerações:

- a) Se em circunstância extrema (se faltar amostra para reanálise) e a curva de calibração fosse rejeitada, a corrida analítica poderia ser feita com base em outra curva de calibração de outra lista, desde que os controles de qualidade fossem checados novamente e aprovados;
- b) A corrida analítica poderia ser parcialmente aceita se o responsável identificasse que os erros foram restritos a alguma parte do fim da lista, causada por um erro durante o processo ou devido ao mal funcionamento do equipamento. Isto deveria ser documentado;
- c) Os valores das amostras desconhecidas também foram considerados na perspectiva farmacocinética para decisões de rejeição parcial e total da corrida analítica.

Valeu-se das seguintes considerações a respeito dos resultados das amostras teste:

- a) O valor da mediana deveria ser usado, quando a análise fosse em replicata das amostras teste; o valor médio deveria ser usado se baseado em considerações farmacológicas.
- b) Se o resultado fosse menor que o LOQ, seria considerado ZERO, mesmo que fosse detectável (tem uma área quantificável e três vezes maior que o ruído do branco). Se maior que o padrão mais alto, deveria ser diluído e analisado novamente.
- c) Se as amostras teste estivessem em duplicata e a diferença entre elas fosse $> 30\%$, dever-se-ia avaliar a rejeição delas. Mesmo que a diferença fosse $< 30\%$, os valores deveriam ser rejeitados se estivessem fora da farmacocinética ou se qualquer outro erro relacionado à extração ou quantificação fosse identificado.
- d) Se o resultado teste fosse rejeitado, far-se-ia uma nova análise. Mas um resultado poderia simplesmente ser rejeitado, sem reanálise, se uma interpolação entre os dados restantes fosse suficiente para estimar os parâmetros farmacocinéticos desejados, especialmente quando a estabilidade do analito fosse o problema. Cuidado especial foi dado aos pontos próximos ao $C_{\max}$.

- e) A reanálise poderia ser feita como anexo da própria lista ou como uma lista em separado. A reanálise deveria ser feita em triplicata, mas se o material não fosse suficiente, faria em simplicata. Faz-se-ia a mediana dos três e descartaria o valor anterior. Se a mediana mostrasse uma diferença menor que 15% do valor original, o valor original seria relatado. Se a diferença fosse entre 15 e 30%, seria relatada a mediana dos quatro valores. Se a diferença fosse maior que 30%, a mediana da reanálise seria relatada.
- f) Critérios para reanálise: erro de injeção, perda da sensibilidade e/ou problemas com EM, perfil CLAE pobre, erro no processamento da amostra, concentração fora da curva de calibração, razão farmacocinética.

2.1.5.2- Validação intralote

Durante o estudo, até o fim da quantificação de todas as amostras, a variabilidade de cada corrida analítica foi monitorada através da avaliação dos seus CQs, que deveriam variar até 15% do valor da concentração nominal de cada CQ; se não, o valor era rejeitado. A corrida analítica também seria rejeitada se mais que 33% dos controles de qualidade fossem rejeitados ou mais que 50% de uma mesma concentração fossem rejeitados.

2.1.5.3- Validação interlote

Durante o estudo, até o fim da quantificação de todas as amostras, a variabilidade entre as corridas analíticas foi monitorada do seguinte modo:

- 1) A média de cada lista de cada um dos CQ que foram aceitos foi calculada;
- 2) Variabilidade interlote (CV%) destes valores deveria ser menor ou igual a 15%;
- 3) O valor médio interlote deveria estar dentro de cerca de 15% do valor da concentração nominal de cada CQ.

2.2- Estudo de bioequivalência

2.2.1- Formulações

O método foi aplicado para avaliar a bioequivalência de duas formulações de comprimidos de 5-MNIS (40 mg) em voluntários sadios:

- 1) Formulação teste (T): Mononitrato de isossorbida dos Laboratórios Biosintética Ltda., Brasil; lote n.º 314/03, data de expiração: agosto/2005.
- 2) Formulação referência (R): Monocordil® dos Laboratórios Baldacci S.A., Brasil; lote n.º ALO1, data de expiração: dezembro/2004.

2.2.2- Seleção dos voluntários e critérios de exclusão e de desligamento

Trinta e um voluntários sadios adultos (14 do sexo feminino e 13 do sexo masculino) participaram do estudo. O grupo feminino com idade entre 20 e 37 anos (média $\pm$ desvio-padrão (DP): 28 ± 5 anos), altura de 151 cm a 179 cm (159 ± 7 cm) e peso entre 47,1 Kg e 69,7 Kg ($57,3 \pm 7,6$). O grupo masculino com idade entre 20 e 45 anos (30 ± 8 anos), altura de 160 cm a 185 cm (171 ± 7 cm) e peso entre 62,1 Kg e 90,0 Kg ($73,5 \pm 8,6$). O índice de massa corpórea foi considerado normal, quando maior ou igual a 19 e menor ou igual a 28, com tolerância de 12% quanto ao limite superior.

A seleção dos voluntários foi realizada por meio de consulta médica, incluindo-se anamnese e exame físico, além de eletrocardiograma, que colaboraram para a confirmação do estado de hígidez. Foi avaliado se os voluntários não apresentavam doenças cardíacas, hepáticas, renais, pulmonares, gastrointestinais, neurológicas, hematológicas e psiquiátricas. Para tanto, realizaram-se os seguintes exames laboratoriais: glicose em jejum, uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina, transaminases oxalacética e pirúvica, colesterol total, triglicérides, ácido úrico, γ GT - gama glutamil transferase, hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos total e diferencial, contagem de plaquetas e de glóbulos vermelhos, sorologia - AIDS, hepatite B e C, teste de gravidez nas mulheres (HCG), urina de rotina e parasitológico de fezes.

Após a avaliação criteriosa, os voluntários, então selecionados, assinaram, após terem suas dúvidas esclarecidas, um termo de consentimento, como consta no Apêndice 1.

A exclusão dos voluntários teve como base a resposta positiva a qualquer um dos seguintes critérios:

1) Problemas relacionados com a droga:

- a) o voluntário tem sabidamente uma hipersensibilidade à droga estudada (mononitrato de isossorbida) ou a compostos quimicamente relacionados; história de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer droga;
- b) história ou presença de doenças hepáticas ou gastrointestinais ou outra condição que interfere com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo da droga;
- c) uso de terapia de manutenção com qualquer droga, excetuando-se anticoncepcionais por via oral.

2) Doenças ou problemas de saúde:

- a) tem história de doença hepática, renal, pulmonar, gastrointestinal, epilética, hematológica ou psiquiátrica; tem hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;
- b) achados eletrocardiográficos não recomendados a critério do investigador para participação no estudo;
- c) os resultados dos exames laboratoriais complementares estão fora dos valores considerados normais, a menos que sejam considerados clinicamente irrelevantes pelo investigador.

3) Hábitos e Dependências:

- a) voluntário é fumante;
- b) voluntário ingere mais do que cinco xícaras de café ou chá por dia;
- c) tem história de abuso de álcool ou drogas.

4) Condições encontradas nos dias/meses que antecedem o estudo:

- a) fez uso de medicação regular dentro das duas semanas que antecederam o início do tratamento e a data de avaliação, ou fez uso de qualquer medicação dentro de uma semana, excetuando-se anticoncepcionais por via oral ou os casos em que, com base na meia-vida do fármaco e/ou metabólitos ativos, possa ser assumida a completa eliminação;
- b) foi internado por qualquer motivo até oito semanas antes do início do primeiro período de tratamento deste estudo;
- c) tratamento dentro dos três meses prévios ao estudo com qualquer droga conhecida de ter um potencial tóxico bem definido nos grandes órgãos;
- d) o voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentro dos três meses que antecederam o início deste estudo;
- e) o voluntário doou ou perdeu 450 mL ou mais de sangue dentro dos três meses que antecederam ao estudo ou doou mais de 1500 mL dentro dos 12 meses precedendo o estudo.

5) Outras condições:

- a) teste positivo de gravidez para as voluntárias mulheres;
- b) o voluntário tem qualquer condição que o impede de participar do estudo pelo julgamento do investigador.

Usaram-se os seguintes critérios para o desligamento dos voluntários:

1) Solicitação por parte do voluntário para se retirar do estudo a qualquer momento:

- a) voluntário não deseja continuar no estudo por razões pessoais (ou mesmo sem razão);
- b) voluntário não deseja continuar no estudo devido aos eventos adversos da droga de estudo (efeitos não desejáveis possivelmente relacionados à droga em estudo);

- c) voluntário não deseja continuar por razões outras que não efeitos adversos por ex. indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo.
- 2) Solicitação do investigador para retirada do voluntário do estudo, pelos seguintes motivos:
- a) não aderência às exigências do protocolo;
 - b) eventos adversos ou sintomas ou sinais de possível toxicidade;
 - c) doença intercorrente requerendo medicação;
 - d) resposta positiva à reavaliação de qualquer um dos critérios de exclusão, no momento da admissão ao primeiro período de tratamento ou em ocasião subsequente;
 - e) qualquer outra condição que, a juízo do investigador, seja do interesse para manutenção da saúde do voluntário.

2.2.3- Protocolo clínico

Os voluntários selecionados, como mencionado acima, foram submetidos a um estudo aberto, randomizado, cruzado com 2 tratamentos, 2 períodos (2 seqüências), nos quais os voluntários receberam, em cada período distinto, a formulação teste ou a formulação referência, havendo por conseguinte dois braços de tratamento. As formulações foram administradas em dose única por via oral (um comprimido de 40 mg de mononitrato de isossorbida com 200 mL de água, de acordo com Tabela de randomização - Apêndice 2) seguidas de coletas de sangue até 24 horas, sendo cada período de internação de aproximadamente 37 horas. Considerando-se que a meia-vida da isossorbida é de cerca de cinco horas, o intervalo entre as internações foi de sete dias.

Durante cada período, após a internação dos voluntários por volta das 17 horas do dia anterior à administração do medicamento, na Unidade de Farmacologia Clínica Miguel Servet - Unicamp, foi servido um jantar leve e depois uma ceia, desde que não

houvesse interferência com o horário programado para o jejum, desde oito horas antes até duas horas após a ingestão da medicação, prevista para a manhã seguinte.

Com relação às refeições, os voluntários receberam o desjejum 2 horas após a administração; o almoço, 4 horas; o lanche da tarde, 7,5 horas; o jantar, 11 horas e a ceia, 15 horas após. No dia seguinte à administração, após a coleta de 24 horas, foi servido um desjejum e, após avaliação médica (se necessária), os voluntários foram dispensados. Todas as refeições foram padronizadas (Apêndice 3).

Durante o período de internação, não foi permitido consumo de outros alimentos além da dieta padronizada, nem o consumo de álcool e cigarro. Líquidos foram permitidos *ad libitum* após almoço, exceto aqueles contendo cafeína e xantina, tais como chá, café e cola. O uso de qualquer medicação foi evitada durante o estudo, no entanto, quando não possível, esta foi relatada.

Os voluntários foram acompanhados por uma equipe de saúde, a fim de assegurar que possíveis eventos adversos fossem detectados e tratados devidamente. Sinais vitais (pressão arterial, frequência do pulso e temperatura) foram aferidos durante a internação (antes e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 24 horas após a administração da medicação). Após as internações, os voluntários foram reavaliados clinicamente e repetiu-se a bateria de exames.

O protocolo clínico atendeu a todos os dispositivos da Resolução 196/96 (Anvisa, 1996) e complementares e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp (Anexo 1).

2.2.4- Coleta das amostras

O ensaio teve início com uma coleta de sangue de 10 mL para controle individual, curvas padrões, após pelo menos oito horas de jejum, apenas na primeira internação. Seguiu-se, então, a coleta de 22 amostras de 4 mL, em cada período, de acordo com a programação que se segue, para uso na quantificação de mononitrato de isossorbida.

Amostra pré-administração: imediatamente antes (dentro de 1 hora) da administração da medicação.

Amostras pós-administração: 10 ; 20 ; 30 e 40 min e 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 10 ; 12 ; 14 ; 16 ; 18 e 24 horas após a administração da medicação.

Um total de aproximadamente 190 mL de sangue foi coletado durante os dois períodos do estudo, incluindo o volume coletado para os exames pré- e pós-estudo. A coleta das amostras foi feita através de cateter heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário. Após a coleta de cada amostra, o cateter foi lavado com 1 mL de solução de heparina sódica (5 UI/mL).

As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, durante 10 minutos, o plasma (1,5 mL) foi removido e estocado a -20°C até ser analisado.

2.2.5- Análise estatística e farmacocinética

A concentração sérica máxima ($C_{\text{máx}}$) e o tempo em que esta ocorreu ($T_{\text{máx}}$) foram obtidos pela curva da concentração da droga *versus* tempo. As áreas sob a curva da concentração *versus* tempo (ASC) foram calculadas, usando o método log-linear trapezoidal, exceto a $\text{ASC}_{0-24\text{h}}$ (de 0 a 24 horas), que foi calculada usando o método trapezoidal linear. A extrapolação destas áreas ao infinito ($\text{ASC}_{0-\infty}$) foi feita adicionando-se ao cálculo da ASC_{0-t} (do tempo 0, zero, ao tempo da última concentração acima do Limite de Quantificação-LOQ) o valor da razão entre a última concentração quantificável e a constante de eliminação (C_t/K_e). A constante de eliminação de primeira ordem (K_e) foi estimada pela inclinação da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados do tempo x logaritmo da concentração. A meia-vida ($T_{1/2}$) foi derivada a partir desta constante de eliminação ($\ln 2/K_e$).

As análises estatísticas foram conduzidas após transformação logarítmica baseada em modelo aditivo para todos os valores de ASC e $C_{\text{máx}}$.

$T_{1/2}$ e K_e não foram avaliados estatisticamente.

Foi empregada análise de variância apropriada para o modelo de dois períodos cruzados, sob os dados de ASC e $C_{\max}$ transformados logaritmicamente, considerando em seu modelo os efeitos de seqüência, voluntário dentro da seqüência, tratamento e período.

A existência de efeito residual foi verificada com base nos testes de seqüência da ANOVA, utilizando-se como parâmetro o “P_value” obtido com base na “F_stat” do efeito de seqüência (*Sequence Hypothesis of model effects*).

Foram calculados os pontos paramétricos e estimativas dos intervalos da razão T/R (formulação "teste" / formulação "referência") ASC e $C_{\max}$. A biodisponibilidade relativa da formulação Teste *versus* Referência foi avaliada pelas razões das médias geométricas (pontos estimados). O intervalo de confiança de 90% serviu como estimativa de intervalo e foi determinado por análises paramétricas (dois testes t unicaudais - $p=0.05$). Para o $T_{\max}$ foi realizado teste não paramétrico (Hauschke et al., 1992) para as diferenças individuais (T - R), com o cálculo do ponto estimado e intervalo de confiança de 90% (IC 90%).

As formulações são consideradas com biodisponibilidade equivalente se o intervalo de confiança (IC) de 90% da média geométrica da ASC (no que diz respeito à extensão da absorção) e do $C_{\max}$ (no que diz respeito à velocidade de absorção) estiver dentro do intervalo de 80-125% da média geométrica da formulação referência.

No que se refere aos diferentes parâmetros de ASC, para efeito de decisão de bioequivalência, a análise considera como variável alvo a ASC_{0-t} , desde que a parte avaliada seja superior a 80% da $ASC_{0-\infty}$ em pelo menos 90% dos voluntários. Caso contrário, é dada preferência à $ASC_{0-\infty}$ para todos os voluntários, desde que a parte extrapolada da área total possa ser estimada com suficiente exatidão. O uso de um dos outros parâmetros de ASC pode ser empregado, desde que devidamente justificado. A escolha de $ASC_{0-\infty}$ também deve ser justificada.

A análise farmacocinética foi realizada com os seguintes programas: Microsoft Excel Version 7.0; WinNonLin Professional Network Edition, Versão 1.5; e Graph Pad Prism Version 3.02 e Bioequivalence Program for Two-Period Crossover Studies de Herman P. Wijnand, versão 3.4.

3- RESULTADOS

Tabela 12- Exemplo de validação intralote

Lote									
6103LAD01									
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CCQ (1800 ng/mL)		
	Concentração	Desvio (%)	Aprovado?	Concentração	Desvio (%)	Aprovado?	Concentração	Desvio (%)	Aprovado?
	44,4	-26,0	Não	291	-3,0	Sim	1770	-1,7	Sim
	52,7	-12,2	Sim	276	-8,0	Sim	1930	7,2	Sim
	51,3	-14,5	Sim	265	-11,7	Sim	1350	-25,0	Não
	38,9	-35,2	Não	231	-23,0	Não	1680	-6,7	Sim
Média	52			277			1790		
CV (%)	12,3			9,2			13,7		
Exatidão (%)	86,7			92,3			99,4		

Tabela 13- Dados da validação interlote

Lote	CQA (60 ng/mL)				CQB (300 ng/mL)				CCQ (1800 ng/mL)				CQA, B e C		
	Média (ng/mL)	# CQ	Σ CQ	% CQ	Média (ng/mL)	# CQ	Σ CQ	% CQ	Média (ng/mL)	# CQ	Σ CQ	% CQ	# CQ	Σ CQ	% CQ
6103L															
AD01	52,0	2	4	50	277	3	4	75	1790	3	4	75	8	12	67
AD02	54,2	2	3	67	297	3	3	100	1720	2	3	67	7	9	78
AD03	63,9	3	4	75	326	2	4	50	1840	4	4	100	9	12	75
AD04	54,3	3	4	75	272	3	4	75	1740	3	4	75	9	12	75
AD05	61,6	2	3	67	314	2	3	67	1780	2	3	67	6	9	67
AD06	59,7	4	4	100	318	2	4	50	1810	4	4	100	10	12	83
AD07	58,6	3	4	75	335	3	4	75	1820	3	4	75	9	12	75
AD08RJ	56,9	3	4	75	281	3	4	75	1900	2	4	50	8	12	67
AD09	57,2	4	4	100	308	2	4	50	1920	4	4	100	10	12	83
AD10	55,5	3	4	75	326	3	4	75	1770	3	4	75	9	12	75
AD11RJ	57,1	3	3	100	314	2	3	67	1740	2	3	67	7	9	78
AD12	62,0	2	4	50	310	3	4	75	1720	3	4	75	8	12	67
AD13	56,3	4	5	80	271	3	5	60	1760	4	5	80	11	15	73
RE01	58,8	2	3	67	321	2	3	67	2000	2	3	67	6	9	67
RE02	59,6	1	2	50	280	2	2	100	1800	2	2	100	5	6	83
Total		41	55	75		38	55	69		43	55	78	122	165	74
Média geral (ng/mL)	57,8				303				1810						
CV (%)		5,6				7,2				4,4					
Exatidão (%)		96,4				101,1				100,4					

#CQ: número de CQs aprovados em cada lote; Σ CQ: número total de CQs de cada lote; % CQ: valor percentual dos CQs aprovados

Tabela 3- Dados de validação intralote e interlote para o 5-MNIS

Controle de qualidade	CQA			CQB			CCQ			CQD		
	(60 ng/mL)			(300 ng/mL)			(1800 ng/mL)			(3600 ng/mL)		
Lote	VA02	VA03	VA04	VA02	VA03	VA04	VA02	VA03	VA04	VA02	VA03	VA04
Concentração (ng/mL)	48,3	45,3	56,4	283	256	292	1650	1620	1730	3140	3360	3020
	52,6	52,2	69,8	292	270	298	1660	1600	1460	3280	2900	3100
	54,9	53,6	60,5	291	272	325	1610	1560	1760	3100	2900	3200
	55,8	51,9	56,2	283	265	298	1700	1640	1920	3180	2920	3200
	63,2	54,9	65,2	286	261	309	1470	1480	1590	3140	3160	3140
	59,3	59,2	62	288	269	307	1390	1420	1560	3300	3080	3280
	57,5	53,8	64,8	278	260	293	1500	1380	1530	3220	3080	3140
	57,6	51,5	59,6	247	259	291	1640	1570	1920	3260	3120	3180
Média intra-lote (ng/mL)	56,2	52,8	61,8	281	264	302	1580	1530	1680	3200	3060	3160
Precisão intralote (CV %)	7,9	7,4	7,5	5,2	2,2	3,8	7,0	6,3	10,5	2,3	5,2	2,5
Exatidão intralote (%)	93,6	88,0	103,0	93,7	88,0	100,5	87,6	85,2	93,5	89,0	85,1	87,7
Média inter-lote (ng/mL)	56,9			282			1600			3140		
Precisão interlote (CV %)	9,9			6,7			8,9			3,8		
Exatidão interlote (%)	94,9			94,1			88,8			87,3		

Tabela 4- Dados de validação do processo de reinjeção para o 5-MNIS

Lote	VA04							
Concentração nominal	LOQ		CQA		CQB		CCQ	
	(20 ng/mL)		(60 ng/mL)		(300 ng/mL)		(1800 ng/mL)	
	Original	Reinjeção	Original	Reinjeção	Original	Reinjeção	Original	Reinjeção
	19,5	19,8	48,3	42,5	283	283	1650	1790
	17,6	19,2	52,6	54,6	292	292	1660	1770
	21,2	19,6	54,9	51,9	291	302	1610	1690
	17,5	19,2	55,8	59,2	283	295	1700	1810
	19,9	22,2	63,2	57,5	286	293	1470	1530
	21,3	20	59,3	56,9	288	299	1390	1510
	22,6	22,2	57,5	54,9	278	289	1500	1570
	19,1	21,3	57,6	51,3	247	254	1640	1790
Média (ng/mL)	19,8	20,4	56,2	53,6	281	288	1580	1680
Variação (%)	3,0		-4,5		2,6		6,7	

Tabela 5- Valores médios da recuperação do 5-MNIS

Replicata	CQA			CQB			CCQ		
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 1	Pool 2	Pool 3
1	62,9	62,0	55,9	60,9	61,7	54,0	71,9	57,1	52,4
2	77,6	63,1	63,1	62,9	66,0	60,3	74,5	59,8	50,0
3	61,3	59,1	55,7	61,7	64,4	56,6	79,3	55,2	48,2
4	63,5	64,2	59,6	64,9	64,8	54,7	82,1	55,4	51,5
5	57,3	63,1	57,0	63,7	67,2	58,1	74,6	46,6	50,6
média	64,5	62,3	58,2	62,8	64,8	56,7	76,5	54,8	50,5
CV	11,9	3,1	5,3	2,6	3,2	4,5	5,4	9,0	3,1

3.1- Desenvolvimento do método analítico

3.1.1- Validação pré-estudo

A quantificação do 5-MNIS foi realizada com o método desenvolvido por CLAE-EM-EM, com ionização por fotoionização em pressão atmosférica (APPI), uma vez que apresentou os melhores resultados comparada aos métodos de ionização por eletronebulização (ESI) e com a ionização química em pressão atmosférica (APCI). A Figura 2 mostra o espectro de massa do 5-MNIS com estes três modos de ionização. A formação do íon $[M + \text{acetato}]^-$ de m/z 249.9 foi abundante na fotoionização (Figura 2A), foi observado na ionização química (APCI), mas numa baixa abundância (Figura 2C), e não ocorreu na ionização por eletrospray (ESI) (Figura 2B).

O método CLAE-EM-EM, com ionização por fotoionização em pressão atmosférica (APPI), foi completamente validado como se segue. A validação pré-teste apresentou, de modo geral, uma precisão menor que 10%, inclusive para o LOQ, indicando uma excelente reprodutibilidade dos resultados. Enquanto a exatidão se manteve dentro da faixa de 85 a 115%, inclusive para o LOQ.

3.1.1.1- Teste de sobreposição (“carry-over”)

O sistema cromatográfico foi testado para verificar a possibilidade de “carry-over”, ou seja, da contaminação de amostra para amostra. Como representado na Figura 3, a comparação dos últimos cromatogramas da série demonstra que a injeção do padrão mais alto (Figura 3B) não alterou a linha de base da injeção da amostra branco (Figura 3A) e portanto, que não houve nenhum efeito de “carry-over”.

3.1.1.2- Especificidade

A figura 4 mostra cromatogramas típicos obtidos pelo método descrito. O tempo de retenção do 5-MNIS foi de 1,2 min (Figura 4B). Como se observa no cromatograma do plasma branco (Figura 4A), nenhum pico interferente apareceu no tempo

de retenção do composto de interesse. Também não foi observado nenhum pico interferente no tempo de retenção do 5-MNIS em plasma lipêmico e hemolizado. Portanto o método foi considerado específico e seletivo.

3.1.1.3- Determinação do limite de quantificação

O LOQ, sob as condições experimentais, foi de 20.0 ng/mL de 5-MNIS, e considerado o ponto mais baixo da curva de calibração. Os dados da validação são apresentados na Tabela 1. Já que todos os parâmetros descritos na Tabela 1 estão de acordo com o guia do FDA (menor que 20% para a precisão e entre 80-120% para a exatidão), conclui-se a completa validação do LOQ. A Figura 4B ilustra um cromatograma típico do LOQ.

3.1.1.4- Linearidade

O método de regressão mais simples que descreveu as curvas de calibração do 5-MNIS foi $y = A + Bx$ (com peso $1/x^2$). Três curvas de calibração, preparadas independentemente de diferentes soluções-mãe, foram avaliadas na validação pré-estudo. Embora o método tenha mostrado uma curva de calibração não linear, a metodologia analítica foi completamente validada (Tabela 2). A Figura 5 ilustra uma curva de calibração do 5-MNIS.

3.1.1.5- Precisão e exatidão

A Tabela 3 (pré-validação) mostra os valores intralote e interlote da exatidão e precisão dos controles de qualidade. Já que todos os parâmetros descritos na Tabela 3 estão de acordo com o guia do FDA (menor que 15% para a precisão e entre 85-125% para a exatidão), conclui-se a completa validação dos CQs (CQA, CQB, CCQ), inclusive do processo de diluição (CQD).

O processo de reinjeção foi validado pela injeção de amostras do LOQ e dos CQs. A razão entre a amostra original e a reinjetada foi avaliada. Os resultados são apresentados na Tabela 4, que mostra uma variação menor que 20% para o LOQ e de 15% para os CQs.

3.1.1.6- Recuperação

A Tabela 5 mostra as concentrações médias ($n = 5$) dos testes de recuperação, durante a validação pré-estudo, em diferentes amostras de plasma normal. Para o plasma hemolizado, a recuperação média foi de 60,8% e para o plasma lipêmico foi de 54,0%. Os resultados da recuperação estão de acordo com os parâmetros de reprodutibilidade e consistência e foram adequados ao ensaio.

3.1.1.7- Avaliação da supressão de íon

Não foi observada nenhuma supressão de íon significativa do sinal EM, no tempo em que o analito foi eluído, como mostrado na Figura 6.

3.1.1.8- Estabilidade

Os testes de estabilidade demonstraram que o analito manteve-se inalterado nas amostras de plasma humano, nas seguintes condições de temperatura e tempo:

- à temperatura do auto-injetor (8°C) por 24 horas (Tabela 6), após processamento da amostra;
- por quatro ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento (temperatura ambiente) (Tabela 7);
- a curto prazo: oito horas à temperatura ambiente (Tabela 8);
- a longo prazo: 97 dias à -20°C (Tabela 9);

Os testes de estabilidade demonstraram que o analito, em solução, se manteve inalterado, seguintes condições de temperatura e tempo:

- solução mãe estocada a 4 °C por nove dias (Tabela 10);
- soluções de trabalho à temperatura ambiente, por 24 horas (Tabela 11).

3.1.2- Validação das corridas analíticas

3.1.2.1- Validação intralote

A validação intralote foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos em Materiais e Métodos. A Tabela 12 exemplifica a validação intralote deste estudo (lote 6103LAD01), As demais tabelas de validação intralote são apresentadas no Apêndice 4.

3.1.2.2- Validação interlote

A Tabela 13 mostra a completa validação interlote do presente estudo.

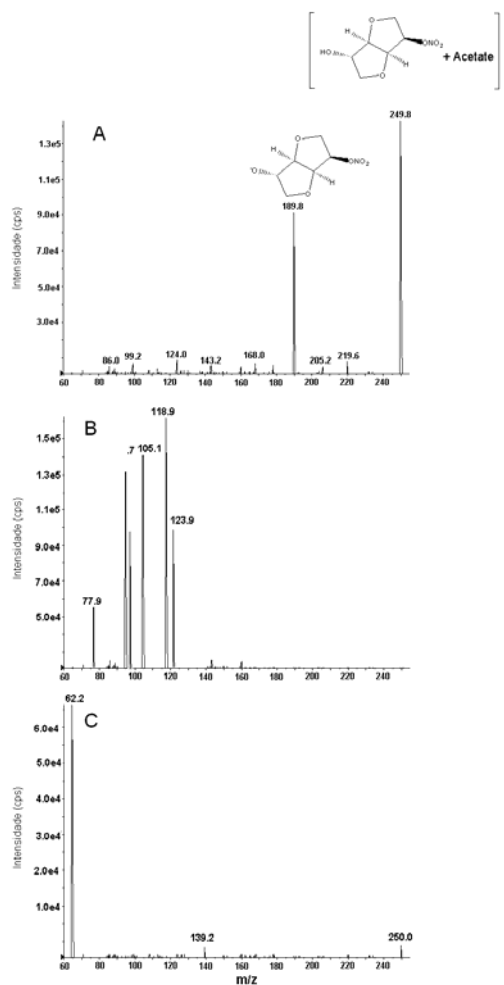


Figura 2- Espectro de massa do 5-MNIS

Figura 2A- usando fonte de ionização por fotospray (APPI), voltagem da fonte de íon = -1200 V, equipamento API 3000, mostrando os íons monitorados que correspondem ao aduto com o ânion acetato $[M + \text{acetato}]^-$ de m/z 249,9 e o íon molecular deprotonado $[M - H]^-$ de m/z 189,9

Figura 2B- usando fonte turbo ionspray (ESI), voltagem da fonte de íon = -4500 V, equipamento API 4000, mostrando que não houve a formação do íon $[M + \text{acetato}]^-$ de m/z 249,9

Figura 2C- usando fonte de ionização química (APCI), agulha de descarga corona = 5 μA , equipamento API 4000, mostrando a formação do íon $[M + \text{acetato}]^-$ de m/z 249,9, mas numa baixa abundância

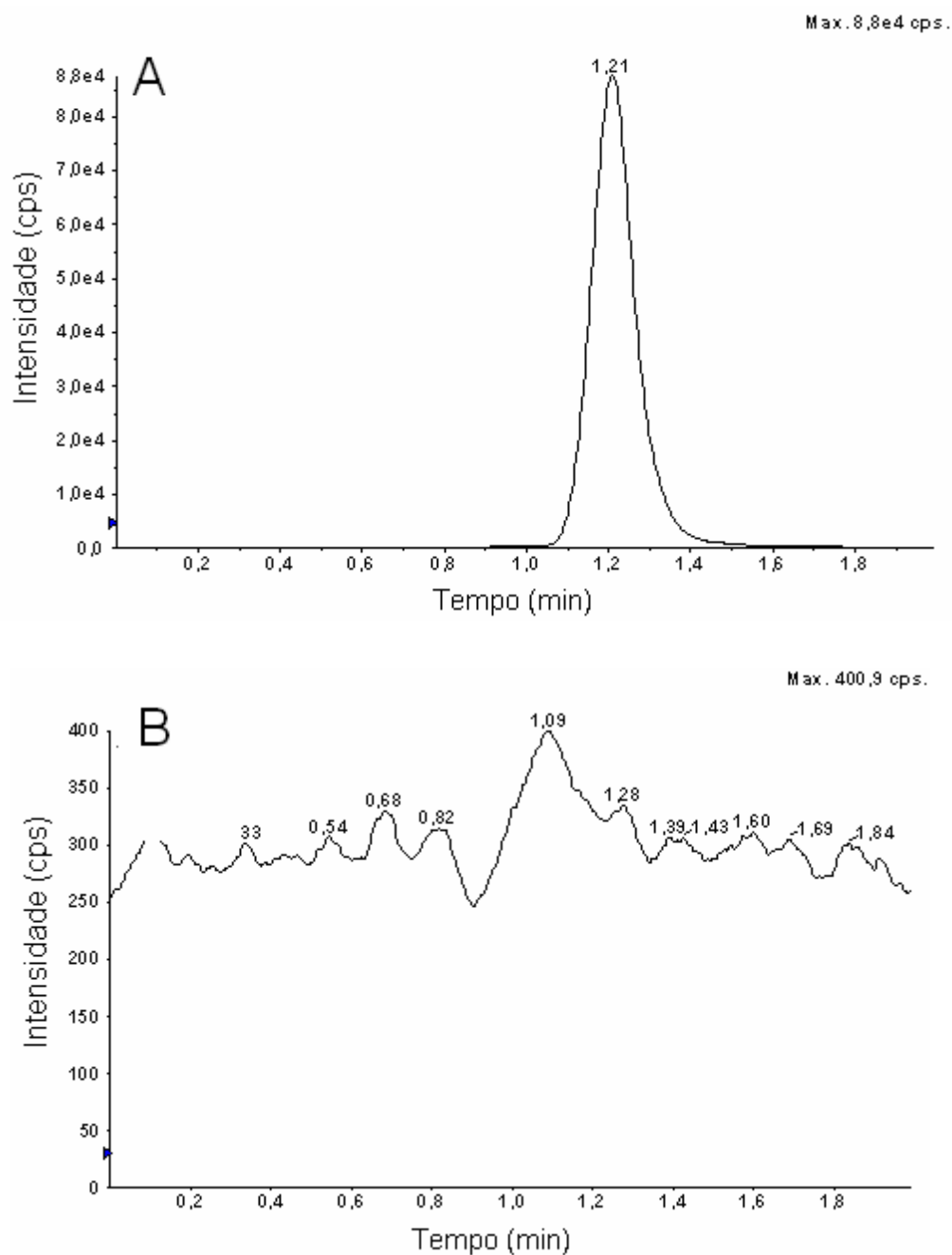


Figura 3- Cromatogramas do teste de “carry-over” mostrando que a injeção do padrão mais alto não alterou a linha de base da injeção da amostra branco

Figura 3A- último cromatograma do extrato da amostra branco da série testada

Figura 3B- último cromatograma da injeção do padrão mais alto da série testada

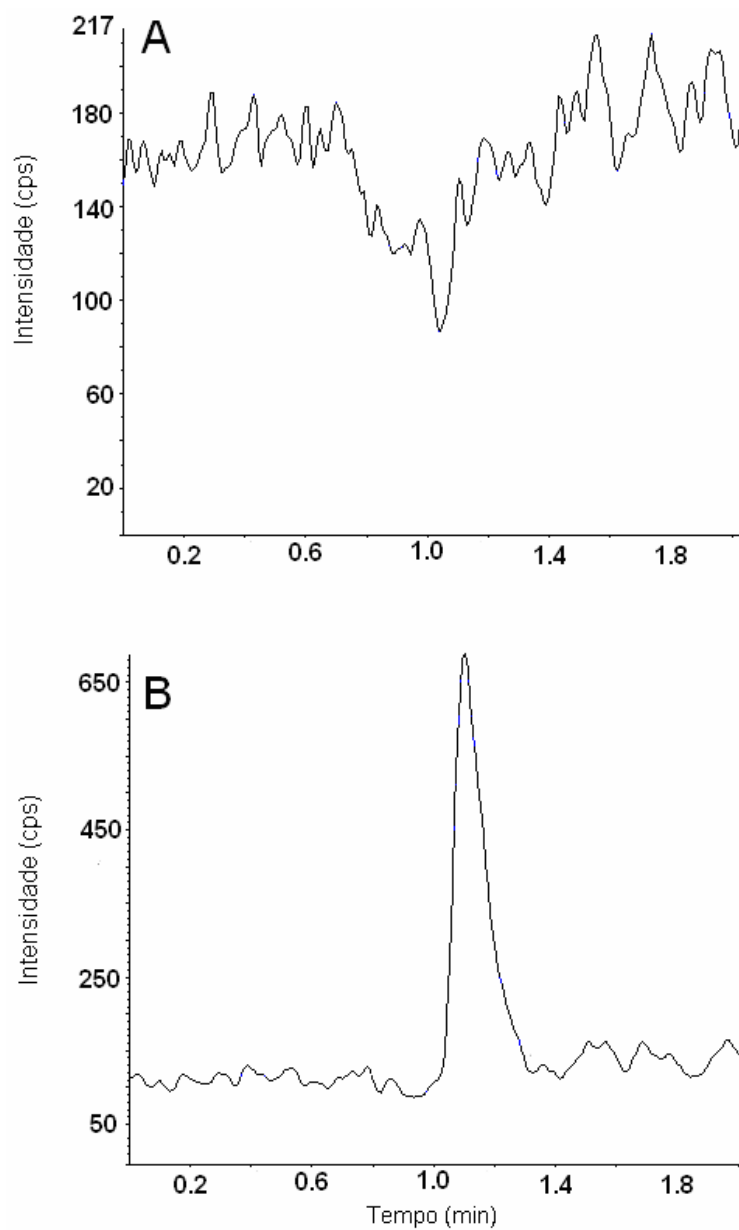


Figura 4- Exemplos de cromatogramas

Figura 4A- do plasma branco mostrando ausência de interferentes no tempo de retenção do 5-MNIS

Figura 4B- do plasma contaminado com 20 ng.mL^{-1} de 5-MNIS (LOQ) mostrando o tempo de retenção de 1,2 min

Tabela 1- Dados de validação do LOQ para o 5-MNIS

Valor esperado	20 ng/mL		
Identificação do lote	6103VA02	6103VA03	6103VA04
Concentração	19,5	16,6	22
(ng/mL)	17,6	18	21,6
	21,2	16,2	15,5
	17,5	16,8	19,2
	19,9	19,2	21,9
	21,3	18,9	25,1
	22,6	17,7	21,7
	19,1	19,2	19,8
Média intralote (ng/mL)	19,8	17,8	20,8
Precisão intralote (CV %)	9,1	6,8	13,3
Exatidão intralote (%)	99,2	89,1	104,3
Média interlote (in ng/mL)	19,5		
Precisão interlote (CV %)	12,0		
Exatidão interlote (%)	97,5		

Tabela 2- Dados de validação da curva de calibração para o 5-MNIS

Concentração nominal (ng/mL)	Concentração ¹ (ng/mL)			Média (ng/mL)	Exatidão (%)	CV (%)	Aprovado?
	Lote						
	6103VA02	6103VA03	6103VA04				
20	18,5	19,9	19,6	19,3	96,7	3,8	Sim
	21,7	19,1	20,2	20,3	101,7	6,4	
50	47,5	48,9	48,9	48,4	96,9	1,7	Sim
	48,6	53,8	51,4	51,3	102,5	5,1	
100	105	100	101	102	102,0	2,6	Sim
	102	108	102	104	104,0	3,3	
200	203	213	200	205	102,7	3,3	Sim
	214	224	216	218	109,0	2,4	
500	465	458	486	470	93,9	3,1	Sim
	469	449	455	458	91,5	2,2	
1000	996	983	991	990	99,0	0,7	Sim
	1090	1040	1060	1063	106,3	2,4	
2000	1820	1740	1810	1790	89,5	2,4	Sim
	2100	2020	2100	2073	103,7	2,2	
Coefficiente de correlação	0,9990	0,9981	0,9990				-

¹Modelo de regressão da curva concentração x tempo: $Y = A+Bx$ (peso 1/x²)

■ 6103VAL02.rdb (ISOSORBIDE 5-MONONITRATE): "Linear" Regression ("1 / (x * x)" weightin...

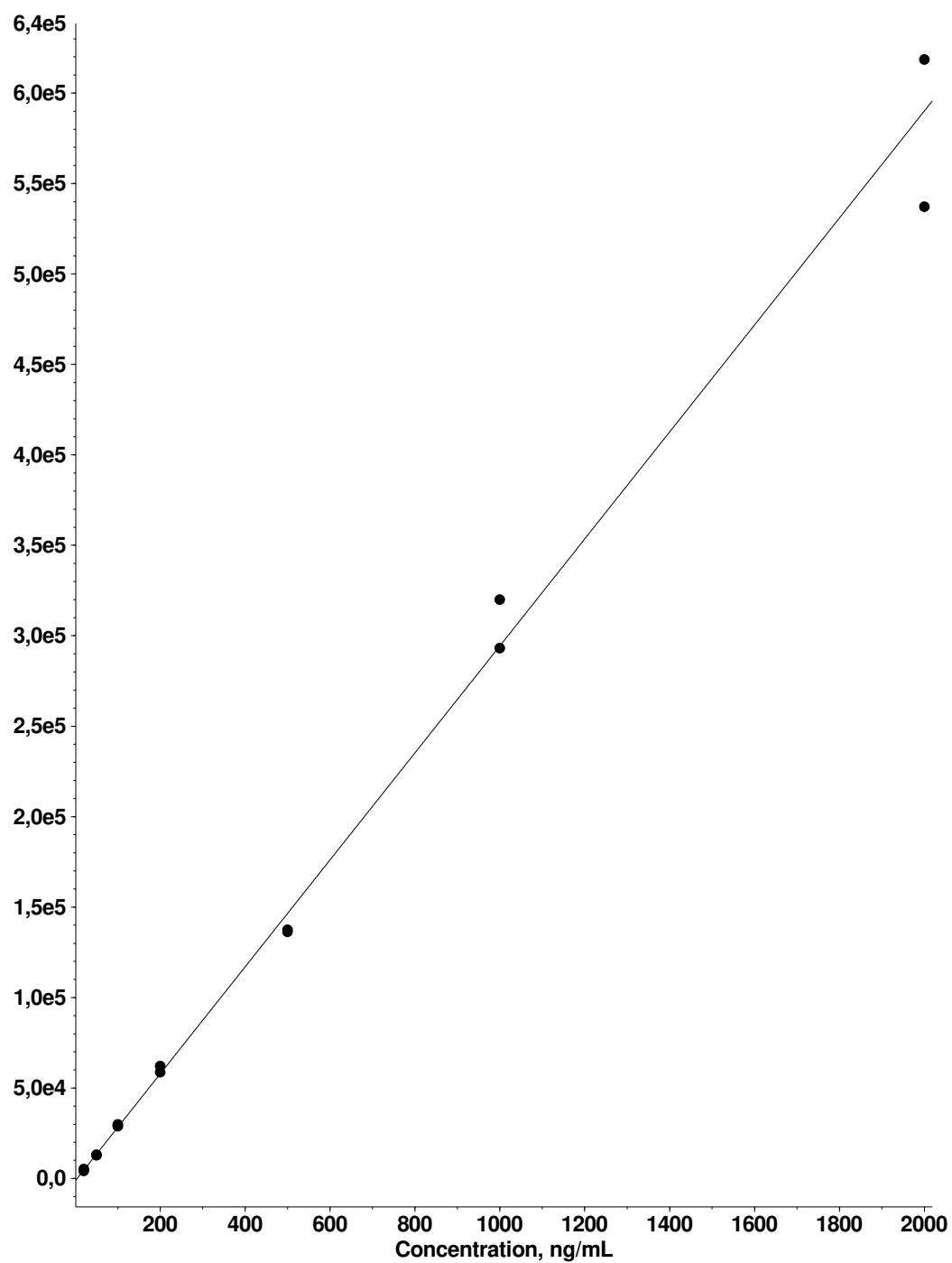


Figura 5- Gráfico representativo da curva de calibração para o 5-MNIS

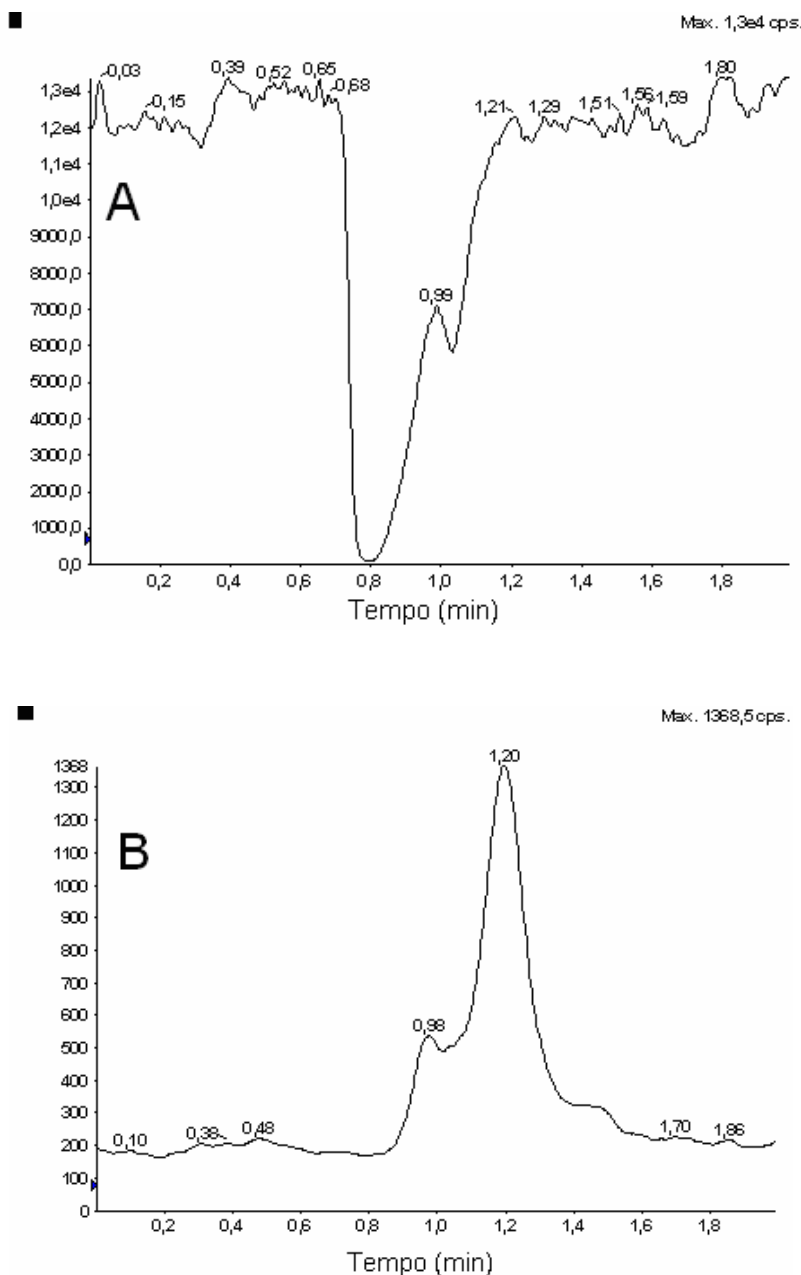


Figura 6- Experimento de supressão de íon mostrando nenhuma supressão significativa no tempo em que o analito foi eluído (1,2 min)

Figura 6A- perfil da linha de base do extrato de plasma branco injetado no sistema enquanto uma solução padrão de 5-MNIS em fase móvel estava sendo infundida, mostrando ausência de supressão de íon

Figura 6B- pico padrão do LOQ (20 ng/mL) mostrando o tempo de retenção do 5-ISMN de 1,2 min

Tabela 6- Resultados do teste de estabilidade pós-processamento

Concentração (ng/mL)						
	CQA (60 ng/mL)		CQB (300 ng/mL)		CCQ (1800 ng/mL)	
	Referência	Após 24 horas	Referência	Após 24 horas	Referência	Após 24 horas
	53,1	49,3	286	279	1740	1600
	55,9	51,4	278	277	1680	1670
	50,8	55,4	290	290	1760	1750
	48,8	54,0	288	275	1650	1700
	46,4	50,4	286	277	1660	1700
Média	51,0	52,1	286	280	1698	1684
CV (%)	7,2	4,9	1,6	2,1	2,9	3,3
Variação	2,2		-2,1		-0,8	

Tabela 7- Resultados do teste de estabilidade após quatro ciclos de congelamento e descongelamento

Concentração (ng/mL)						
	CQA (60 ng/mL)		CQB (300 ng/mL)		CCQ (1800 ng/mL)	
	Referência	Após 4 ciclos	Referência	Após 4 ciclos	Referência	Após 4 ciclos
	60,4	46,9	285	305	1510	1720
	65,8	54,5	311	312	1610	1870
	62,7	50,2	314	325	1490	1910
	53,6	47,8	319	316	1630	1960
	56,6	52,3	290	298	1970	1850
Média	59,8	50,3	304	311	1642	1862
CV (%)	8,1	6,2	5,0	3,3	11,8	4,8
Variação	-15,8		2,4		13,4	

Tabela 8- Resultados do teste de estabilidade a curto prazo

Concentração (ng/mL)						
	CQA (60 ng/mL)		CQB (300 ng/mL)		CCQ (1800 ng/mL)	
	Referência	Após 8 horas	Referência	Após 8 horas	Referência	Após 8 horas
	60,4	54,7	285	258	1510	1570
	65,8	45,5	311	261	1610	1610
	62,7	43,0	314	273	1490	1570
	53,6	49,4	319	266	1630	1560
	56,6	61,9	290	268	1970	1710
Média	59,8	50,9	304	265	1642	1604
CV (%)	8,1	14,9	5,0	2,2	11,8	3,9
Variação	-14,9		-12,7		-2,3	

Tabela 9- Resultados do teste de estabilidade a longo prazo

Concentração				
	100 ng/mL		1000 ng/mL	
	Referência	Após 97 dias	Referência	Após 97 dias
	92	139	1020	1290
	92	113	1040	1140
	89	109	1020	1270
	107	128	1140	1340
	108	135	1010	1350
Média	98	125	1046	1278
CV (%)	9,3	10,6	5,1	6,6
Variação	27,8		22,2	

Tabela 10- Resultados do teste de estabilidade da solução-mãe de 5-MNIS

Concentração (ng/mL)						
	CQA (60 ng/mL)		CQB (300 ng/mL)		CCQ (1800 ng/mL)	
	Referência	Após 9 dias	Referência	Após 9 dias	Referência	Após 9 dias
	60,1	62,1	321	353	2050	2250
	62,4	71,4	303	372	2040	2260
	56,7	69,4	312	339	2050	2270
	68,4	65,9	317	326	1950	2230
	52,5	66,8	299	331	1970	2230
Média	60,0	67,1	310	344	2012	2248
CV (%)	10,0	5,3	3,0	5,4	2,4	0,8
Variação	11,8		10,9		11,7	

Tabela 11- Resultados do teste de estabilidade das soluções de trabalho de 5-MNIS

Concentração (ng/mL)						
	CQA (60 ng/mL)		CQB (300 ng/mL)		CCQ (1800 ng/mL)	
	Referência	Após 24 horas	Referência	Após 24 horas	Referência	Após 24 horas
	51	52	277	272	1680	1600
	49	54	253	261	1670	1590
	47	55	276	258	1610	1670
	49	49	271	275	1720	1650
	51	50	254	272	1650	1610
Média	49	52	266	268	1666	1624
CV (%)	2,9	5,1	4,4	2,8	2,4	2,1
Variação	5,3		0,5		-2,5	

3.2- Estudo de bioequivalência

A princípio foram selecionados 26 voluntários para participar do estudo. No entanto, os voluntários 2, 11, 14 e 17 saíram do estudo por razões pessoais. O voluntário 26 saiu do estudo por decisão do investigador principal. Os voluntários 2, 11, 14, 17 e 26 foram substituídos pelos voluntários 102, 111, 114, 117 e 126 observando a sequência correspondente, como definido no protocolo clínico. O voluntário 26 saiu do estudo depois que todas as amostras do segundo período foram coletadas, portanto, a avaliação de bioequivalência foi concluída com o voluntário 26. Ao todo, 31 voluntários foram envolvidos no estudo, mas apenas 27 voluntários efetivamente contribuíram com dados para o estudo.

Os resultados pré- e pós-estudo dos exames laboratoriais, físicos e ECG não apresentaram nenhuma alteração clinicamente relevante. Durante os dois períodos de tratamento, os sinais vitais permaneceram dentro da faixa de variação normal. O evento adverso mais freqüente neste estudo foi dor de cabeça moderada, relatada por 22 dos 27 voluntários, sendo alguns episódios fracos (3) e outros intensos (3). Outros eventos adversos relatados foram desconforto abdominal (em 2 voluntários), náusea (3) e vômito (3). Nenhum evento adverso grave foi relatado ou observado.

A partir da determinação da concentração do 5-MNIS no plasma, obteve-se uma curva de nível plasmático em função do tempo para cada voluntário (Apêndice V) e, a partir destas, os parâmetros farmacocinéticos foram calculados. A Figura 7 mostra a curva média do nível plasmático do 5-MNIS em função do tempo e a Tabela 14 mostra os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos dos 27 voluntários. A Tabela 15 mostra as médias (e desvio-padrão) das concentrações plasmáticas do 5-MNIS em função do tempo, para ambas as formulações.

A Tabela 16 resume a análise estatística das razões individuais (teste/referência) de ASC_{0-24h} , $ASC_{0-\infty}$, ASC_{0-t} e $C_{máx}$, bem como a inclusão do IC 90% para as médias geométricas. As diferenças individuais (teste – referência) do $T_{máx}$ (ponto estimado = - 0,085) não foram estatisticamente diferentes de zero, já que o valor zero está incluído no IC 90% (- 0,25 – 0,0).

A análise de variância não revelou nenhum efeito relacionado ao período para quaisquer dos parâmetros farmacocinéticos.

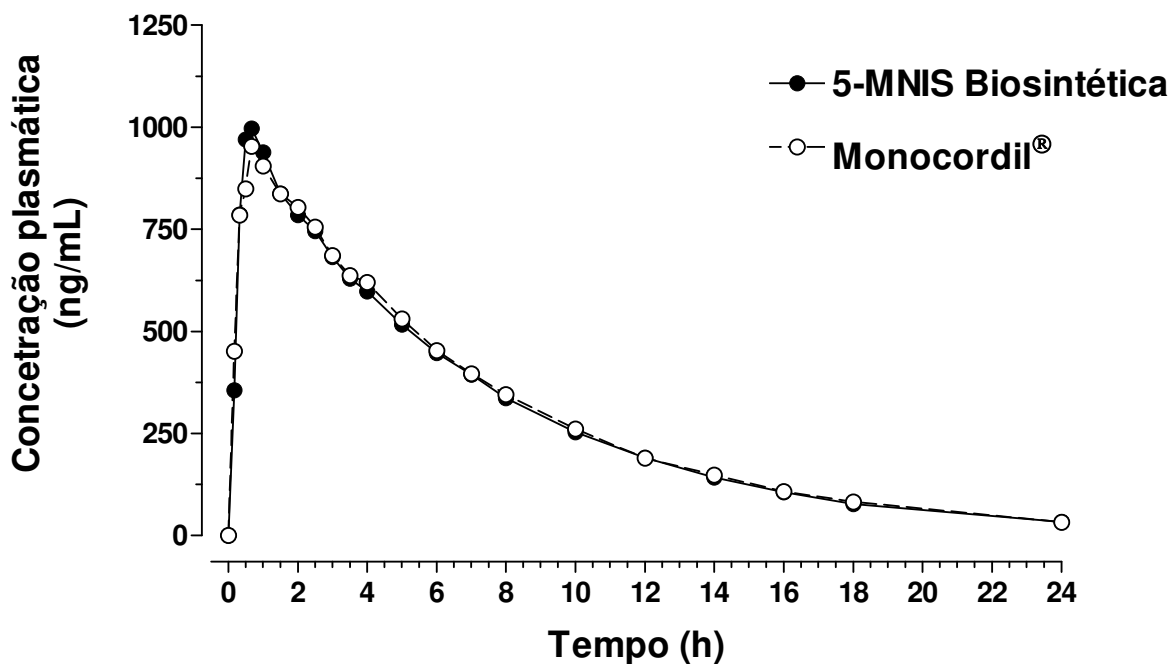


Figura 7- Curva média das concentrações plasmáticas de 5-MNIS em função do tempo para ambas as formulações. Os dados correspondem aos 27 voluntários que receberam dose única de 40 mg de cada formulação

Tabela 14- Média (e DP) dos principais parâmetros farmacocinéticos. Os dados correspondem aos 27 voluntários que receberam uma dose única de 40 mg de cada formulação

Parâmetros	Monocordil®		5-MNIS Biosintética	
Farmacocinéticos	Média	DP	Média	DP
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	7032	1726	6919	1742
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	7290	1760	7205	1766
ASC _{0-24h} (ng * h/mL)	7089	1733	6969	1749
C _{max} (ng/mL)	1135	330	1204	328
	Mediana	Amplitude	Mediana	Amplitude
Ke (h-1)	0,15	0,11 0,19	0,15	0,06 0,19
t _{1/2} (h)	4,61	3,68 6,14	4,77	3,67 11,78
T _{max} (h)	0,67	0,17 3,00	0,50	0,17 2,50

Tabela 15- Média (e DP) das concentrações plasmáticas (ng/mL) do 5-MNIS de ambas formulações em função do tempo (n = 27)

Tempo (h)	Teste		Referência	
	(5-MNIS Biosintética)		(Monocordil®)	
	Média	DP	Média	DP
00:00	0,0	0,0	0,0	0,0
00:10	441,4	472,6	363,5	380,9
00:20	798,6	479,0	792,6	463,7
00:30	862,6	322,0	959,3	491,0
00:40	963,4	347,4	1013,5	343,1
01:00	912,1	273,8	947,7	271,0
01:30	843,3	220,7	845,0	245,0
02:00	811,3	210,8	789,7	224,5
02:30	741,0	211,2	754,1	200,4
03:00	691,3	193,3	684,9	219,3
03:30	642,4	176,8	632,6	186,3
04:00	625,1	178,5	600,6	173,1
05:00	535,9	145,6	520,1	144,7
06:00	456,8	122,1	449,6	132,7
07:00	399,9	111,7	394,3	110,1
08:00	348,6	86,9	337,8	92,8
10:00	266,6	75,6	253,3	66,0
12:00	192,3	56,3	190,4	47,7
14:00	150,5	49,0	141,8	35,6
16:00	109,9	37,8	105,2	31,8
18:00	83,2	29,3	76,4	19,4
24:00	33,3	15,0	33,4	15,3

Tabela 16- Análise estatística das razões individuais da ASC_{0-24h} , $ASC_{0-\infty}$, ASC_{0-t} e $C_{máx}$ obtidas após a administração de dose única de 40 mg de 5-MNIS (de ambas formulações) em 27 voluntários sadios

Teste/Referência	Média Geométrica	IC 90%	Poder Estatístico
ASC_{0-24h} razão %	98,32	94,58-102,20	1,0000
$ASC_{0-\infty}$ razão %	98,96	95,12-102,95	1,0000
ASC_{0-T} razão %	98,38	94,60-102,31	1,0000
$C_{máx}$ razão %	105,41	95,93-115,82	0,9709

4- DISCUSSÃO

4.1- Desenvolvimento do método analítico

Vários métodos analíticos, como CLAE com detecção por análise de energia térmica (Maddock et al., 1983; Yu e Goff, 1983), cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (Zuccaro et al., 1990; Lauro-Marty et al., 1995; Marinkovic et al., 1997) e, principalmente, a cromatografia gasosa de alta resolução com um detector de captura de elétron (HRGC-ECD: high resolution gas chromatography with an electron-capture detector) (Rosseel e Bogaert, 1972; Morrison e Fung, 1984; Santoni et al., 1984; Sioufi e Pommier, 1984; Marzo e Treffner, 1985; Michel et al., 1989; Edlund e Johansen, 1991; Gremeau et al., 1995; Pennings e de Haas, 1996; Pommier et al., 1996; Pastera et al., 2004) foram descritos para quantificar o 5-MNIS no plasma humano. Entretanto, estes métodos apresentam algumas desvantagens, como, grande volume de amostra, tempos de corrida analítica longos e necessidade de troca freqüente de pré-colunas CG.

O HRGC-ECD foi o mais usado, pela alta sensibilidade e seletividade. Entretanto, os dados anteriores por HRGC mostram que o 5-MNIS sofre uma considerável decomposição quando a temperatura do injetor é maior que 150°C. Ao mesmo tempo, esta temperatura é considerada baixa, promovendo a condensação de compostos não voláteis que causam a contaminação do sistema de injeção, diminuindo rapidamente a sensibilidade; sendo necessária a troca do injetor a cada 60 injeções (Pastera et al., 2004). Tzeng e Fung (Tzeng e Fung, 1991), enfatizaram a alta instabilidade térmica no CG dos mononitratos orgânicos e a adsorção irreversível nos sistemas de injeção CG.

Mais recentemente, alguns trabalhos usando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa foram publicados, como CLAE-EM (Stockis et al., 2002; Sun et al., 2007) e CLAE-EM-EM (Vree et al., 2004; Jain et al., 2006). Nestes últimos, inclui-se nosso estudo (Silva et al., 2006), desenvolvido em 2004 e publicado em 2006, que descreve, pela primeira vez, um método para quantificação do 5-MNIS em plasma humano por CLAE-EM-EM, utilizando ionização por APPI no modo negativo. Nosso método foi concebido para dosar rapidamente o grande número de amostras provenientes do nosso estudo de bioequivalência.

O modo de ionização por fotoionização em pressão atmosférica (APPI) é um procedimento adotado quase que universalmente para identificar de modo eficiente várias classes de substâncias, incluindo substâncias apolares, tais como compostos aromáticos policíclicos, e analisar diferentes fármacos em matrizes biológicas, incluindo compostos polares. Este procedimento abre uma nova possibilidade para que compostos pequenos e frágeis, como o 5-MNIS, possam ser analisados por CLAE-EM-EM. O 5-MNIS é uma molécula tensionada e está propensa à fragmentação na fonte, resultando em produção de íons pequenos e nenhum pico de íon molecular sob condições típicas de operação EM. Uma das principais vantagens deste sistema de ionização é que a ionização da molécula é branda e produz fragmentações mínimas e um sinal de íon molecular predominante (Jain et al., 2006). Para o 5-MNIS, a formação do íon foi observada em modo negativo, e corresponde a um aduto com o ânion acetato $[M + \text{acetato}]^-$ de m/z 249,9, com abundância 10 vezes maior que a do íon molecular deprotonado $[M - H]^-$ de m/z 189,9. A abundância máxima do íon m/z 249,9 foi obtida com o mínimo de voltagem de transferência de íon (no módulo), $IS = -1200$ V, e o aumento do IS (no módulo) reduziu a abundância deste aduto__acetato (dados não mostrados). A formação do íon $[M + \text{acetato}]^-$ não foi observada em ionização por eletrospray (ESI) devido a alta voltagem usada (4000 – 5500 V) no modo de ionização. No entanto, após publicação do nosso trabalho, outro grupo conseguiu obter um aduto do 5-MNIS de m/z 250,1, usando uma voltagem da fonte de íon de -3500 V no modo ESI (Jain et al., 2006). Na ionização química em pressão atmosférica (APCI), o íon de m/z 249,9 pode ser observado, mas numa abundância muito baixa (Figura 1C). Na análise do 5-MNIS pelo HRGC-EM, usando impacto de elétron, independentemente se a molécula é derivatizada ou não, a alta fragmentação e a baixa abundância do íon molecular não fornece nenhuma vantagem em termos de seletividade e sensibilidade sobre o uso do detector de captura de elétron.

A principal transição observada pela dissociação do íon aduto $[M + \text{acetato}]^-$ é o íon molecular deprotonado $[M - H]^-$ (Figura 1A). A transição m/z 249,9>189,9 teve a intensidade mais alta e a interferência mais baixa detectável causada pelo plasma humano branco e, portanto, foi selecionada para este método.

O padrão interno deve ser um composto com similaridade estrutural com o analito, para que seu comportamento no método analítico (extração, separação cromatográfica e ionização) seja semelhante ao do analito. No caso do 5-MNIS, sua molécula deuterada seria o padrão interno ideal, no entanto, não existe no mercado.

Diferentes moléculas com estruturas quimicamente não relacionadas ao 5-MNIS foram utilizadas em análises de HRGC e HRGC-EM como padrão interno, tais como nitroglicerina e 9-fluoronona (Pastera et al., 2004). Durante o desenvolvimento deste método, diferentes substâncias foram avaliadas como padrão interno, tais como cloranfenicol, pentanitato e álcool p-nitrobenzila. Entretanto, eles não mostraram tempos de retenção semelhantes e/ou resposta satisfatória na ionização por fotoionização. Por isto, foi decidido não usar um padrão interno nesta metodologia. O limite de quantificação (LOQ) foi validado para 20 ng mL^{-1} e o tempo de corrida de 2.0 min permitiu um alta velocidade de processamento, necessária para a quantificação de um grande número de amostras.

O método otimizado foi validado pela avaliação da recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão. Os coeficientes de variação (precisão) e exatidão de menos que 15% foram considerados aceitáveis, exceto para o LOQ, que foi expandido para 20%, como recomendado por Shah et al. (Shah et al., 1991) e Bressolle et al. (Bressolle et al., 1996) para a análise das amostras biológicas para estudos farmacocinéticos.

Três curvas de calibração, preparadas independentemente de diferentes soluções-mãe, foram avaliadas na validação pré-estudo. Mesmo apresentando uma curva de calibração não linear ($20 - 2000 \text{ ng.mL}^{-1}$), a metodologia analítica foi completamente validada com uma equação linear $y = 322 \pm 25x - 998 \pm 302$ e $r^2 > 0.998$. Portanto, esta não linearidade não afetou o ensaio. As concentrações da curva de calibração, bem como as dos controles de qualidade, foram determinadas em função da previsão das concentrações de 5-MNIS para a posologia usada neste protocolo clínico. A utilização deste método para outros esquemas posológicos pode implicar numa revisão destes valores. O limite máximo da curva de calibração (2000 ng/mL) foi suficientemente alto para quantificar todas as amostras, sendo atingido apenas uma única vez, já que foi assim

escolhido por ser um valor maior que o $C_{\text{máx}}$ do 5-MNIS de isossorbida descrito na literatura (Abshagen, 1992). Por outro lado, o LOQ foi suficientemente baixo para permitir a quantificação de concentrações de 5-MNIS correspondentes a cerca de 2% do $C_{\text{máx}}$ encontrado.

A especificidade/seletividade foi provada pela ausência de picos interferentes no tempo de retenção do 5-MNIS. A supressão de íon, avaliada como proposto por Bonfiglio et al. (Bonfiglio et al., 1999), não mostrou nenhum efeito matriz no tempo de retenção do fármaco. A recuperação do 5-MNIS foi consistente e reprodutível nas três concentrações testadas. O experimento foi realizado com tubos de vidro, já que o 5-MNIS adere ao plástico, reduzindo a recuperação do 5-MNIS (Pennings e de Haas, 1996). Os testes realizados indicaram que o 5-MNIS nas amostras de plasma não apresentou nenhuma degradação significativa nos testes de estabilidade: auto-injetor a 8°C por 24 h, a curto prazo (8 h à temperatura ambiente), a longo prazo (97 dias a - 20°C), ciclos de congelamento-descongelamento.

Atualmente no Brasil, a produção de medicamentos para exportação e substituição de importações, bem como a pesquisa de novos medicamentos e formulações são atividades em forte expansão (obviamente não se compara com a dos países desenvolvidos). Os controles de matéria-prima, produto final, caracterização de biodisponibilidade, bioequivalência e de metabólitos e pesquisas de novas drogas necessitam de apoio analítico de ponta. Cada vez mais esse suporte é fornecido pelas diferentes modalidades da espectrometria de massas contemporânea. A espectrometria de massas já é uma realidade em diversos segmentos da indústria farmacêutica brasileira, propiciando um desenvolvimento sustentável e inclusão social, através da produção de medicamentos genéricos (Pereira et al., 2005).

É importante salientar que, no Brasil, as pesquisas de biodisponibilidade e bioequivalência começaram em 1989 na Unicamp/SP, portanto o assunto ainda é relativamente novo e o País ainda carece de mão-de-obra capacitada para trabalhar em Centros de Pesquisa (Anvisa, 2002). Segundo a Anvisa, com o aumento da demanda de estudos de bioequivalência para medicamentos genéricos, faz-se necessário o investimento em formação e capacitação de mão-de-obra qualificada, para que o Brasil se torne auto-suficiente nessa área.

4.2- Estudo de bioequivalência

O ensaio clínico transcorreu normalmente, não sendo relatado nem observado nenhum evento adverso grave, portanto, as formulações foram consideradas bem toleradas na dose administrada. O evento adverso mais freqüentemente relatado foi dor de cabeça, que ocorreu em 80% dos voluntários. A dor de cabeça é um evento esperado, em virtude do efeito farmacodinâmico de vasodilatação do 5-MNIS (Vree et al., 2004) e normalmente desaparece com a continuidade do tratamento (Klasco, 2007c).

Para avaliar a bioequivalência entre a formulação do mononitrato de isossorbida (comprimido 40 mg) produzida pelos Laboratórios Biosintética Ltda com a formulação referência (Monocordil® dos Laboratórios Baldacci) foram avaliados os seguintes parâmetros: ASC_{0-t} e C_{max} , de acordo com as recomendações do FDA e RDC 1170 (FDA, 2003; Anvisa, 2006). Foi realizado um estudo com dose única ao invés de múltiplas doses, uma vez que o estudo de dose única é mais sensível para avaliar a liberação do fármaco de um medicamento de liberação imediata para a circulação sistêmica (Anvisa, 2006).

O valor médio da ASC_{0-t} foi aproximadamente 97% do valor médio da $ASC_{0-\infty}$ para ambas as formulações, e nenhum voluntário apresentou qualquer valor abaixo de 93% da $ASC_{0-\infty}$. O valor médio da ASC_{0-t} de 97% coincide com o valor teoricamente esperado, já que nosso estudo teve um período de coleta (24 horas) que correspondeu a cerca de cinco vezes o valor de $t_{1/2}$ do 5-MNIS (5 horas). Isto indica que foi possível traçar um bom perfil farmacocinético (curva concentração x tempo) do 5-MNIS que circulou pelo organismo para todos os voluntários. Além disso, vale ressaltar que o método analítico foi eficiente, cobrindo o intervalo de concentrações de 20 a 2000 ng/mL, suficiente para quantificar toda o 5-MNIS que circulou no organismo. O método desenvolvido apresentou um LOQ de cerca de 2% do C_{max} e um limite máximo suficientemente mais alto que o C_{max} , para que nenhuma amostra extrapolasse este valor.

Sendo assim, a extensão da absorção para avaliação da bioequivalência da formulação teste com relação à referência pode ser estabelecida a partir dos valores de ASC_{0-t} , de acordo com a RDC 1170 (Anvisa, 2006), que estabelece que a ASC_{0-t} deve ser

pelo menos 80% da $ASC_{0-\infty}$. O presente estudo demonstrou que os intervalos de confiança de 90% das médias de ASC_{0-t} e $C_{máx}$ (após transformação logarítmica das razões individuais) estão inclusos na faixa de variação de bioequivalência (80-125%). Conseqüentemente, as duas formulações de isossorbida foram consideradas bioequivalentes (Anvisa, 2006). Para o 5-MNIS, o $T_{máx}$ não foi considerado clinicamente relevante para a determinação da bioequivalência. Mesmo assim, a análise não paramétrica das diferenças individuais demonstrou nenhuma diferença significativa entre as formulações.

O 5-MNIS apresentou ASC por volta de 7000 ng*h/mL, próximo dos valores descritos por Abshagen (Abshagen, 1992). A concentração máxima atingida após a dose de 40 mg foi próxima de 1200 ng/mL, semelhante a citada por Pastera et al. (Pastera et al., 2004). O 5-MNIS foi rapidamente absorvido, atingindo a concentração máxima entre 30 e 40 min, sendo um pouco mais rápido que o descrito por Abshagen (Abshagen, 1992) (1 hora). Esta diferença no $T_{máx}$ não interfere no efeito do fármaco, uma vez que, em ambos os casos, a concentração terapêutica mínima (100 ng/mL (Gandini et al., 1987; Merz et al., 1992) foi atingida em cerca de 20 min. Os níveis terapêuticos de 5-MNIS mantiveram-se por cerca de 12 horas, logo, espera-se que a ação deste fármaco seja mantida por período semelhante, uma vez que existe uma boa correlação entre a dose administrada, a concentração plasmática e o efeito do 5-MNIS (Abshagen, 1992).

Ambas formulações demonstraram um perfil de eliminação semelhante, como se observou pelos valores de $t_{1/2}$ e Ke , comparáveis a outros relatos (Abshagen, 1992). Estes parâmetros não são decisivos para o estabelecimento da bioequivalência (Anvisa, 2006). O $t_{1/2}$ observado por volta de cinco horas, caracteriza uma eliminação longa, se comparado a outros nitratos orgânicos, como dinitrato de isossorbida ($t_{1/2} = 1h$) e nitroglicerina ($t_{1/2} < 5 min$), o que justifica o fato do 5-MNIS ser considerado um nitrato de longa duração (Kirsten et al., 1998).

O estudo de bioequivalência apresentado aqui foi para a formulação de comprimido de 40 mg de 5-MNIS. No entanto, o Monocordil® é apresentado como comprimidos de 20 e 40 mg de 5-MNIS. Apesar da diferença da quantidade de 5-MNIS em cada apresentação, as duas são proporcionalmente semelhantes segundo a definição do

FDA (FDA, 2003), portanto, a realização do estudo de bioequivalência para a maior dosagem (40 mg) elimina a necessidade de outro estudo de bioequivalência para o genérico na menor dosagem (20 mg), uma vez que este seja aprovado no teste de dissolução. Portanto, este estudo rendeu ao mercado brasileiro um novo genérico do 5-MNIS, em duas dosagens diferentes (20 e 40 mg da Biosintética Ltda).

Nosso estudo contribuiu para que, em 2006, o número de medicamentos genéricos registrados no Brasil para o tratamento das doenças cardiovasculares ocupasse o terceiro lugar (9,93%) depois daqueles para o tratamento das infecções/infestações (33,69%) e da dor/inflamação/febre (23,46%). As doenças cardiovasculares são importantes causas de morbidade e mortalidade no mundo. Segundo dados do Ministério da Saúde/Cenepi (Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) e base demográfica do IBGE) (Brasil, 2004), as doenças do aparelho circulatório (ou doenças cardiovasculares) foram a principal causa de morte por causa definida (31,5%) no Brasil, em 2003.

Os estudos de bioequivalência trazem um rápido retorno social, uma vez que garante a qualidade de um medicamento com menor custo para o paciente. No caso que apresentamos, a redução de custo do medicamento genérico em relação ao de referência é de 35%. Portanto, para um paciente que faz um tratamento a longo prazo, como os pacientes que utilizam o 5-MNIS, isto significa a redução do custo mensal de um tratamento com 2 doses diárias de 20 mg de R\$ 25,26 para R\$ 16,38, uma economia de R\$ 8,88/mês. Este cálculo foi feito com base na tabela de preços em vigor, em junho de 2007, para os comprimidos de 5-MNIS em caixas com 20 comprimidos.

No Brasil, a qualidade dos genéricos ainda é questionada por médicos, que mantêm o hábito de prescrever apenas os medicamentos de marca. No entanto, no sistema de saúde pública, já é obrigatória a prescrição através do nome genérico do medicamento. De qualquer modo, o interesse em baixar custos do cuidado de saúde resultou num grande aumento no uso de genéricos. Em 2006, de acordo com a IMS Health, as vendas atingiram mais de 1 bilhão de dólares no Brasil, um aumento de 52,5 % comparado a 2005 (People'sDailyOnline, 2007).

O número de estudos de bioequivalência no Brasil cresceu muito desde a lei dos genéricos, em 1999, até 2004/2005. Neste ínterim, as indústrias farmacêuticas tiveram maior interesse em estabelecer a bioequivalência para os produtos mais vendidos e com protocolos mais comuns. No primeiro semestre de 2007, houve uma queda considerável do número de estudos realizados, uma vez que as indústrias estão represando a demanda. Isto porque com a nova exigência do teste de bioequivalência também para o medicamento similar (Anvisa, 2003) muitas estão reformulando os seus produtos e realizando testes de equivalência farmacêutica para então passar aos de bioequivalência. Ou estão aguardando o prazo de revalidação de registro de seus produtos que, normalmente, é de cinco anos.

Além disso, há a necessidade de fazer estudos de bioequivalência para fármacos que precisam de protocolos mais complexos, como aqueles que necessitam de quantificação de metabólitos, estudos em pacientes (medicamentos que oferecem risco aumentado para voluntários, como os citotóxicos e psicotrópicos) e em crianças (medicamentos pediátricos). Nos dois últimos casos, o Brasil ainda precisa discutir os aspectos éticos e questões metodológicas para a realização destes estudos, daí a importância de termos massa crítica para desenvolver este trabalho.

Os estudos de bioequivalência envolvem uma gama de conhecimentos de diferentes áreas como farmácia, medicina, estatística e química, já que apresentam três etapas distintas: clínica, analítica e estatística. Portanto, as discussões sobre este tema necessitam o envolvimento de uma equipe multidisciplinar, bem afinada para conversar entre si.

5- CONCLUSÃO

Um novo método CLAE-EM-EM, com ionização por APPI, no modo negativo, para quantificação do 5-MNIS foi desenvolvido e completamente validado. O método foi bastante sensível e rápido para ser aplicado em estudos de farmacocinética, como é o caso deste estudo de bioequivalência.

Baseando-se nas regras da Anvisa (Anvisa, 2006) e do FDA (FDA, 2003) para avaliação de bioequivalência de fármacos em seres humanos e na análise dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a formulação teste (Laboratórios Biosintética Ltda.) é bioequivalente em relação à formulação referência (Monocordil®, Laboratórios Baldacci S.A.), após administração de dose única de 40 mg de 5-MNIS, em voluntários sadios.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abshagen UW. Pharmacokinetics of isosorbide mononitrate. Am J Cardiol 1992; 70 (17):61G-6G.

Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996. [Acesso em 5 jul 2007]. Disponível em: <http://www.conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso196.doc>

Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Dispõe sobre o registro de medicamento similar e dá outras providências. RDC n. 133, de 29 de maio de 2003. D.O.U. n. 104, de 2 de junho de 2003, seção 1, pág. 25.

Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. Resolução n. 1170, de 19 de abril de 2006. [acesso em 5 jul 2007]. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21746&word=>

Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Manual de boas práticas em biodisponibilidade bioequivalência v.1 [monografia na Internet]. Brasília: Anvisa; 2002 [acesso em 5 jul 2007].

Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/inspecao/bioequivalencia/Volume1.zip>

Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Tabela: Redução no Custo de Tratamentos. 2004. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/cidadao/redu%E7aodecusto.pdf> [acesso em 10 jun 2007]

Applied Biosystems. Best in Class: High performance advanced LC/MS/MS systems - Solutions for Qualitative and Quantitative Analysis: Mass Spectrometry. [monografia na internet]. Foster City (CA): Applied Biosystems; 2006 [acesso em 5 jul 2007]. Disponível em: http://docs.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm_marketing/documents/generaldocuments/cms_042521.pdf.

Applied Biosystems. Photospray ion source: operator's manual [monografia na internet]. Foster City (CA): Applied Biosystems; 2002 [acesso em 5 jul 2007]. Disponível em:

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm_support/documents/generaldocuments/cms_042181.pdf

Bermudez J. [Generic drugs: an alternative for the Brazilian market]. *Cad Saude Publica* 1994; 10 (3):368-78.

Bidoggia H. Isosorbide-5-mononitrate and isosorbide dinitrate retard in the treatment of coronary heart disease: a multi-centre study. *Curr Med Res Opin* 1987; 10 (9):601-11.

Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999; 13 (12):1175-85.

Brasil. Lei n. 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências.[acesso em 22 mai 2006]. Disponível em <http://www6.senado.gov.br/sicon/ExecutaPesquisaLegislacao.action>

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de informática do SUS. Datasus. Indicadores de mortalidade: C.4 Mortalidade proporcional por grupos de causas. 2004. [acesso em 5 jul 2007]. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2004/c04.def>

Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 686 (1):3-10.

Carvalho MC, Accioly Junior H, Raffin FN. [Social representations of generic drugs by consumers from Natal, Rio Grande do Norte, Brazil]. *Cad Saude Publica* 2006; 22 (3):653-61.

Chasseaud LF. Isosorbide 5-mononitrate pharmacokinetics. *Cardiology* 1987; 74 Suppl 1:6-11.

Chen J, Korfmacher WA, Hsieh Y. Chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for stereoisomeric pharmaceutical determinations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 820 (1):1-8.

Driscoll JN. Application of a photoionization detector in gas chromatography. *Am Lab* 1976; 8 (10):71-5.

Driscoll JN. Evaluation of a new photoionization detector for organic compounds. *J Chromatogr* 1977; 134 (1):49-55.

Driscoll JN, Clarici JB. A new photoionization detector for gas chromatography. *Chromatographia* 1976; 9 (11):567- 70.

Driscoll JN, Conron DW, P. F, Krull IS, Xie KH. Trace analysis of organic compounds by high-performance liquid chromatography with photoionization detection. *J Chromatogr* 1984; 302:43-50.

Driscoll JN, Spaziani FF. PID development gives new performance levels. *Res/Dev* 1976; 27 (5):50-4.

Edlund PO, Johansen K. Clean-up of plasma extracts by gel permeation chromatography during analysis of isosorbide nitrates by capillary gas chromatography. *J Chromatogr* 1991; 553 (1-2):21-7.

EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products). Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence (draft). December, 1998.

FDA (Food and Drugs Administration). US Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products: general considerations: Guidance for Industry; 2003.

Fung HL. Solving the mystery of nitrate tolerance. A new scent on the trail? *Circulation* 1993; 88 (1):322-4.

Gammage MD, Murray RG, Littler WA. Isosorbide-5-mononitrate in the treatment of acute left ventricular failure following acute myocardial infarction. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 29 (6):639-43.

Gandini R, Cunietti E, Assereto R, Castoldi D, Tofanetti O, Baggio E. Pharmacokinetics of isosorbide mononitrate in a new sustained release oral form in comparison with a conventional formulation. *Arzneimittelforschung* 1987; 37 (7):836-9.

Gremeau I, Sautou V, Pinon V, Rivault F, Chopineau J. Solid-phase extraction of isosorbide dinitrate and two of its metabolites from plasma for gas chromatographic analysis. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 665 (2):399-403.

Hauschke D, Steinijans VW, Diletti E. A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1992; 30 Suppl 1:S37-43.

Hsieh, Y. in: W. Korfmacher (Ed.), *Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies*, CRC press, Boca Raton, FL, 2004.

Jain DS, Subbaiah G, Sanyal M, Shrivastav PS, Pal U, Ghataliya S et al. An extensive study on isosorbide-5-mononitrate acid adducts for quantification in human plasma using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry and its application to bioequivalence sample analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20 (19):2921-31.

Kauppila TJ, Kuuranne T, Meurer EC, Eberlin MN, Kotiaho T, Kostianen R. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Ionization mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes. *Anal Chem* 2002; 74 (21):5470-9.

King DR, Kanavos P. Encouraging the use of generic medicines: implications for transition economies. *Croat Med J* 2002; 43 (4):462-9.

Kirsten R, Nelson K, Kirsten D, Heintz B. Clinical pharmacokinetics of vasodilators. Part II. *Clin Pharmacokinet* 1998; 35 (1):9-36.

Klasco RK (Ed). Isosorbide mononitrate - Rec. INN (Index nominum). In: Klasco RK (Ed): *DRUGDEX ® System*. Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado; 2007a [acesso em 03 jun. 2007] Disponível em: <http://www.thomsonhc.com>.

Klasco RK (Ed). Isosorbide mononitrate (Drugdex ® Drugpoint Summary). In: Klasco RK (Ed): DRUGDEX ® System. Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado; 2007b [acesso em 03 jun. 2007] Disponível em: <http://www.thomsonhc.com>.

Klasco RK (Ed). Isosorbide mononitrate (Drugdex ® Evaluations). In: Klasco RK (Ed): DRUGDEX ® System. Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado; 2007c [acesso em 03 jun. 2007] Disponível em: <http://www.thomsonhc.com>.

Lauro-Marty C, Lartigue-Mattei C, Chabard JL, Beyssac E, Aiache JM, Madesclaire M. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of isosorbide 5- mononitrate in human plasma. J Chromatogr B Biomed Appl 1995; 663 (1):153-9.

Locke DC, Dhingra BS, Baker AD. Liquid phase detector for liquid chromatography. Anal Chem 1982; 54:447-50.

Loscalzo J. Antiplatelet and antithrombotic effects of organic nitrates. Am J Cardiol 1992; 70 (8):18B-22B.

Maddock J, Lewis PA, Woodward A, Massey PR, Kennedy S. Determination of isosorbide dinitrate and its mononitrate metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-thermal energy analysis. J Chromatogr 1983; 272 (1):129-36.

Major RM, Taylor T, Chasseaud LF, Darragh A, Lambe RF. Isosorbide 5-mononitrate kinetics. Clin Pharmacol Ther 1984; 35 (5):653-9.

Marinkovic VD, Milojkovic SS, Nedeljkovic JM, Comor JJ, Agbaba D, Zivanov-Stakic D. Gas chromatography-mass spectrometry determination of isosorbide 5- mononitrate and related impurities in raw materials and dosage formulations. J Pharm Biomed Anal 1997; 16 (3):425-9.

Marzo A, Balant LP. Bioequivalence. An updated reappraisal addressed to applications of interchangeable multi-source pharmaceutical products. Arzneimittelforschung 1995; 45 (2):109-15.

Marzo A, Treffner E. Gas-liquid chromatographic determination of isosorbide-5-mononitrate derivatized with perfluorinated anhydrides for pharmacokinetic and bioavailability investigations. J Chromatogr 1985; 345 (2):390-5.

Merz PG, Thurmann P, Harder S. [Biological availability and pharmacodynamics following single oral administration or three different sustained-release isosorbide-5-mononitrate dosage forms]. *Arzneimittelforschung* 1992; 42 (1):21-4.

Michel G, Fay L, Prost M. Determination of isosorbide dinitrate and its metabolites in plasma by gas chromatography on a capillary column with electron-capture detection. *J Chromatogr* 1989; 493 (1):188-95.

Morrison RA, Fung HL. Determination of the partitioning, stability, and metabolite formation of isosorbide dinitrate in human and rat blood using an improved gas- liquid chromatographic assay. *J Chromatogr* 1984; 308:153-64.

Naranjo CA, Souich P, Busto UE (eds). *Métodos en Farmacología Clínica*. Washington: Organización panamericana de la salud. OMS. 1992. 432 p.

Needleman P, Lang S, Johnson EM, Jr. Organic nitrates: relationship between biotransformation and rational angina pectoris therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 1972; 181 (3):489-97.

Optimizing Antianginal Therapy: A Consensus Conference. Boca Raton, Florida, February 7-9, 1992. *Am J Cardiol*, 1992; 70 (17): 1G-76G.

Pastera J, Vyslouzil L, Kvetina J. Determination of isosorbide-5-mononitrate in human plasma by high-resolution gas chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 800 (1-2):271-4.

Pennings JM, de Haas JM. Improved extraction procedure for the assay of isosorbide-5-mononitrate in serum. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 675 (2):332-5.

People's Daily Online [periódico na Internet]. Brazil earns \$1.05 billion in generic drugs sales in 2006. People's Daily Online [periódico na Internet]. Jan 2007 [acesso em 24 jan 2007]. Disponível em: http://english.peopledaily.com.cn/200701/24/eng20070124_344256.html

Pereira AdS, Bicalho B, Lilla S, De Nucci G. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. *Quim Nova* 2005; 28:S107-S11.

Pommier F, Gauducheau N, Pineau V, Sioufi A, Godbillon J. Simultaneous determination of isosorbide dinitrate and its mononitrate metabolites in human plasma by capillary gas chromatography with electron-capture detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 678 (2):354-9.

Raffaelli A, Saba A. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2003; 22 (5):318-31.

Rinde-Hoffman D, Glasser SP, Arnett DK. Update on nitrate therapy. *J Clin Pharmacol* 1991; 31 (8):697-701.

Robb DB, Covey TR, Bruins AP. Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 2000; 72 (15):3653-9.

Rosseel MT, Bogaert MG. Gas chromatography of the nitrate esters of glycerol, isosorbide and isomannide. *J Chromatogr* 1972; 64 (2):364-7.

Rudolph W, Blasini R, Reiniger G, Brugmann U. Tolerance development during isosorbide dinitrate treatment: can it be circumvented? *Z Kardiol* 1983; 72 Suppl 3:195-8.

Santoni Y, Rolland PH, Cano JP. Determination of isosorbide dinitrate and its mononitrate metabolites in human plasma using Extrelut purification and capillary column gas- liquid chromatography. *J Chromatogr* 1984; 306:165-72.

Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991; 16 (4):249-55.

Shargel L, Yu ABC. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 4a ed. ed. Stamford: Appleton & Lange; 1999. 768. p.

Silber S. Nitrates: why and how should they be used today? Current status of the clinical usefulness of nitroglycerin, isosorbide dinitrate and isosorbide-5-mononitrate. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 38 Suppl 1:S35-51.

Silva LC, Oliveira LS, Mendes GD, Garcia G, Pereira Ados S, De Nucci G. Quantification of isosorbide 5-mononitrate in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 832 (2):302-6.

Sioufi A, Pommier F. Determination of the two mononitrate metabolites of isosorbide dinitrate in human plasma and urine by gas chromatography with electron- capture detection. *J Chromatogr* 1984; 305 (1):95-103.

Stockis A, De Bruyn S, Deroubaix X, Jeanbaptiste B, Lebacq E, Jr., Nollevaux F et al. Pharmacokinetic profile of a new controlled-release isosorbide-5-mononitrate 60 mg scored tablet (Monoket Multitab). *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53 (1):49-56.

Sun X, Li X, Cai S, Qin F, Lu X, Li F. High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination of isosorbide 5-mononitrate in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 846 (1-2):323-8.

Sweetman SC (Ed). Isosorbide mononitrate. In: MARTINDALE Sweetman SC (Ed), Martindale: The Complete Drug Reference. London: Pharmaceutical Press. Electronic version, Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado; 2006 [acesso em 03 jun. 2007] Disponível em: <http://www.thomsonhc.com>.

Tzeng TB, Fung HL. Gas chromatographic analysis of isomeric organic mononitrates in plasma. *J Chromatogr* 1991; 571 (1-2):109-20.

United States Pharmacopeia (USP-NF XXX). Rockville: Pharmacopeial Convention Inc., 2007, p. .

Vree TB, Dammers E, Valducci R. Sex-related differences in the pharmacokinetics of isosorbide-5-mononitrate (60 mg) after repeated oral administration of two different original prolonged release formulations. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42 (8):463-72.

Waters Corporation [homepage na Internet]. Milford (MA): Waters Corporation; c 2007 [atualizada em 5 mar 2007; acesso em 5 jul 2007] Mass Spectrometry (MS) primer; [aproximadamente 32 telas]. Disponível em: <http://www.waters.com/watersdivision/ContentD.asp?watersit=EGOO-66LRQD>

WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations. Thirty-ninth Report. Geneva, World Health Organization, 2005. 142p. illus. (WHO Technical Report Series 929).

Yu WC, Goff EU. Measurement of plasma concentrations of vasodilators and metabolites by the TEA Analyzer. *Biopharm Drug Dispos* 1983; 4 (4):311-9.

Zanine AC, Oga S. *Farmacologia aplicada*. 5 ed. São Paulo: Atheneu Editora; 1994. 11-21; 45-63. p.

Zuccaro P, Zuccaro SM, Pacifici R, Pichini S, Boniforti L. Determination of isosorbide-5-mononitrate in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1990; 525 (2):447-53.

7- ANEXO



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

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 10/11/03
(Grupo II)

PARECER PROJETO: N° 533/2003

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE UMA FORMULAÇÃO DE MONONITRATO DE ISOSSORBIDA COMPRIMIDO DE 40 MG DOS LABORATÓRIOS BIOSINTÉTICA LTDA VERSUS UMA FORMULAÇÃO DE MONONITRATO DE ISOSSORBIDA COMPRIMIDO DE 40 MG DE REFERÊNCIA DOS LABORATÓRIOS BALDACCİ (MONOCORDİL) EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto de Nucci

INSTITUIÇÃO: Unidade de Farmacologia Miguel Servet

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/11/2003

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 21/10/04

II - OBJETIVOS

Avaliar se a formulação de Mononitrato de isossorbida comprimido de 40 mg produzida pela biosintética atinge nível plasmático equivalente a formulação referência.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo aberto, randomizado, cruzado, dose única onde 26 voluntários de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos, recebem os medicamentos teste e referência em dois períodos. Depois de uma seleção e observado um período de pelo menos 2 semanas sem fazer uso de qualquer medicação, os voluntários receberão em cada um dos dois períodos de internamento (aproximadamente 24 horas), 01 comprimido com 1 g de cefalexina de uma das formulações. Serão realizados exames laboratoriais antes e após o estudo.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. Os critérios de inclusão e exclusão estão relacionados, bem como os riscos da pesquisa. O Termo de Consentimento é adequado e contém todas as informações para que o voluntário decida se quer ou não participar do estudo.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e

atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

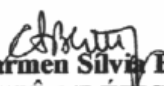
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de novembro de 2003.


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

8- APÊNDICES

8.1- TERMO DE CONSENTIMENTO

Estudo de Bioequivalência de uma Formulação de Mononitrato de Isossorbida comprimido de 40 mg dos Laboratórios Biosintética Ltda versus uma Formulação de Mononitrato de Isossorbida comprimido de 40 mg de Referência dos Laboratórios Baldacci (Monocordil®) em Voluntários Sadios de Ambos os Sexos.

GDN 61/03-MS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Responsável: Prof. Dr. Gilberto De Nucci

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG nº _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do médico/pesquisador Prof. Dr. Gilberto De Nucci da Unidade de Farmacologia Clínica Miguel Servet - Departamento de Farmacologia - Unicamp. O abaixo-assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar se um comprimido contendo 40 mg de Mononitrato de Isossorbida produzido pelos Laboratórios Biosintética Ltda- Formulação Teste - atinge níveis no sangue equivalentes ao Monocordil® dos Laboratórios Baldacci - Formulação Referência. Este tipo de experimento faz parte do procedimento para registro e aprovação do uso da Formulação Teste. A Formulação Referência já é um medicamento registrado e aprovado para uso no Brasil. Você receberá as duas medicações, cada uma em uma ocasião diferente. A ordem em que você tomará cada medicação obedecerá a um sorteio. Deste estudo participarão 26 voluntários.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

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

Durante o estudo, será internado duas vezes por aproximadamente 37 horas, cada período, com intervalo mínimo de 7 dias. Em cada internamento, **a)** será colhida uma amostra de sangue para dosagem de creatinina, hemoglobina, hematócrito, transaminases, e, para os voluntários do sexo feminino, β -HCG; **b)** será administrado um comprimido contendo 40 mg de Mononitrato de Isossorbida, acompanhado de 200mL de água sem gás; **c)** serão coletadas 22 amostras de sangue de 4 mL, cada, através de agulha introduzida em veia superficial para a dosagem do medicamento e mais uma amostra de 10 mL antes da administração da medicação (somente na primeira internação) para o controle do método; **d)** em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura; **e)** serão também servidas refeições padronizadas (jantar e ceia [se não interferir com o horário de jejum] na noite da internação; almoço, lanche da tarde, jantar e ceia, no dia de administração do medicamento; desjejum, no dia de alta) ou bebidas em horários preestabelecidos. Um total de 190 mL de sangue será colhido durante todo o estudo.

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

RESPONSABILIDADES

É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que esteja em boa saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações e que tampouco tenha participado de outro estudo clínico com medicamentos nos últimos 3 meses. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo: **a)** não pode ser dependente de drogas ou álcool e caso o investigador tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas; **b)** não pode ter doado (ou retirado por qualquer motivo) sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo ou ter doado 1500 mL (um litro e meio) no período de um ano antecedendo o estudo; **c)** não pode tomar bebidas contendo cafeína e xantinas (chocolate, café, chá, coca-cola, etc) nas 12 horas que antecedem as internações até a última coleta.

É ainda de responsabilidade do voluntário em relação à sua participação no ensaio clínico: **a)** comparecer às internações na data e horários informados; **b)** permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos 10 horas e 30 minutos) em cada internação; **c)** tomar toda a medicação prevista; **d)** ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; **e)** retornar à Unidade na data, horário e local combinados, para realização da consulta e exames de alta, independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A administração por boca de Mononitrato de Isossorbida de maneira continuada pode causar efeitos colaterais como taquicardia, palpitações e hipotensão. Entretanto, o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração de dose única de Isossorbida tem menor probabilidade de aparecer. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

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

BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES

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

INTERCORRÊNCIAS

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

Durante o período de 180 dias, a partir da data da assinatura deste termo, o voluntário estará assegurado (Seguro de Vida em Grupo) pela empresa Executivos Seguros (Sul America Aetna). Contarão também com plano de saúde para cobertura de despesas relacionadas com eventos adversos através da Trial Plan.

RESSARCIMENTO

De acordo com valores previamente estabelecidos (R\$ 400,00), os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo despendidos na realização do supracitado estudo clínico após a consulta de alta. Caso desista ou seja dispensado antes do estudo ser finalizado o voluntário receberá proporcionalmente ao tempo despendido, no final do estudo. Entende também que a desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

Estima-se que, durante o período de sua participação no Estudo, os voluntários terão como despesa apenas os gastos de deslocamento da residência ou trabalho até a Unidade de Farmacologia Clínica Miguel Servet para internação ou à Unidade Clínica para a realização dos exames e consultas, bem como coleta de amostras após a alta, perfazendo um total estimado de 02 visitas. Ainda deve ser previsto eventuais visitas posteriores para acompanhamento dos eventos adversos. O ressarcimento destas despesas já está incluído no valor estabelecido no item acima.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

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

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

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

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

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

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética e Pesquisa Clínica, ou autoridades do(s) órgão(s) regulamentar(es) envolvido(s) terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações

aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem no entanto violar a condição de que tais informações são confidenciais. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está também autorizando tal acesso, mesmo se você se retirar do Estudo.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o Centro de Pesquisas Cartesius (Fone 3091-7493) e solicitar que a mesma contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os mesmos nos telefones indicados no final deste Termo de Consentimento.

Poderá contactar o Dr. Gilberto De Nucci para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário.

Poderá contactar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp, pelo telefone 3788-8936, para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

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

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

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

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

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

Campinas, ____/____/____

Nome do voluntário	Data	Assinatura
Pessoa que está obtendo o termo de consentimento	Data	Assinatura
Testemunha	Data	Assinatura

(Somente necessário se o voluntário não souber ler)

CONTROLE INTERNO

Nº do Estudo: ____/____ Nº do Voluntário: _____

Telefones para contato:

CENTRO DE PESQUISAS CARTESIUS (11) 3091-7493, (11) 5181-7904

Dr. GILBERTO DE NUCCI (19) 3251-6928, (19) 9792-4032, (11) 3091-7493

Dra. MIRIAM PRADO GALUPPO (19) 3251-2983, (11) 3091-7493, (11) 5908- 6000

Dr. CELSO H. DE OLIVEIRA (19) 9112 8820, (11) 3091-7493, (11) 5908-6000

8.2- SEQUÊNCIA DE ADMINISTRAÇÃO DAS DUAS FORMULAÇÕES DO 5-MNIS EM 26 VOLUNTÁRIOS SADIOS

Vol	Sexo	Seq	Período I	Período II
01	M	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
02	M	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
03	M	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
04	M	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
05	M	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
06	M	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
07	M	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
08	M	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
09	M	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
10	M	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
11	M	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
12	M	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
13	M	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
14	F	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
15	F	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
16	F	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
17	F	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
18	F	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
19	F	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
20	F	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
21	F	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
22	F	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
23	F	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
24	F	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]
25	F	1	MONOCORDIL [®]	5-MNIS Biosintética
26	F	2	5-MNIS Biosintética	MONOCORDIL [®]

8.3- REFEIÇÕES SERVIDAS AOS VOLUNTÁRIOS DURANTE O PERÍODO DE CONFINAMENTO PARA COLETA DAS AMOSTRAS

Dieta geral isenta de xantina em torno de 2500 a 2700 Kcal que corresponde a 5 refeições (café da manhã, almoço, lanche da tarde, jantar e ceia)

CAFÉ DA MANHÃ

Suco Tang (qualquer sabor)

pão com manteiga

01 fruta

ALMOÇO

arroz

feijão

01 porção de legume ou verdura refogada

01 porção de salada

01 porção de carne branca (frango)

01 sobremesa (fruta ou doce)

LANCHE DA TARDE

Suco Tang (qualquer sabor)

bolacha salgada

JANTAR

arroz

feijão

01 porção de legume ou verdura refogada

01 porção de salada

01 porção de carne branca (frango ou peru)

01 sobremesa (fruta ou doce)

CEIA

Suco Tang de qualquer sabor

bolacha salgada

8.4- DADOS DA VALIDAÇÃO INTRALOTE DE TODO O ESTUDO

Lote 6103LAD01									
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	44,4	-26,0	Não	291	-3,0	Sim	1770	-1,7	Sim
	52,7	-12,2	Sim	276	-8,0	Sim	1930	7,2	Sim
	51,3	-14,5	Sim	265	-11,7	Sim	1350	-25,0	Não
	38,9	-35,2	Não	231	-23,0	Não	1680	-6,7	Sim
Média		52			277			1790	
CV (%)		12,3			9,2			13,7	
Exatidão (%)		86,7			92,3			99,4	

Lote 6103LAD02									
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	55	-8,3	Sim	294	-2,0	Sim	1700	-5,6	Sim
	53,5	-10,8	Sim	328	9,3	Sim	1380	-23,3	Não
	47,4	-21,0	Não	269	-10,3	Sim	1750	-2,8	Sim
Média		54,2			297			1720	
CV (%)		7,4			10,0			11,7	
Exatidão (%)		90,3			99,0			95,6	

Lote		6103LAD03							
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?
	59,1	-1,5	Sim	309	3,0	Sim	1720	-4,4	Sim
	46,8	-22,0	Não	438	46,0	Não	2060	14,4	Sim
	65	8,3	Sim	362	20,7	Não	1890	5,0	Sim
	67,5	12,5	Sim	343	14,3	Sim	1700	-5,6	Sim
Média		63,9			326			1840	
CV (%)		14,4			16,7			9,1	
Exatidão (%)		106,5			108,7			102,2	

Lote		6103LAD04							
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?
	53,5	-10,8	Sim	215	-28,3	Não	1850	2,8	Sim
	54,1	-9,8	Sim	282	-6,0	Sim	1460	-18,9	Não
	43	-28,3	Não	272	-9,3	Sim	1600	-11,1	Sim
	55,3	-7,8	Sim	263	-12,3	Sim	1780	-1,1	Sim
Média		57,721			305,00			1807,9	
CV (%)		9,9			9,7			9,8	
Exatidão (%)		96,2			101,7			100,4	

Lote		6103LAD05							
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?
	54,4	-9,3	Sim	291	-3,0	Sim	1530	-15,0	Sim
	44,4	-26,0	Não	400	33,3	Não	2030	12,8	Sim
	68,7	14,5	Sim	337	12,3	Sim	2230	23,9	Não
Média		61,6			314			1780	
CV (%)		19,8			17,4			20,3	
Exatidão (%)		102,7			104,7			98,9	

Lote		6103LAD06							
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen-tração	Desvio (%)	Aprovado?
	64,4	7,3	Sim	323	7,7	Sim	1820	1,1	Sim
	54,7	-8,8	Sim	382	27,3	Não	1860	3,3	Sim
	61,2	2,0	Sim	346	15,3	Não	1870	3,9	Sim
	58,5	-2,5	Sim	314	4,7	Sim	1690	-6,1	Sim
Média		59,7			318			1810	
CV (%)		6,9			9,5			4,6	
Exatidão (%)		99,5			106,0			100,6	

Lote			6103LAD07						
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	60,9	1,5	Sim	334	11,3	Sim	1780	-1,1	Sim
	55,4	-7,7	Sim	431	43,7	Não	1810	0,6	Sim
	71,7	19,5	Não	336	12,0	Sim	2100	16,7	Não
	59,6	-0,7	Sim	334	11,3	Sim	1860	3,3	Sim
Média		58,6			335			1820	
CV (%)		14,6			0,4			9,3	
Exatidão (%)		97,7			111,7			101,1	

Lote			6103LAD08RJ						
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	51,6	-14,0	Sim	273	-9,0	Sim	2190	21,7	Não
	59,9	-0,2	Sim	298	-0,7	Sim	1930	7,2	Sim
	59,3	-1,2	Sim	273	-9,0	Sim	1170	-35,0	Não
	40,7	-32,2	Não	245	-18,3	Não	1860	3,3	Sim
Média		56,9			281			1900	
CV (%)		15,7			7,7			22,9	
Exatidão (%)		94,8			93,7			105,6	

Lote			6103LAD09						
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	59,7	-0,5	Sim	283	-5,7	Sim	1710	-5,0	Sim
	51,8	-13,7	Sim	362	20,7	Não	2030	12,8	Sim
	56,7	-5,5	Sim	373	24,3	Não	1940	7,8	Sim
	60,4	0,7	Sim	333	11,0	Sim	2020	12,2	Sim
Média		57,2			308			1920	
CV (%)		6,8			13,1			7,8	
Exatidão (%)		95,3			102,7			106,7	

Lote			6103LAD10						
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	51,3	-14,5	Sim	320	6,7	Sim	1690	-6,1	Sim
	53,5	-10,8	Sim	315	5,0	Sim	2600	44,4	Não
	77,3	28,8	Não	421	40,3	Não	1850	2,8	Sim
	61,7	2,8	Sim	343	14,3	Sim	1760	-2,2	Sim
Média		55,5			326			1770	
CV (%)		21,2			15,0			23,8	
Exatidão (%)		92,5			108,7			98,3	

Lote			6103LAD11RJ						
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	54,9	-8,5	Sim	308	2,7	Sim	1750	-2,8	Sim
	57,5	-4,2	Sim	319	6,3	Sim	1740	-3,3	Sim
	59	-1,7	Sim	346	15,3	Não	1350	-25,0	Não
Média		57,1			314			1740	
CV (%)		3,6			6,2			13,1	
Exatidão (%)		95,2			104,7			96,7	

Lote			6103LAD12						
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	65,1	8,5	Sim	316	5,3	Sim	1840	2,2	Sim
	49,8	-17,0	Não	387	29,0	Não	2250	25,0	Não
	69,4	15,7	Não	307	2,3	Sim	1770	-1,7	Sim
	58,8	-2,0	Sim	307	2,3	Sim	1540	-14,4	Sim
Média		62			310			1720	
CV (%)		13,7			12,5			17,2	
Exatidão (%)		103,3			103,3			95,6	

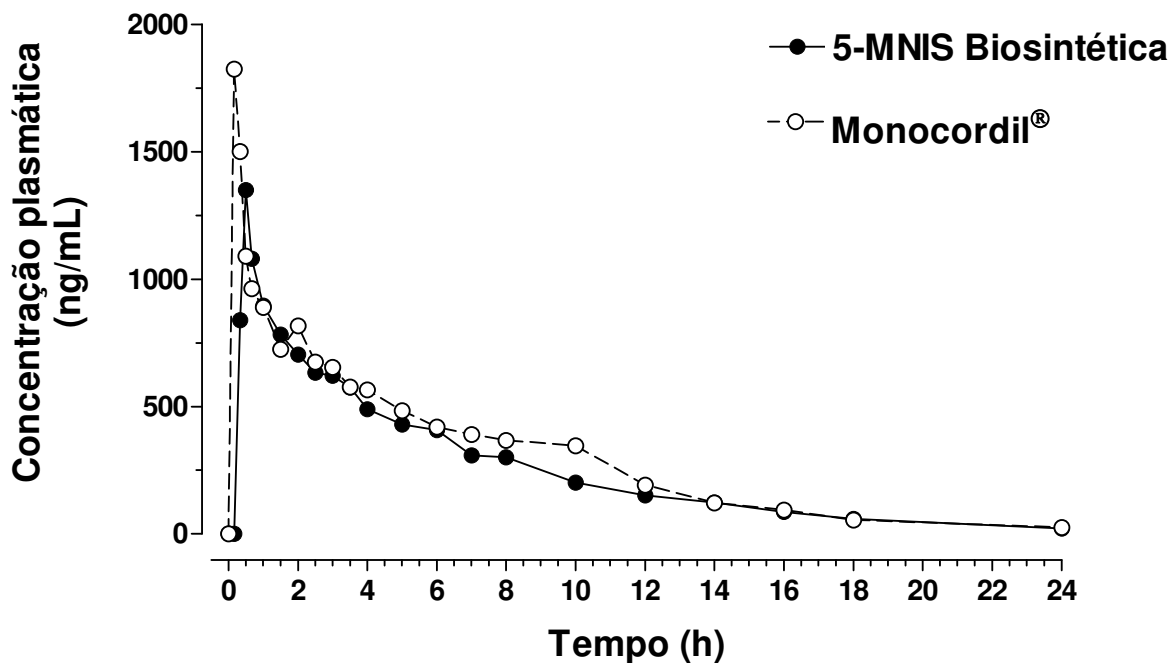
Lote			6103LAD13						
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	51,2	-14,7	Sim	266	-11,3	Sim	1820	1,1	Sim
	41,4	-31,0	Não	375	25,0	Não	1910	6,1	Sim
	65,6	9,3	Sim	288	-4,0	Sim	1700	-5,6	Sim
	52,2	-13,0	Sim	260	-13,3	Sim	1590	-11,7	Sim
	61,4	2,3	Sim	224	-25,3	Não	1150	-36,1	Não
Média		56,3			271			1760	
CV (%)		16,8			20,9			16,8	
Exatidão (%)		93,8			90,3			97,8	

Lote			6103LRE01						
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	61	1,7	Sim	210	-30,0	Não	1950	8,3	Sim
	41,5	-30,8	Não	298	-0,7	Sim	2060	14,4	Sim
	56,7	-5,5	Sim	344	14,7	Sim	2190	21,7	Não
Média		58,8			321			2000	
CV (%)		17,4			21,2			6,0	
Exatidão (%)		98,0			107,0			111,1	

Lote			6103LRE02						
Concentração nominal	CQA (60 ng/mL)			CQB (300 ng/mL)			CQC (1800 ng/mL)		
	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?	Concen- tração	Desvio (%)	Aprovado?
	50,7	-15,50	Não	276	-8,00	Sim	1920	6,67	Sim
	59,6	-0,67	Sim	284	-5,33	Sim	1680	-6,67	Sim
Média		59,6			280			1800	
CV (%)		10,6			2,0			9,4	
Exatidão (%)		99,3			93,3			100,0	

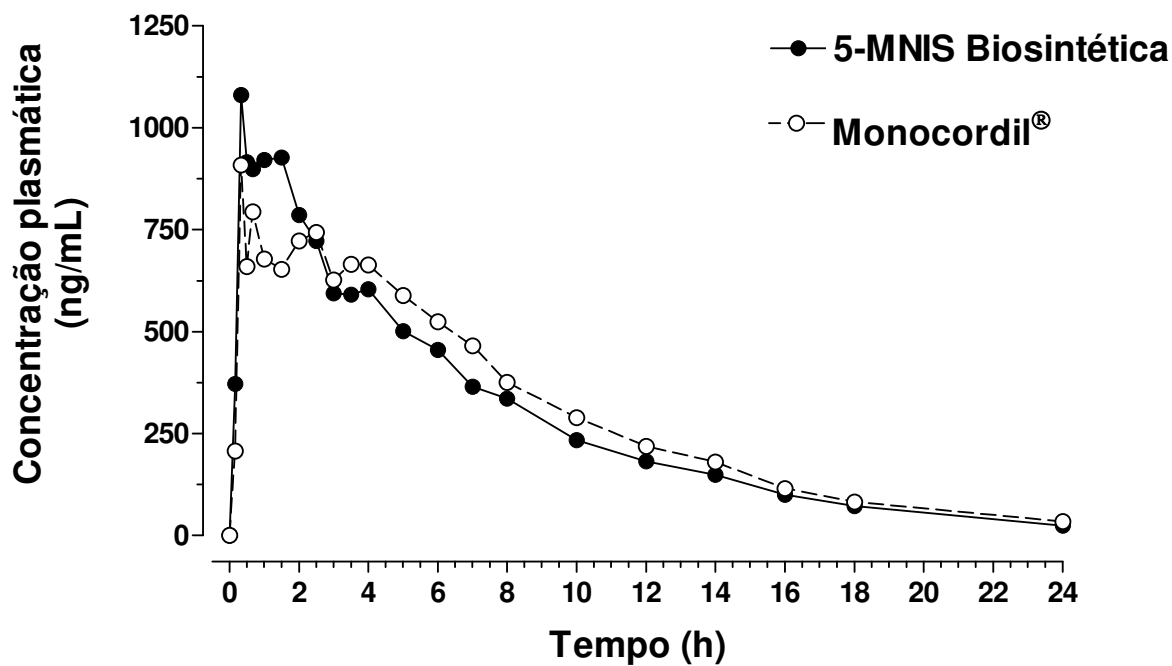
**8.5- CONCENTRAÇÕES INDIVIDUAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO (FIGURAS) E
PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS (TABELAS)**

Voluntário 1



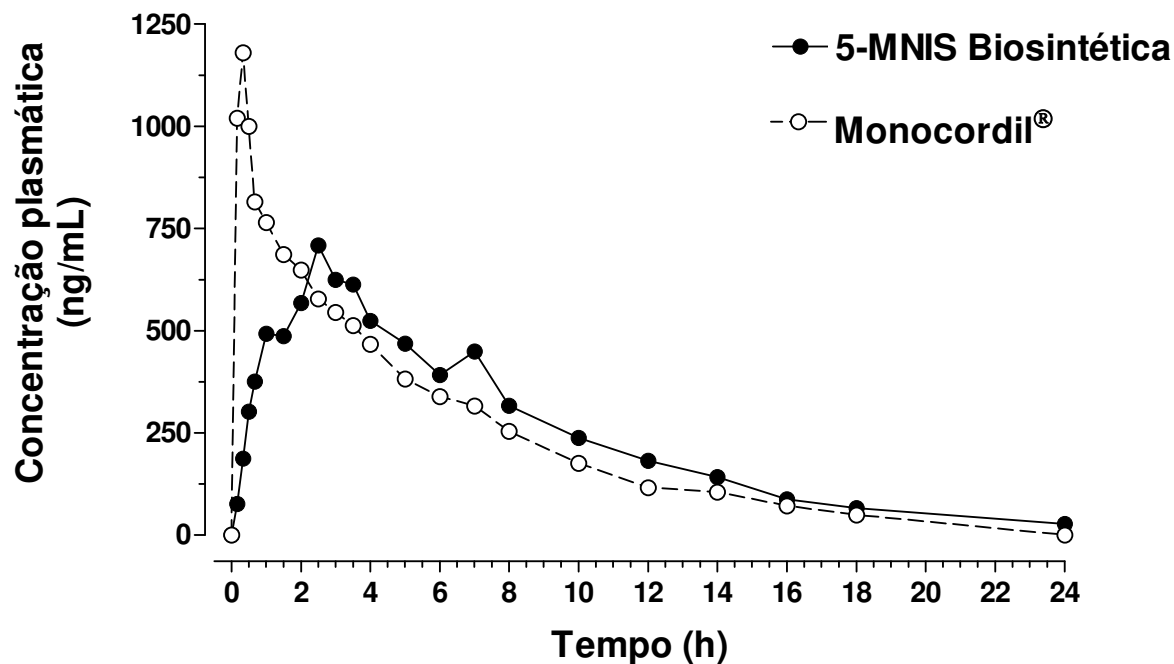
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
$ASC_{0-\infty}$ (ng * h/mL)	7253	6143
ASC_{0-t} (ng * h/mL)	7092	6019
AUC_{0-24h} (ng * h/mL)	7137	6058
C_{max} (ng/mL)	1820	1350
T_{max} (h)	0.17	0.50
$t_{1/2}$ (h)	4.50	3.99
K_e (1/h)	0.15	0.17

Voluntário 3



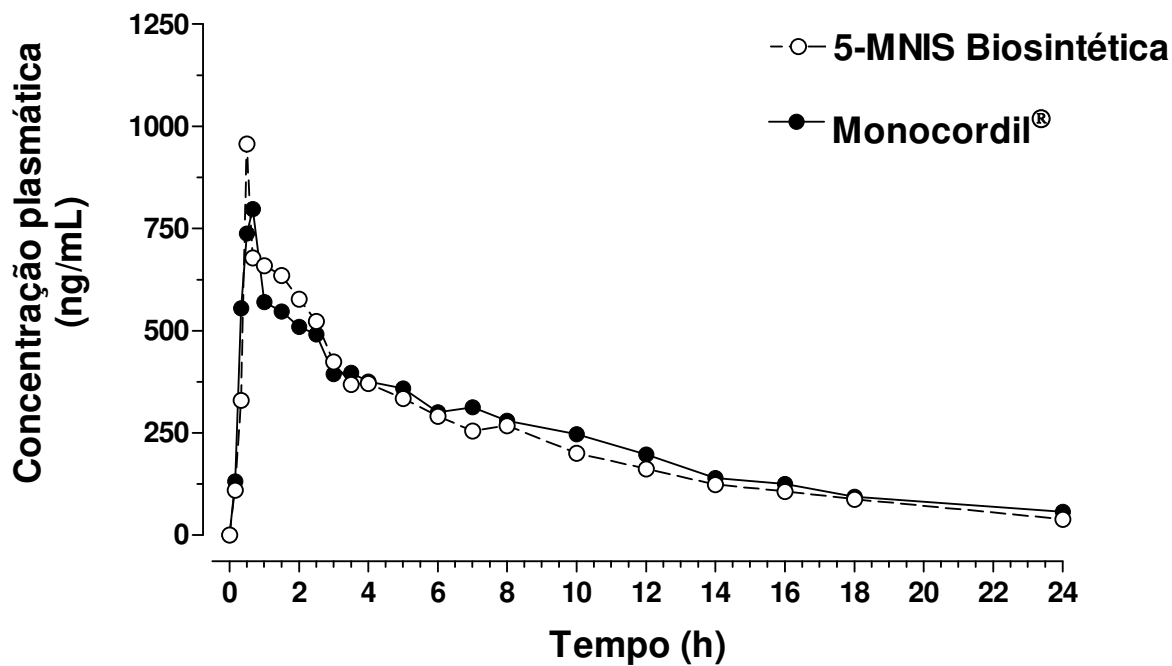
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	7347	6880
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	7118	6748
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	7161	6795
C _{max} (ng/mL)	909	1080
T _{max} (h)	0.33	0.33
t _{1/2} (h)	4.62	3.81
K _e (1/h)	0.15	0.18

Voluntário 4



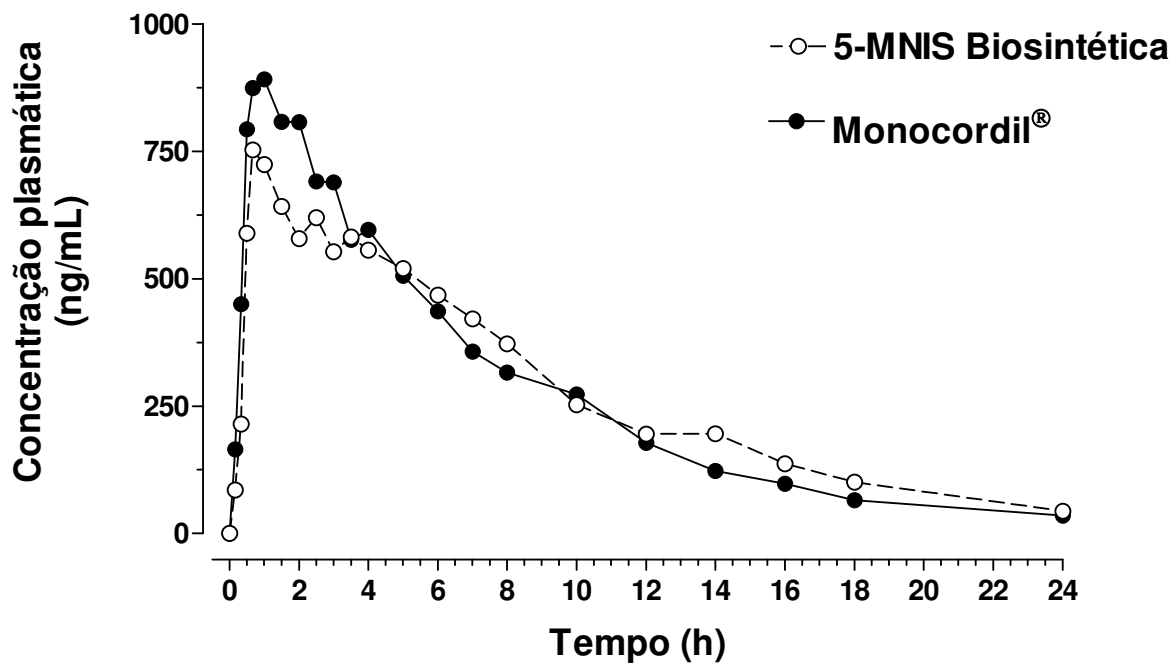
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	5546	5862
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	5284	5680
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	5449	5718
C _{max} (ng/mL)	1180	709
T _{max} (h)	0.33	2.50
t _{1/2} (h)	3.68	4.68
K _e (1/h)	0.19	0.15

Voluntário 5



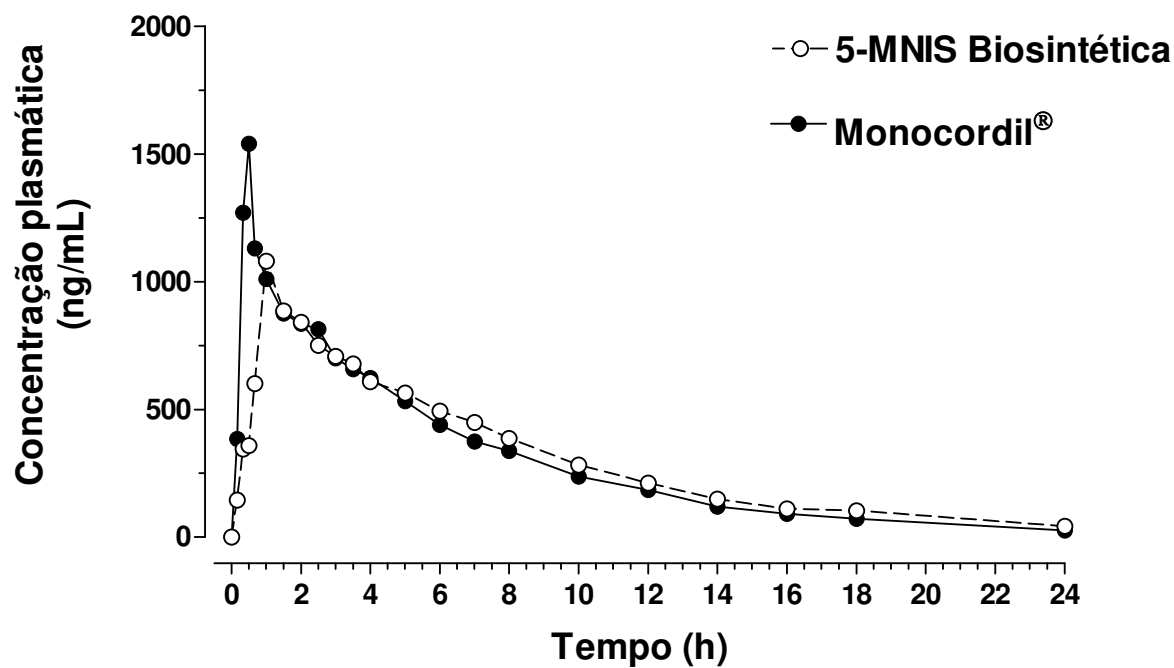
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	5409	6014
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	5083	5460
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	5115	5481
C _{max} (ng/mL)	957	798
T _{max} (h)	0.50	0.67
t _{1/2} (h)	5.90	6.70
K _e (1/h)	0.12	0.10

Voluntário 6



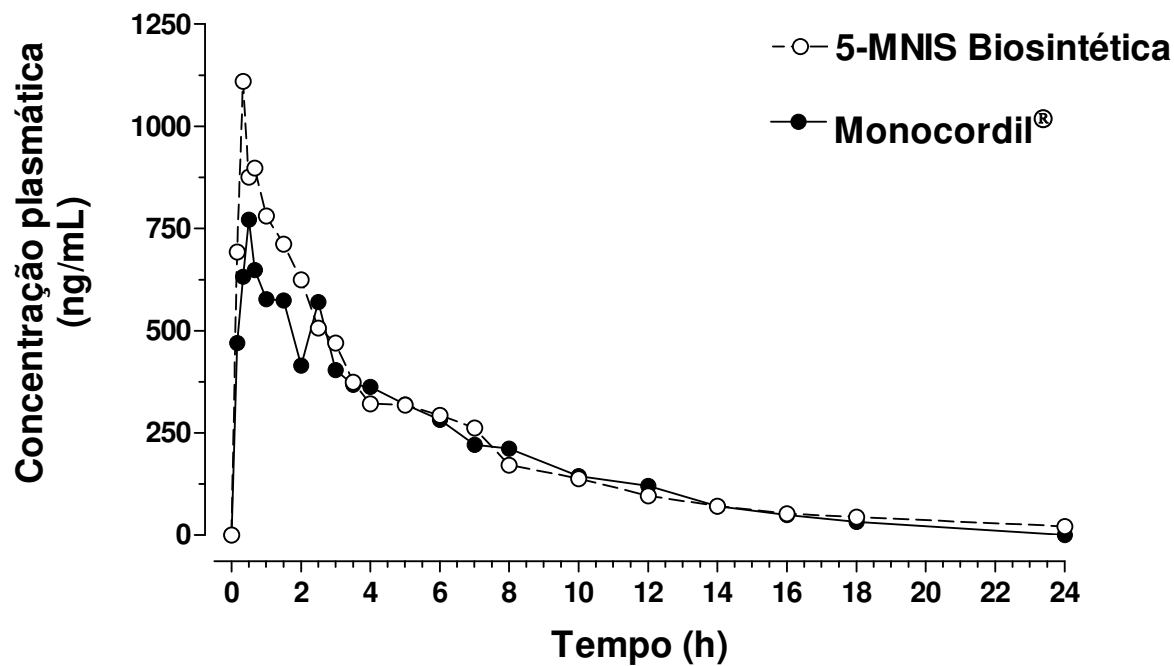
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	6873	6751
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	6568	6510
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	6610	6539
C _{max} (ng/mL)	753	891
T _{max} (h)	0.67	1.00
t _{1/2} (h)	4.85	4.78
K _e (1/h)	0.14	0.15

Voluntário 7



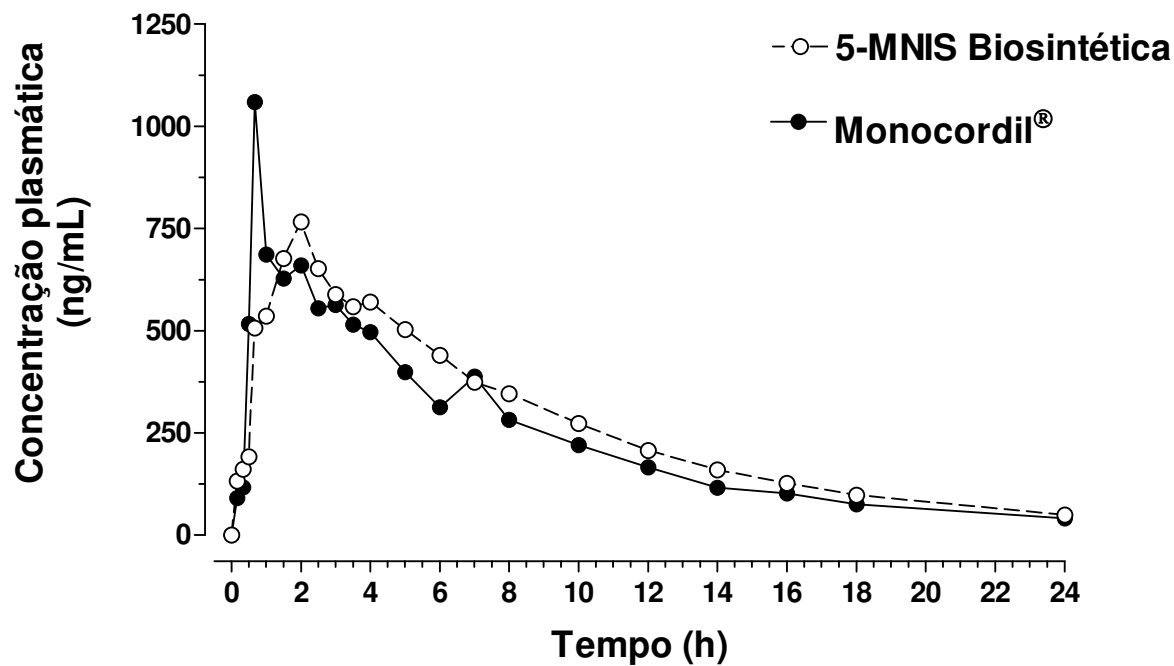
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	7518	7256
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	7212	7085
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	7259	7130
C _{max} (ng/mL)	1080	1540
T _{max} (h)	1.00	0.50
t _{1/2} (h)	5.08	4.42
K _e (1/h)	0.14	0.16

Voluntário 8



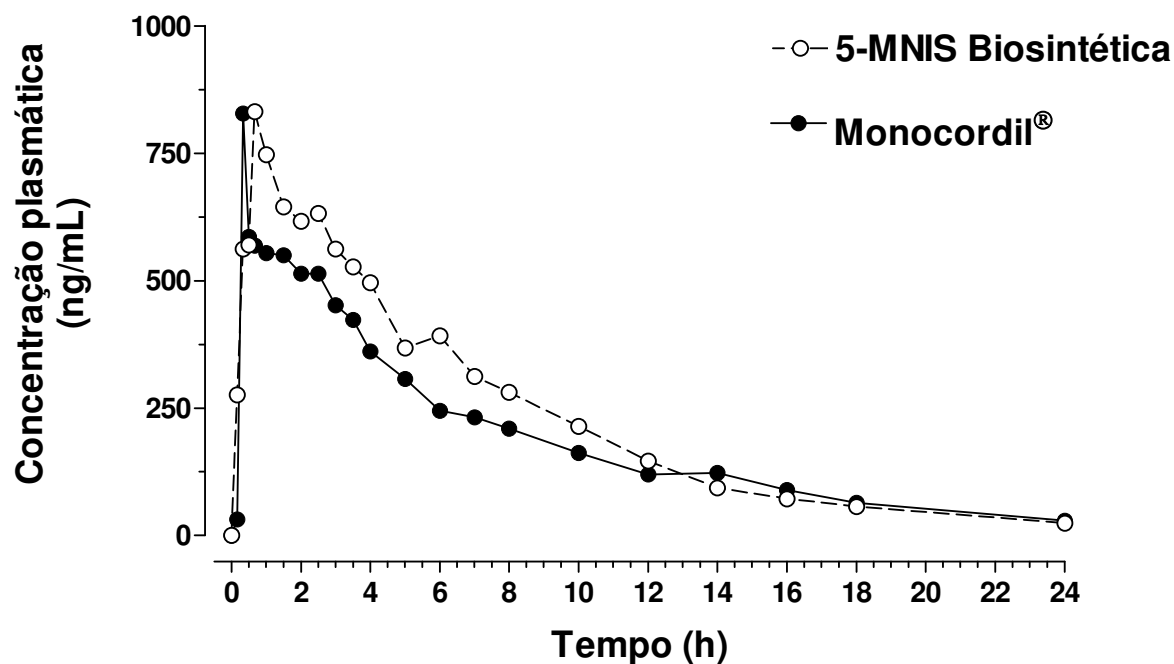
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
$ASC_{0-\infty}$ (ng * h/mL)	4814	4251
ASC_{0-t} (ng * h/mL)	4641	4077
AUC_{0-24h} (ng * h/mL)	4664	4196
C_{max} (ng/mL)	1110	772
T_{max} (h)	0.33	0.50
$t_{1/2}$ (h)	5.75	3.67
K_e (1/h)	0.12	0.19

Voluntário 9



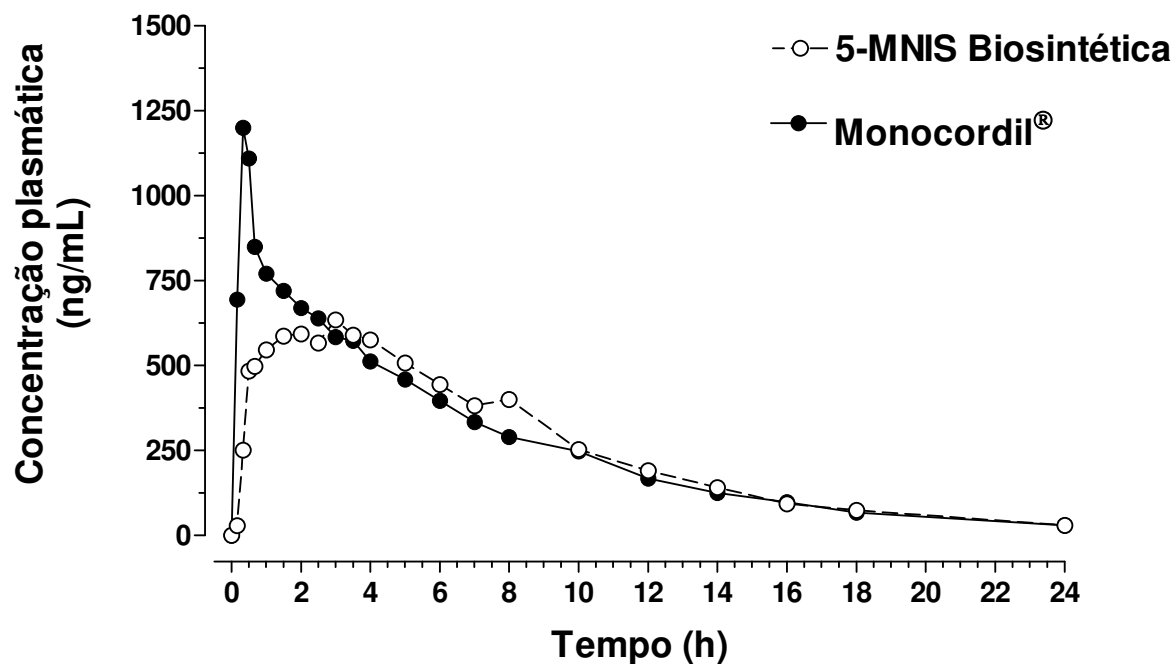
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	6762	5945
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	6359	5626
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	6390	5660
C _{max} (ng/mL)	766	1060
T _{max} (h)	2.00	0.67
t _{1/2} (h)	5.63	5.43
K _e (1/h)	0.12	0.13

Voluntário 10



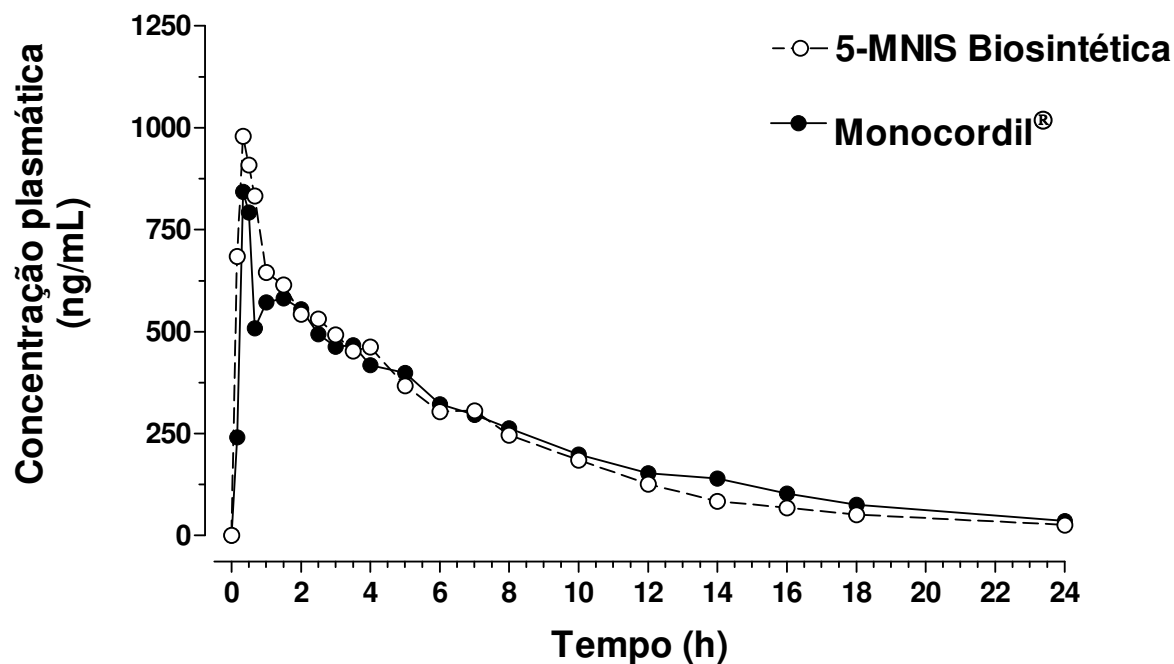
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
$ASC_{0-\infty}$ (ng * h/mL)	5605	4730
ASC_{0-t} (ng * h/mL)	5428	4521
AUC_{0-24h} (ng * h/mL)	5461	4546
C_{max} (ng/mL)	832	828
T_{max} (h)	0.67	0.33
$t_{1/2}$ (h)	5.10	4.99
K_e (1/h)	0.14	0.14

Voluntário 12



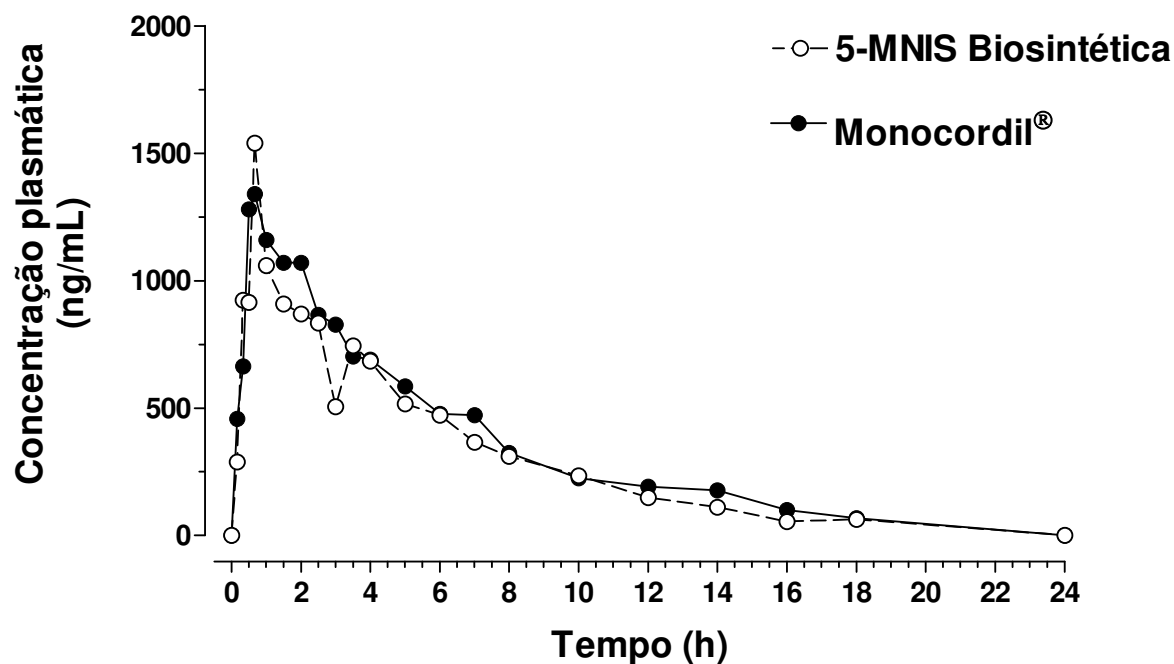
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	6257	6450
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	6044	6240
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	6087	6271
C _{max} (ng/mL)	635	1200
T _{max} (h)	3.00	0.33
t _{1/2} (h)	4.86	4.88
K _e (1/h)	0.14	0.14

Voluntário 13



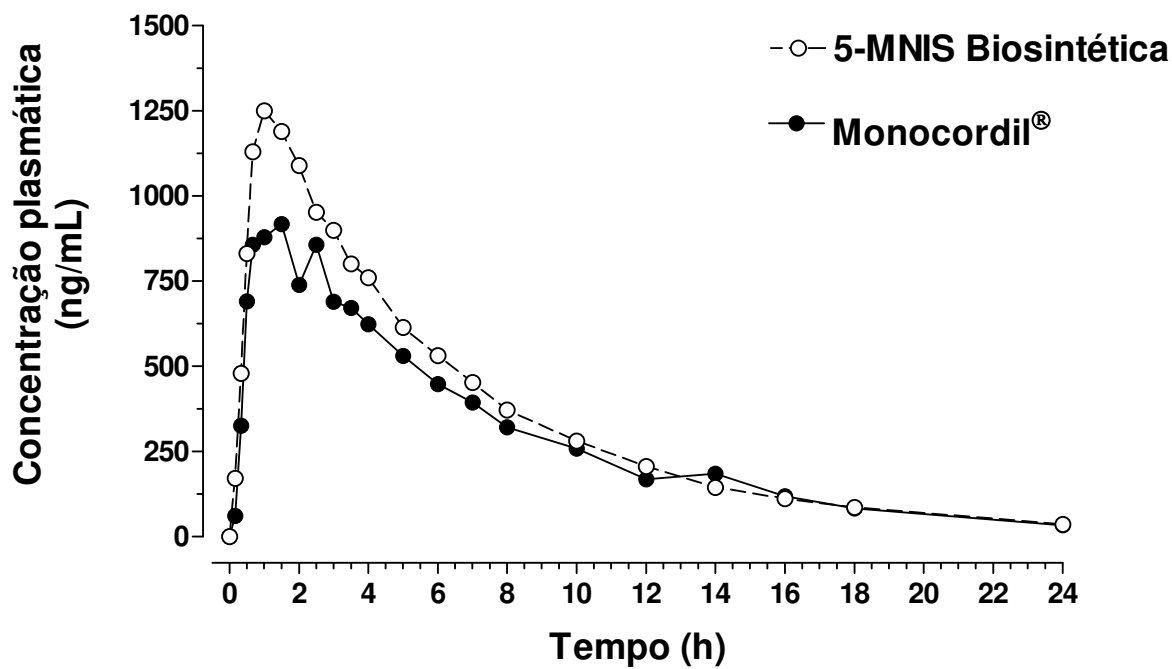
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	5309	5530
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	5094	5241
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	5119	5269
C _{max} (ng/mL)	979	843
T _{max} (h)	0.33	0.33
t _{1/2} (h)	5.80	5.67
K _e (1/h)	0.12	0.12

Voluntário 15



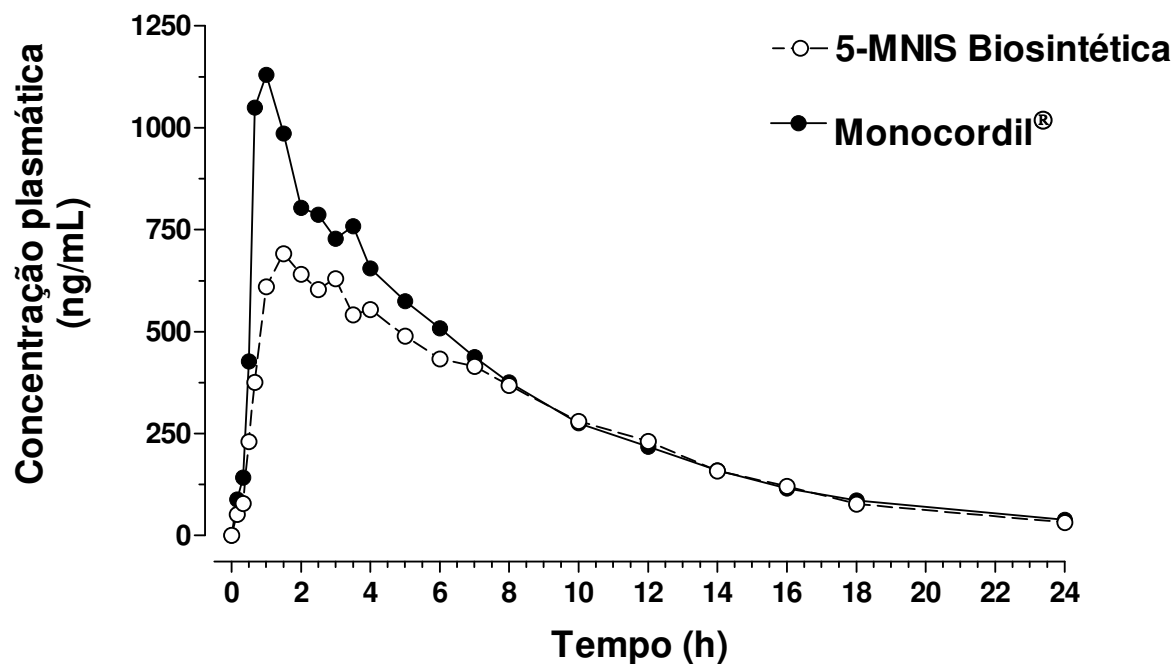
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	6890	7870
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	6544	7455
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	6777	7686
C _{max} (ng/mL)	1540	1340
T _{max} (h)	0.67	0.67
t _{1/2} (h)	3.79	4.25
K _e (1/h)	0.18	0.16

Voluntário 16



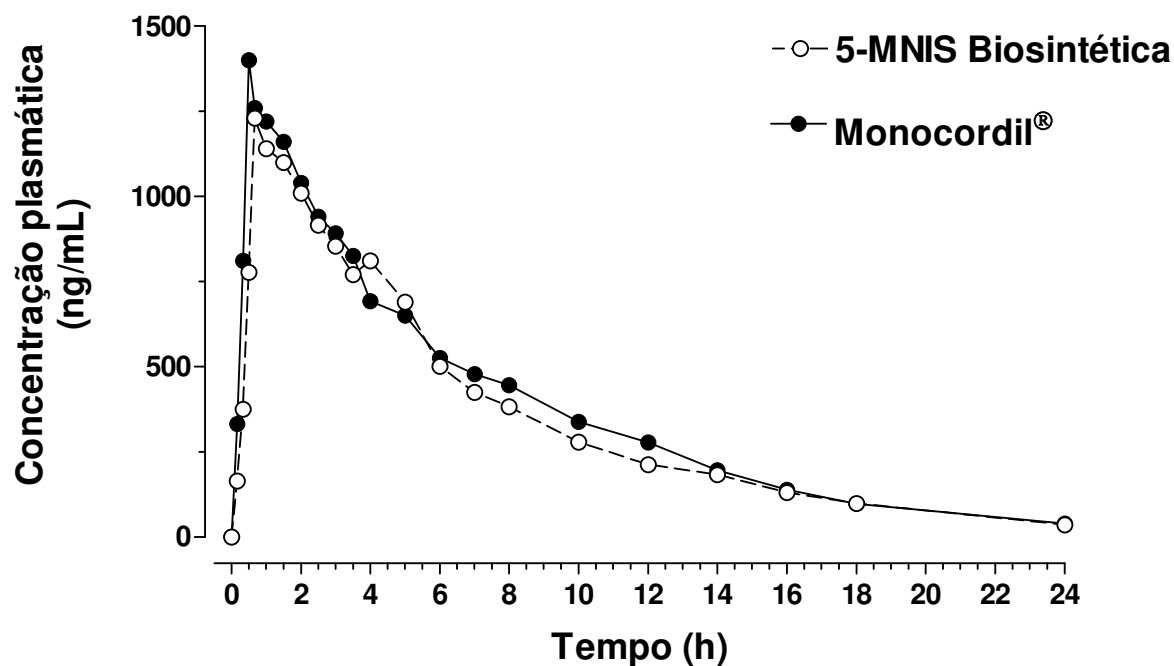
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	8408	7093
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	8149	6873
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	8193	6919
C _{max} (ng/mL)	1250	918
T _{max} (h)	1.00	1.50
t _{1/2} (h)	4.92	4.48
K _e (1/h)	0.14	0.15

Voluntário 18



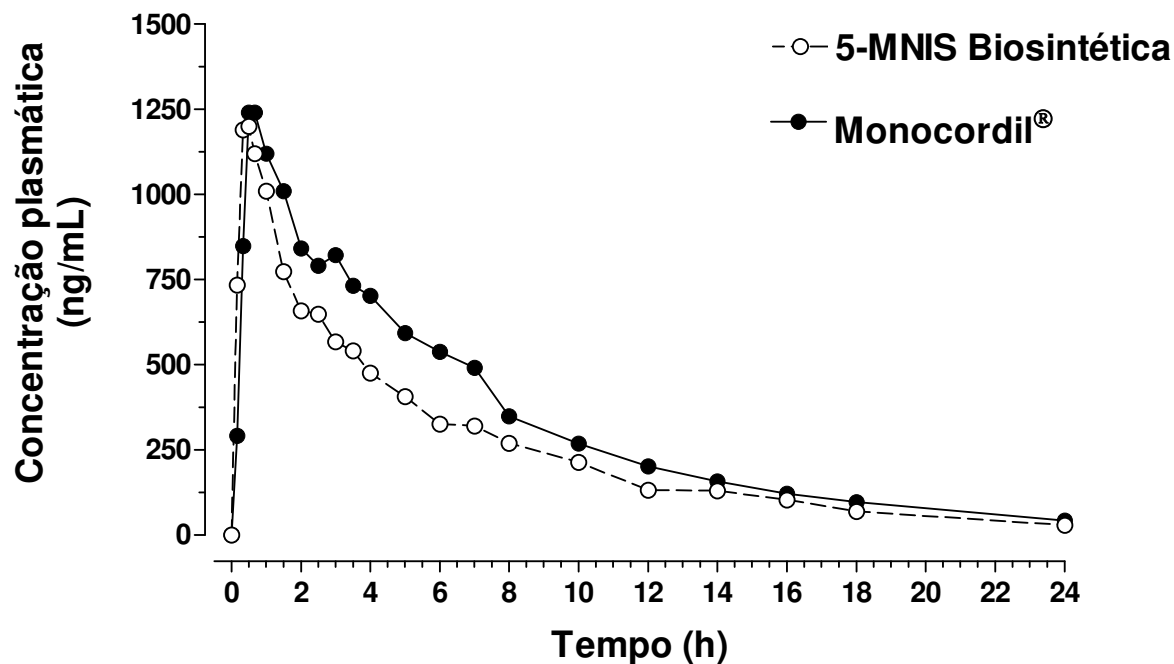
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	6395	7695
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	6206	7411
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	6243	7451
C _{max} (ng/mL)	691	1130
T _{max} (h)	1.50	1.00
t _{1/2} (h)	4.17	5.10
K _e (1/h)	0.17	0.14

Voluntário 19



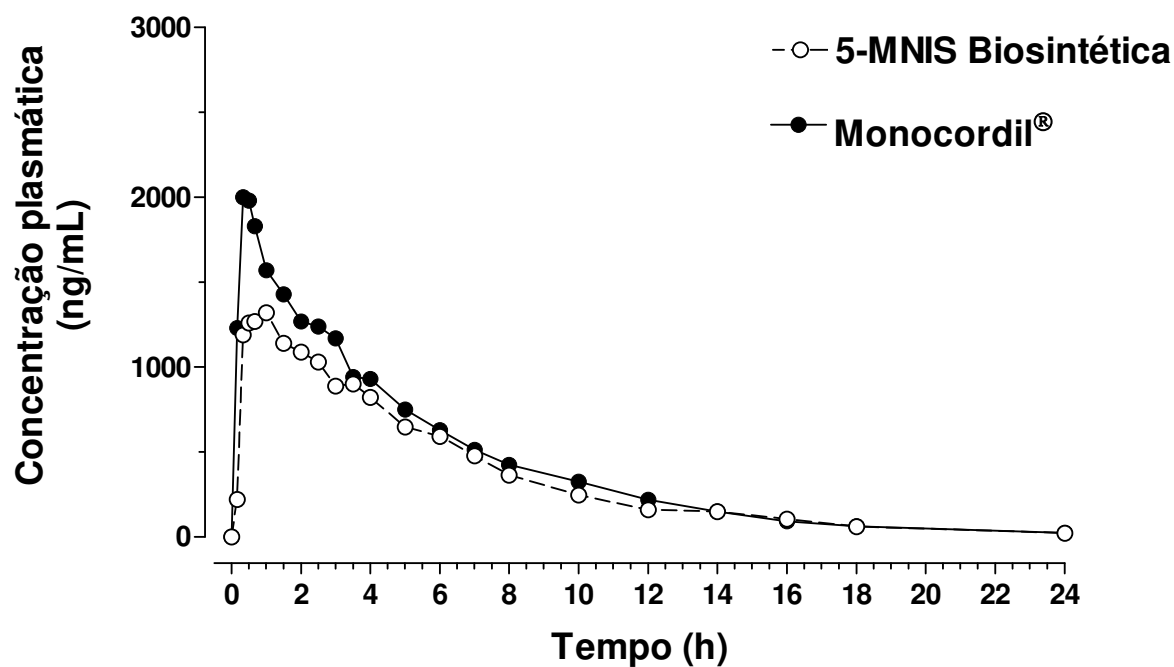
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	8424	9129
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	8197	8885
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	8250	8934
C _{max} (ng/mL)	1230	1400
T _{max} (h)	0.67	0.50
t _{1/2} (h)	4.31	4.27
K _e (1/h)	0.16	0.16

Voluntário 20



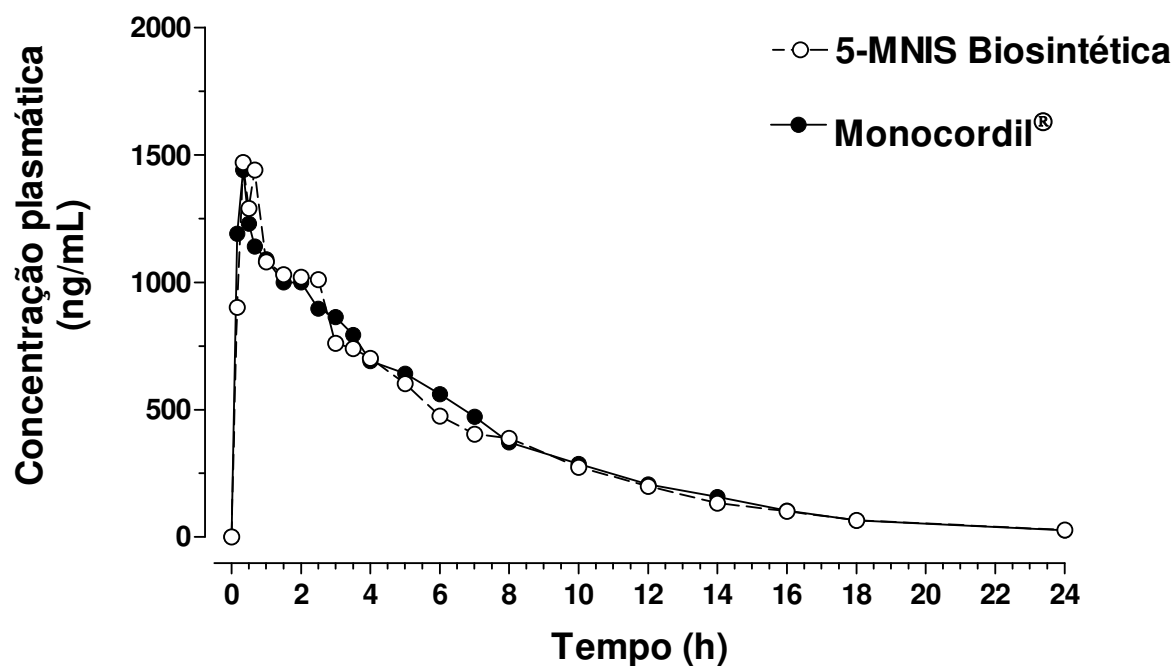
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	6307	8249
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	6115	7927
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	6151	7969
C _{max} (ng/mL)	1200	1240
T _{max} (h)	0.50	0.50
t _{1/2} (h)	4.57	5.29
K _e (1/h)	0.15	0.13

Voluntário 21



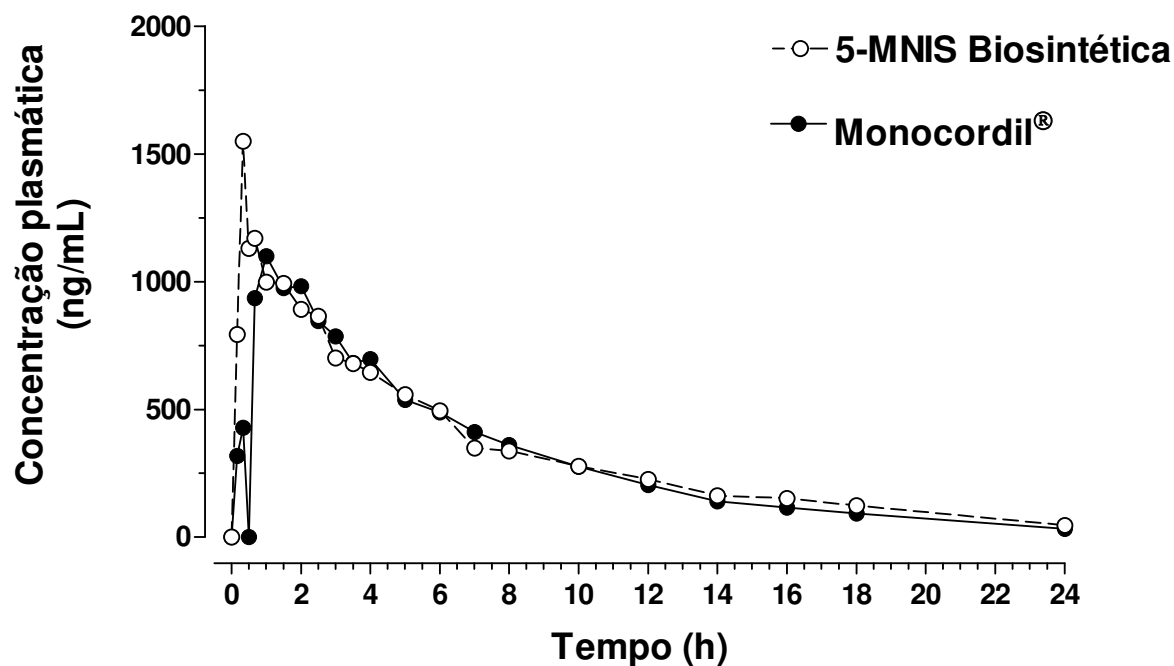
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	8447	10235
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	8312	10097
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	8361	10150
C _{max} (ng/mL)	1320	2000
T _{max} (h)	1.00	0.33
t _{1/2} (h)	3.97	3.79
K _e (1/h)	0.17	0.18

Voluntário 22



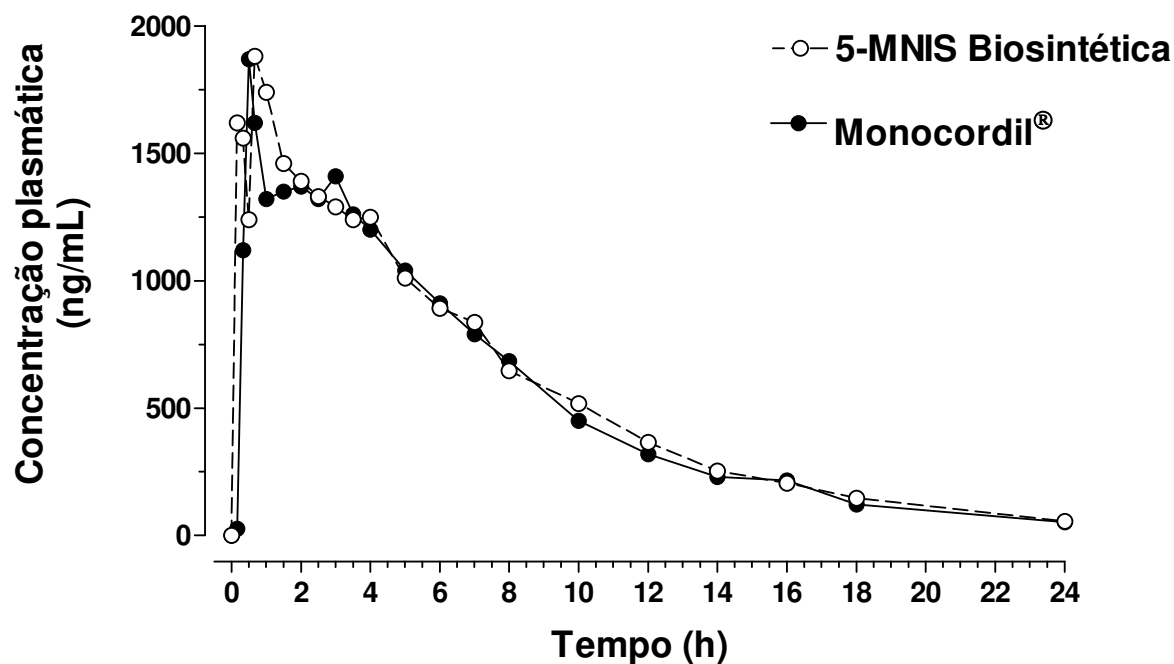
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	8159	8374
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	7992	8218
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	8039	8260
C _{max} (ng/mL)	1470	1440
T _{max} (h)	0.33	0.33
t _{1/2} (h)	4.26	4.19
K _e (1/h)	0.16	0.17

Voluntário 23



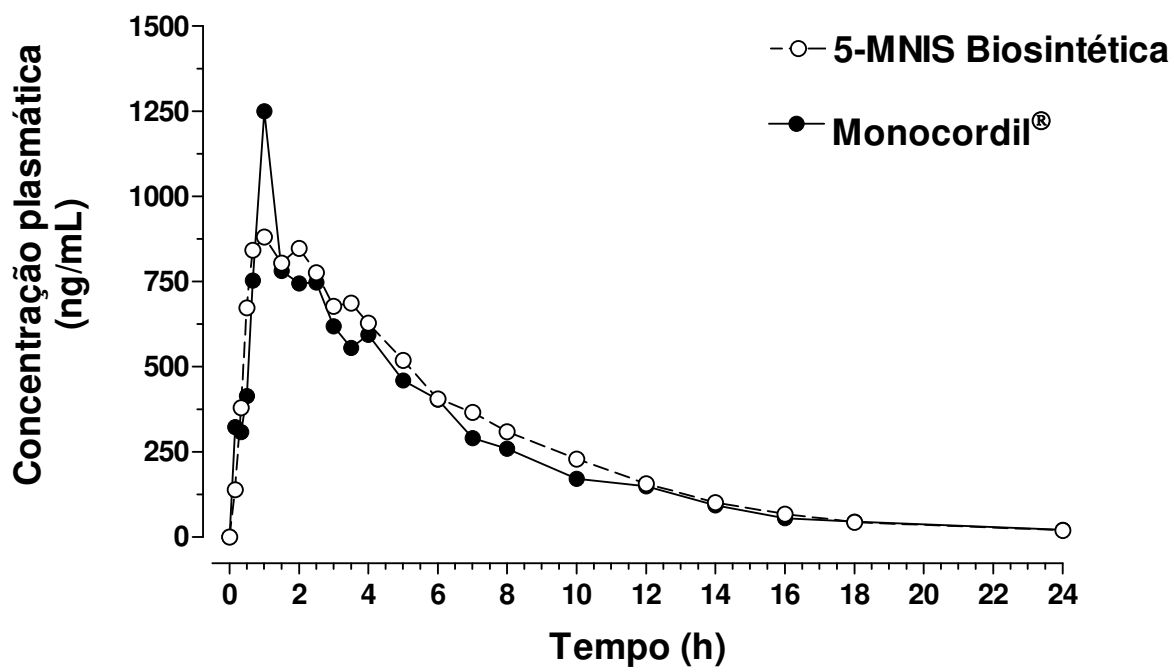
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
$ASC_{0-\infty}$ (ng * h/mL)	8248	7680
ASC_{0-t} (ng * h/mL)	7942	7459
AUC_{0-24h} (ng * h/mL)	7997	7511
C_{max} (ng/mL)	1550	1100
T_{max} (h)	0.38	1.00
$t_{1/2}$ (h)	4.58	4.64
K_e (1/h)	0.15	0.15

Voluntário 24



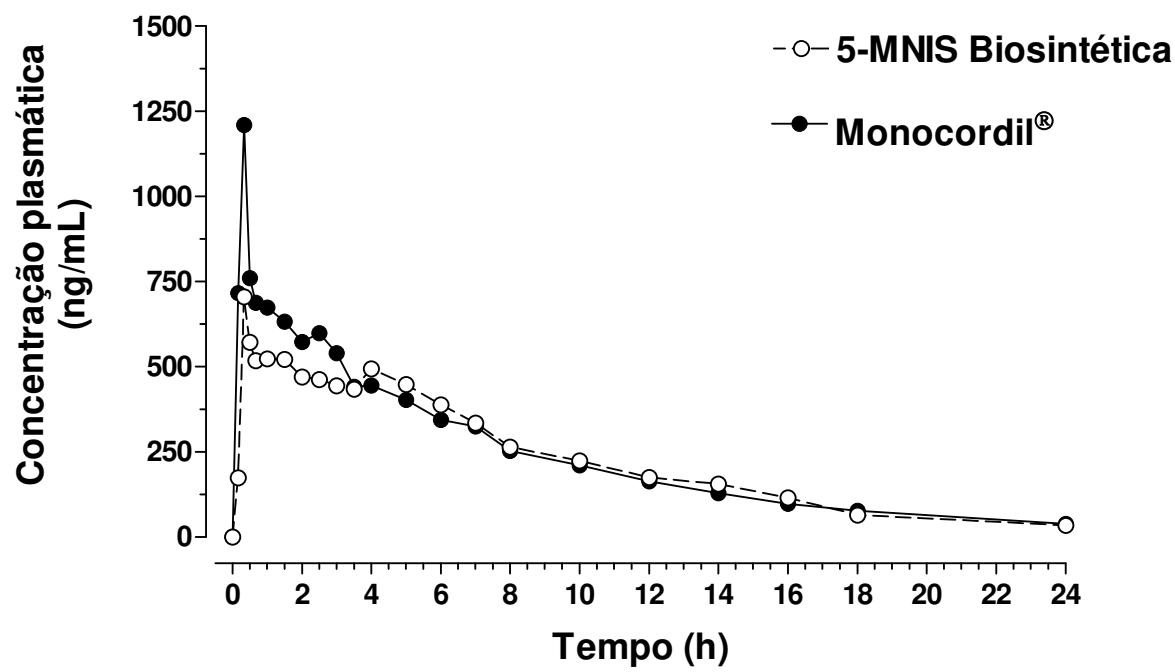
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	13627	12832
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	13283	12502
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	13364	12579
C _{max} (ng/mL)	1880	1870
T _{max} (h)	0.67	0.50
t _{1/2} (h)	4.28	4.40
K _e (1/h)	0.16	0.16

Voluntário 25



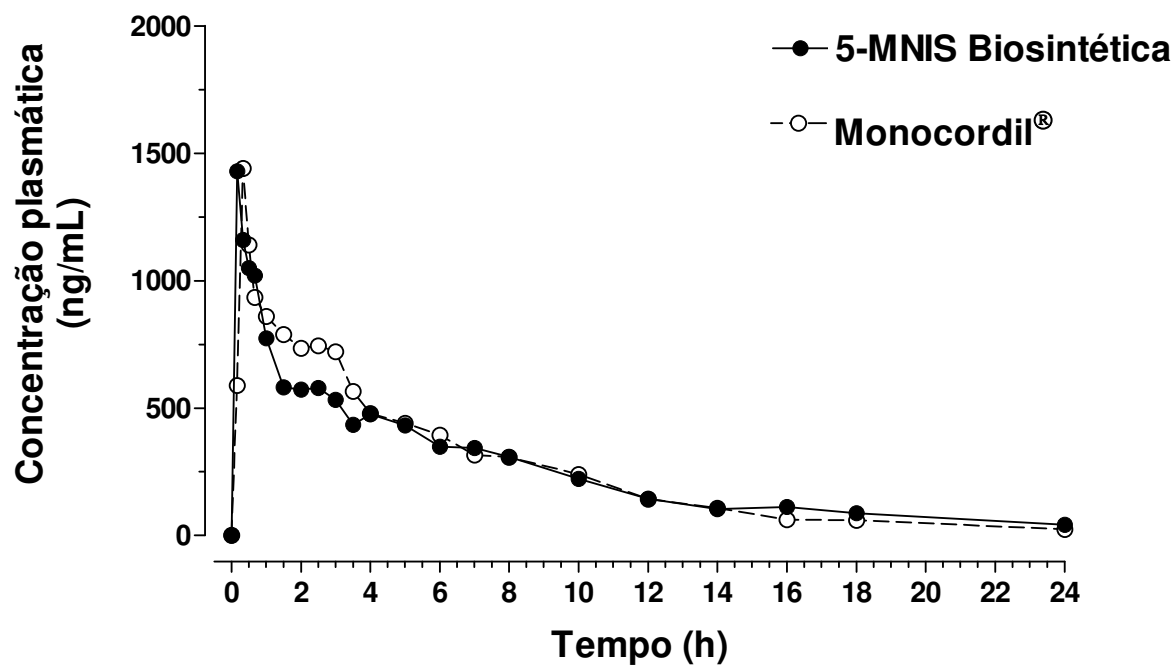
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	6332	5919
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	6218	5740
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	6250	5781
C _{max} (ng/mL)	881	1250
T _{max} (h)	1.00	1.00
t _{1/2} (h)	3.93	5.76
K _e (1/h)	0.18	0.12

Voluntário 26



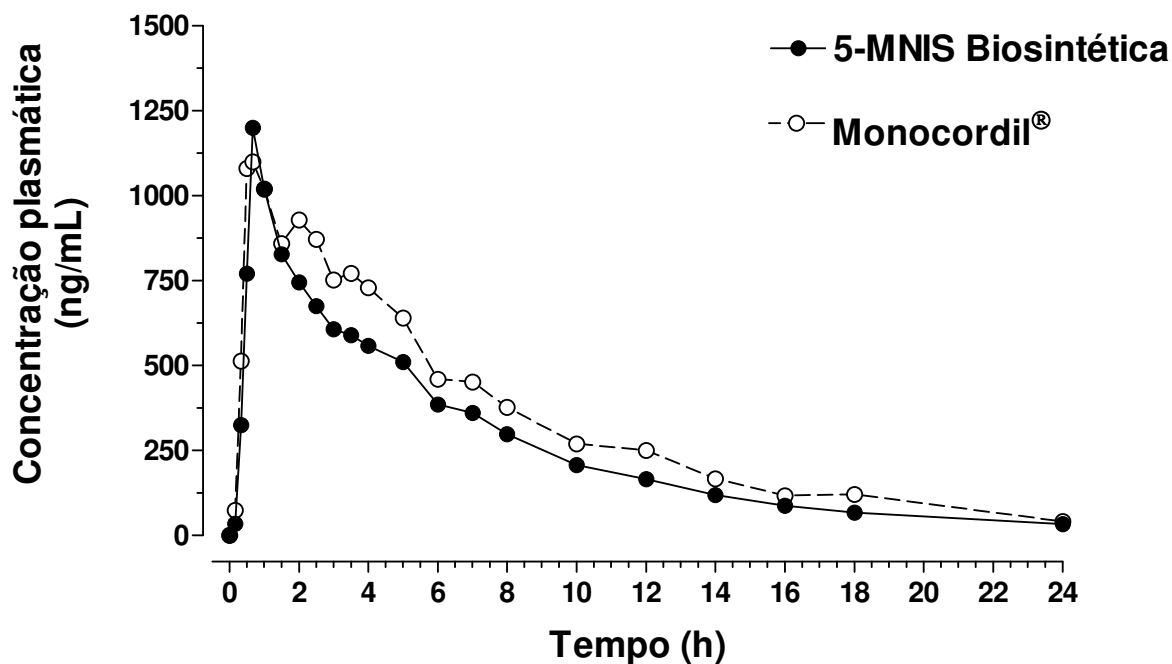
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	5634	6034
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	5375	5687
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	5399	5714
C _{max} (ng/mL)	705	1210
T _{max} (h)	0.33	0.33
t _{1/2} (h)	5.21	6.09
K _e (1/h)	0.13	0.11

Voluntário 102



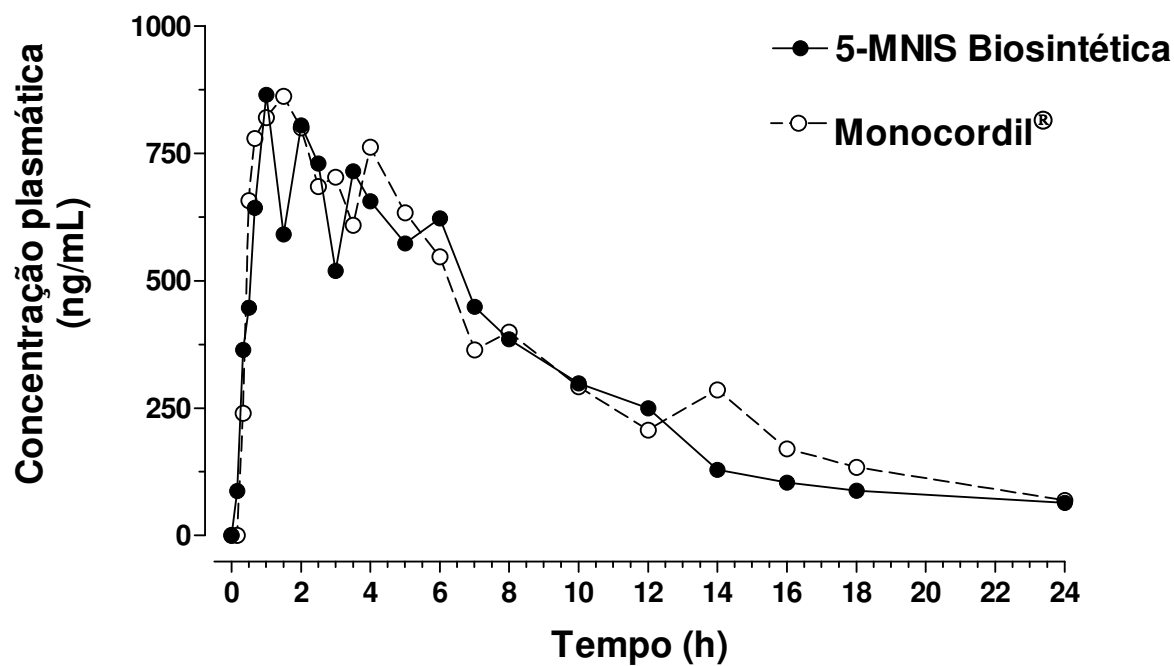
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	6392	6420
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	6239	6080
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	6278	6119
C _{max} (ng/mL)	1440	1430
T _{max} (h)	0.33	0.17
t _{1/2} (h)	4.33	5.62
K _e (1/h)	0.16	0.12

Voluntário 111



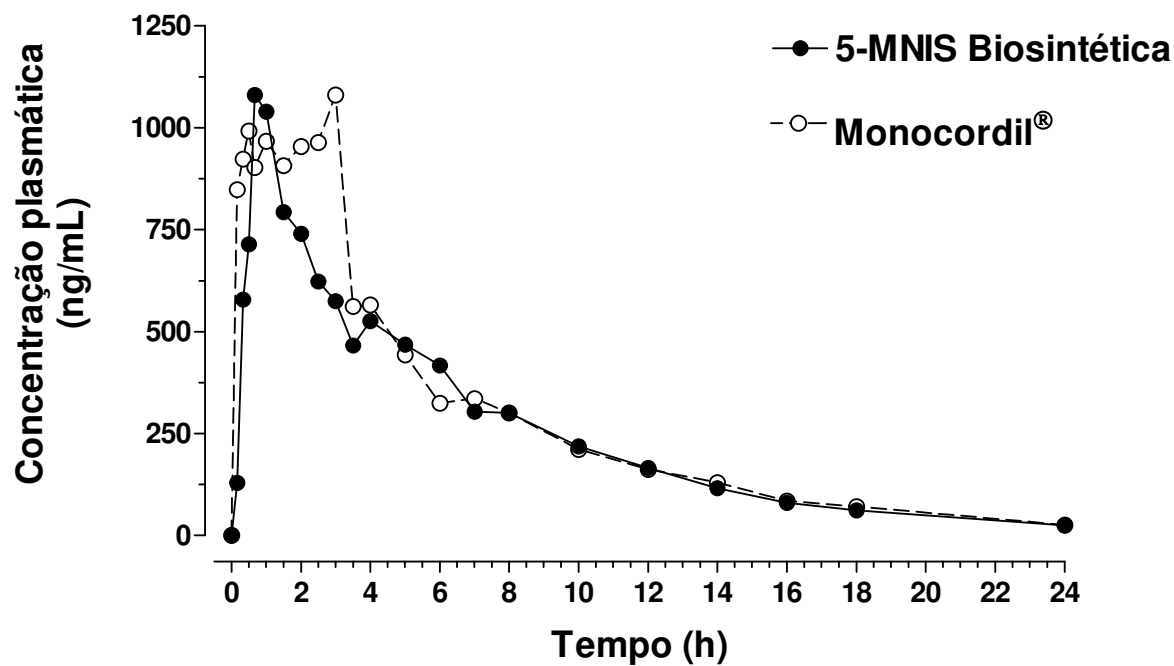
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	8178	6538
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	7883	6257
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	7951	6288
C _{max} (ng/mL)	1100	1200
T _{max} (h)	0.67	0.67
t _{1/2} (h)	5.04	5.82
K _e (1/h)	0.14	0.12

Voluntário 114



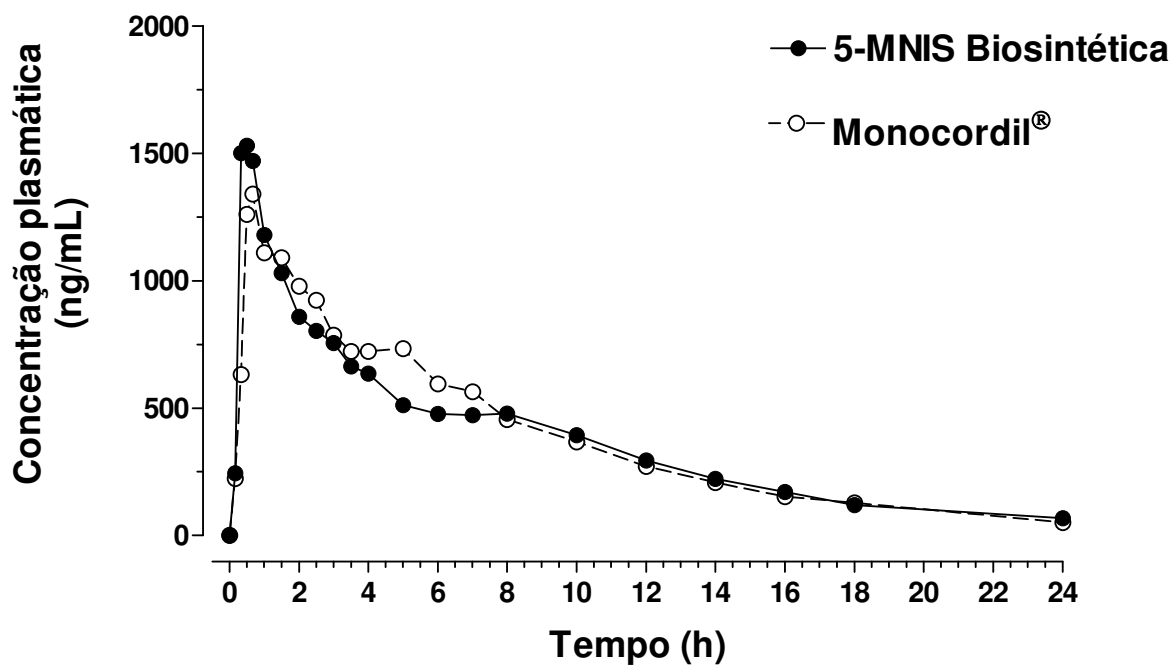
	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	8389	8214
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	7780	7128
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	7845	7172
C _{max} (ng/mL)	862	865
T _{max} (h)	1.50	1.00
t _{1/2} (h)	6.14	11.78
K _e (1/h)	0.11	0.06

Voluntário 117



	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	6949	6193
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	6780	6019
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	6835	6058
C _{max} (ng/mL)	1080	1080
T _{max} (h)	3.00	0.67
t _{1/2} (h)	4.60	4.76
K _e (1/h)	0.15	0.15

Voluntário 126



	Monocordil®	5-MNIS Biosintética
ASC _{0-∞} (ng * h/mL)	9501	9460
ASC _{0-t} (ng * h/mL)	9127	8931
AUC _{0-24h} (ng * h/mL)	9184	8970
C _{max} (ng/mL)	1340	1530
T _{max} (h)	0.67	0.50
t _{1/2} (h)	5.05	5.43
K _e (1/h)	0.14	0.13

8.6- TRABALHOS PUBLICADOS

Seguem os dois trabalhos publicados exigidos pelo Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como requisitos para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

8.6.1- Silva LC, Oliveira LS, Mendes GD, Garcia G, Pereira AS, De Nucci, G. Quantification of isosorbide 5-mononitrate in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2006; 832 (2):302-6.

8.6.2- dos Santos Filho HO, Ilha JO, Silva LC, Borges A, Mendes GD, De Nucci G. Comparative bioavailability study with two amiodarone tablet formulations administered with and without food in healthy subjects. Arzneimittelforschung 2007; 57 (9): 582-90.