

LINA SAYURI ODO BUENO DE OLIVEIRA

**QUANTIFICAÇÃO DE BETAMETASONA EM ESTUDO DE
BIODISPONIBILIDADE RELATIVA POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS COM A UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE FOTOIONIZAÇÃO.**

Campinas

2008

**QUANTIFICAÇÃO DE BETAMETASONA EM ESTUDO DE
BIODISPONIBILIDADE RELATIVA POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS COM A UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE FOTOIONIZAÇÃO.**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Campinas

2008

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

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

OL4q Oliveira, Lina Sayuri Odo Bueno de
Quantificação de betametasona em estudo de biodisponibilidade
relativa por espectrometria de massas com a utilização da técnica de
fotoionização / Lina Sayuri Odo Bueno de Oliveira. Campinas, SP :
[s.n.], 2008.

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

1. Betametasona. 2. Corticosteríodes. 3. Biodisponibilidade.
I. Nucci, Gilberto de . II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em ingles: Quantification of betamethasone in relative bioavailability study by liquid chromatography - tandem mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization

Keywords: • Betamethasone

- Corticosteroid
- Bioavailability

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Profª Drª Sandra Regina Muchinechi Fernandes

Profª Drª Silvana Aparecida Calafatti

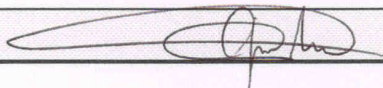
Data da defesa: 22 - 08 - 2008



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

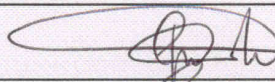
Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

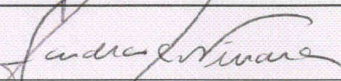
A handwritten signature in black ink, corresponding to Prof. Dr. Gilberto de Nucci, is written over a horizontal line.

Membros:

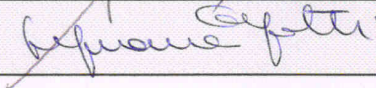
Prof. Dr. Gilberto de Nucci

A handwritten signature in black ink, corresponding to Prof. Dr. Gilberto de Nucci, is written over a horizontal line.

Profa. Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes

A handwritten signature in black ink, corresponding to Profa. Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes, is written over a horizontal line.

Profa. Dra. Silvana Aparecida Calafatti

A handwritten signature in black ink, corresponding to Profa. Dra. Silvana Aparecida Calafatti, is written over a horizontal line.

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

Data: 22/08/2008

DEDICATÓRIA

A Deus por estar sempre presente na minha vida, me orientando.

Aos meus pais, Olavo e Misae

A minha mãe de coração, Maria da Graça

Ao meu noivo, Maximiliano

Aos meus avós paternos, Olavo (*in memorian*) e Ophélia (*in memorian*)

Aos meus avós maternos, Katsuo e Shizuko.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial meu pai Olavo, pelo grande apoio e incentivo nesse novo desafio da minha vida.

Ao meu noivo, Maximiliano, pelo seu amor, pela paciência e pelo constante incentivo nas horas mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pela oportunidade do primeiro estágio e pela participação desse mestrado.

Ao Dr. Jaime Ilha, Gustavo Duarte Mendes e André Borges pelas grandes colaborações no presente trabalho.

As minhas grandes amigas Jane Finzi, Daniele Hamamoto, Jaqueline Finzi e Amanda Hayashi às quais sempre estiveram do meu lado com muito incentivo e inspiração.

Aos meus colegas, Tatiane Ferreira, Renato Medeiros, Aleksandra Alves e Milena Morita pela importante colaboração e participação nesse trabalho.

A todos que ajudaram direta e indireta para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xxi
LISTA DE FIGURAS.....	xxv
LISTA DE TABELAS.....	xxix
RESUMO.....	xxxiii
ABSTRACT.....	xxxvii
1 INTRODUÇÃO	41
1.1 Medicamento Genérico.....	43
1.2 Equivalência Farmacêutica	44
1.3 Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência.....	46
1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série.....	47
1.4.1 Técnicas de Ionização	49
1.5 Métodos na Literatura	54
1.6 Betametasona.....	55
1.6.1 Córtex da supra-renal	56
1.6.2 Regulação da síntese de Glicocorticóides	56
1.6.3 Mecanismo de ação	58
2 OBJETIVOS	59
3 MATERIAS	63
4 METODOLOGIA	67
4.1 Etapa Clínica	69
4.1.1 Seleção dos voluntários	69
4.1.1.1 Critérios de Inclusão do Voluntário.....	71
4.1.1.2 Critérios de Exclusão do Voluntário.....	72
4.1.1.3 Critérios de Retirada do Voluntário.....	73
4.1.2 Dieta	74
4.1.2.1 Jejum.....	74
4.1.3 Aspectos Éticos	75
4.1.4 Planejamento da Pesquisa	75
4.1.4.1 Dados do Medicamento	75
4.1.4.2 Desenho do Estudo	75
4.2 Etapa Analítica	77
4.2.1 Condições Gerais do método.....	77

4.2.1.1	Analito e Padrão Interno	77
4.2.1.2	Fonte de Fotoionização à pressão atmosférica (APPI)	78
4.2.1.3	Condições do Espectrômetro de Massas	81
4.2.1.4	Condições Cromatográficas	81
4.2.1.5	Extração das amostras	82
4.2.1.6	Preparo das Soluções Padrão	83
4.2.1.6.1	Solução Padrão de betametasona	83
4.2.1.6.2	Solução Padrão Interno cloranfenicol	83
4.2.1.7	Preparo das soluções de Trabalho	83
4.2.1.7.1	Soluções de Trabalho de betametasona para curva analítica	84
4.2.1.7.2	Soluções de Trabalho de betametasona para controles de qualidade	84
4.2.1.7.3	Soluções de Trabalho do padrão interno	85
4.2.1.7.4	Preparo da curva de calibração em plasma	85
4.2.1.7.5	Preparo dos controles de qualidade em plasma	86
4.2.2	Validação do método analítico	87
4.2.2.1	Especificidade/Seletividade	87
4.2.2.2	Validação da Curva de Calibração/Linearidade	88
4.2.2.3	Determinação do Limite Inferior de Quantificação	88
4.2.2.4	Linearidade	89
4.2.2.5	Precisão e Exatidão	89
4.2.2.5.1	Determinação das Concentrações dos Controles de Qualidade (CQ) e Limite inferior de Quantificação (LIQ)	90
4.2.2.5.2	Precisão e Exatidão Intra-corrida	90
4.2.2.5.3	Precisão e Exatidão Inter-corrida	91
4.2.2.6	Recuperação	91
4.2.2.7	Testes de Estabilidade	92
4.2.2.7.1	Estabilidade Pós-Processamento	93
4.2.2.7.2	Estabilidade com Ciclos de Congelamento e Degelo	93
4.2.2.7.3	Estabilidade de Curta Duração à Temperatura Ambiente	94
4.2.2.7.4	Estabilidade de Longa Duração	94
4.2.2.7.5	Estabilidade da Solução Estoque	94
4.2.2.8	Teste de supressão iônica	95
4.3	<i>Etapa Estatística</i>	95
4.3.1	Análise Farmacocinética e Estatística	95
5	RESULTADOS	97
5.1	<i>Especificidade/Seletividade</i>	99
5.2	<i>Linearidade</i>	103
5.3	<i>Precisão e exatidão intra e inter-corrida</i>	106

5.3.1	Limite inferior de Quantificação (LIQ)	106
5.3.2	Controles de Qualidade (CQ)	106
5.4	<i>Recuperação</i>	107
5.5	<i>Estabilidade</i>	109
5.5.1	Estabilidade pós-processamento.....	109
5.5.2	Estabilidade com ciclo de congelamento e degelo.	109
5.5.3	Estabilidade de curta duração.....	110
5.5.4	Estabilidade de longa duração.....	110
5.5.5	Estabilidade da solução padrão	111
5.5.6	Estabilidade da Solução de Trabalho	111
5.6	<i>Supressão iônica</i>	112
5.7	<i>Análise Farmacocinética e estatística</i>	113
6	DISCUSSÃO	115
7	CONCLUSÃO	119
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
9	ANEXOS	133
	<i>ANEXO 1 – TERMO DE RECRUTAMENTO</i>	<i>135</i>
	<i>ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</i>	<i>137</i>
	<i>ANEXO 3 – FOLHA DE EVENTO ADVERSO</i>	<i>142</i>
	<i>ANEXO 4 – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</i>	<i>144</i>
	<i>ANEXO 5 – REFEIÇÕES</i>	<i>146</i>
	<i>ANEXO 6 – LISTA DE RANDOMIZAÇÃO</i>	<i>147</i>
	<i>ANEXO 7 – ESTUDO GDN132-03</i>	<i>148</i>

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

γ -GT	γ -Glutamyltransferase
β -HCG	Human Chorionic Gonadotrofin (Gonadotrofina Coniônica Humana)
Ach	Acetilcolina
ACTH	Adrenocorticotrópico
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
API	Ionização à pressão atmosférica
APPI	Fotoionização à pressão atmosférica
ASC	Área sob a curva de concentração
ASC_{0-inf}	Área sob a curva de concentração de 0 a infinito (h)
ASC_{0-t}	Área sob a curva de concentração de 0 a t (h)
ASC_{last}	Área sob a curva da última concentração quantificada com precisão e exatidão
AVP	Arginina Vasopressina
CER	Complexo esteróide-receptor
CGAE-EM	Cromatografia Gasosa de alta eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada à Espectrometria de Massas em série
Cmax	Concentração máxima
CQA	Controles de Qualidade de baixa concentração
CQB	Controles de Qualidade de média concentração
CQC	Controles de Qualidade de alta concentração
CRF	Corticotropina
CV	Coeficiente de Variabilidade

ECG	Eletrocardiograma
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por eletronebulização
eV	elétron-volt
GR	Glicocorticóide
HHSR	Hipotálamo-hipófise-supra-renal
HIV	Human Immunodeficiency Virus
LIQ	Limite inferior de quantificação
m/z	razão massa/carga
MR	Mineralocorticóide
NA	Noradrenalina
NPV	Núcleo Paraventricular
SGOT	Aspartato aminotransferase - AST
SGT	Alanina aminotransferase - ALT
SHT	Serotonina
T _{1/2}	Tempo de meia vida
T _{max}	Tempo da máxima concentração
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultra-violeta

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo de perfil de dissolução comparativo entre formulação teste e o referência.....	43
Figura 2. Esquema ilustrativo da técnica de CLAE-EM/EM.....	47
Figura 3. Demonstração das diferentes classes de substâncias às distintas técnicas de ionização disponíveis. (Boletim Waters 2007).....	48
Figura 4. Figura ilustrativa da teoria da fissão coulombica. (Fonte: Boletim Waters 2007).....	49
Figura 5. Figura ilustrativa da ionização química a pressão atmosférica. (Fonte: Boletim Waters 2007).....	50
Figura 6. Esquema básico da fonte de fotoionização. (Fonte: Boletim Applied Biosystem 2000).....	52
Figura 7. Estrutura Molecular da Betametasona.....	75
Figura 8. Estrutura Molecular do Cloranfenicol.....	75
Figura 9. Espectro de massa do Íon produto da Betametasona.....	76
Figura 10. Espectro de massa do Íon produto da Betametasona – CH ₂ O-H.....	77
Figura 11. Caminhos propostos da fragmentação de massa da Betametasona.....	77
Figura 12. Espectro de massa do Íon produto do Cloranfenicol	78
Figura 13. Caminhos propostos da fragmentação de massa do Cloranfenicol.....	79

Figura 14. Método para extração das amostras.....	80
Figura 15. Sistema para realização do teste de supressão iônica.....	93
Figura 16. Corrida analítica com plasma lipêmico.....	97
Figura 17. Corrida analítica com plasma hemolizado.....	98
Figura 18. Corrida analítica com plasma normal.....	98
Figura 19. Cromatograma típico do zero (plasma branco + padrão interno).....	99
Figura 20. Cromatograma típico do Limite inferior de quantificação. (LIQ).....	99
Figura 21. Cromatograma típico do controle de qualidade baixo (CQA).....	100
Figura 22. Cromatograma típico do controle de qualidade médio (CQB).....	100
Figura 23. Cromatograma típico do controle de qualidade alto (CQC).....	101
Figura 24. Típica curva do método de regressão linear.....	103
Figura 25. Supressão iônica comparada com a região de eluição do analito.....	110
Figura 26. Perfil da concentração plasmática <i>versus</i> o tempo.....	111

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos descritos na literatura para quantificação de Betametasona.....	53
Tabela 2. Padrões de referência.....	63
Tabela 3. Reagentes.....	63
Tabela 4. Materiais utilizados na etapa analítica.....	63
Tabela 5. Componentes da CLAE-EM/EM.....	63
Tabela 6. Amostras biológicas.....	64
Tabela 7: Exames Laboratoriais.....	67
Tabela 8: Tempos de coletas.....	74
Tabela 9: Condições cromatográficas do método.....	80
Tabela 10. Preparo das soluções dos padrões da curva de calibração.....	82
Tabela 11. Preparo das soluções dos controles de qualidade.....	83
Tabela 12. Preparo da solução do padrão interno.....	83
Tabela 13. Preparo da curva analítica em plasma.....	84
Tabela 14. Preparo dos controles de qualidade em plasma.....	84
Tabela 15. Definições para determinação dos controles de qualidades.....	88
Tabela 16. Média das três curvas das validações.....	102

Tabela 17. Resultados de precisão e exatidão intra e inter-corridas para LIQ.....	104
Tabela 18. Resultados de precisão e exatidão intra e inter-corridas para controles de qualidade.....	105
Tabela 19. Resultados da recuperação média para Betametasona.....	106
Tabela 20. Resultados da recuperação média para Cloranfenicol.....	106
Tabela 21. Estabilidade pós-processamento.....	107
Tabela 22. Estabilidade de congelamento e degelo.....	107
Tabela 23. Estabilidade de curta duração.....	108
Tabela 24. Estabilidade de longa duração (28 dias).....	108
Tabela 25. Estabilidade de longa duração (40 dias).....	108
Tabela 26. Estabilidade da solução padrão para Betametasona.....	109
Tabela 27. Estabilidade da solução padrão para Cloranfenicol.....	109
Tabela 28. Estabilidade da solução de trabalho para Betametasona.....	109
Tabela 29. Média dos parâmetros farmacocinéticos para avaliação da bioequivalência.....	111
Tabela 30. Parâmetros farmacocinéticos para avaliação da bioequivalência.....	112
Tabela 31. Parâmetros do presente trabalho e dos os métodos descritos na literatura.....	116

RESUMO

Betametasona é um corticosteróide sintético designado para exercer a função de um glicocorticóide ativo. Como um álcool livre, betametasona apresenta uma vasta aplicação clínica com atividade antiinflamatória e imunossupressora. A betametasona foi extraída com 0,5mL de plasma humano por extração líquido-líquido (ELL) utilizando Cloranfenicol como padrão interno. O método utilizou uma corrida cromatográfica de 2,5min, com a coluna analítica C18 (100mm×2.1mm i.d.), a calibração da curva linear de 0,05ng/mL a 50ng/mL ($r^2 > 0,993$). A exatidão inter-corrida dos controles de qualidade foi 92.3% (CQA 0.15ng/mL), 90.7% (CQB 4.0ng/mL) e 97.2% (CQC 40ng/mL). A precisão inter-corrida dos controles de qualidade foi 8.7% (CQA 0.15ng/mL), 9.0% (CQB 4.0ng/mL) e 9.8% (CQC 40ng/mL). O método aqui descrito foi empregado em estudo de biodisponibilidade relativa de duas formulações contendo dexclorfeniramina/betametasona 2mg/0.25mg comprimido. A razão da média geométrica e dos respectivos intervalos de confiança (IC) de Betametasona/Celestamine® foram 107.61% (101.62–113.95%) para AUClast, 106.93% 102.08–112.00% para AUC0-inf e 105.06% (96.56–114.31%) para Cmax. O intervalo de confiança de 90% calculado para a razão individual das médias de Cmax, ASC_{0-72h}, ASClast e ASC0-inf para betametasona/celestamine® estavam dentro do intervalo de 80-125% definido pela Agência Vigilância Sanitária (ANVISA). No presente estudo um método, rápido, sensível e robusto foi desenvolvido para a determinação e quantificação de betametasona em plasma humano através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas usando fotoionização à pressão atmosférica em modo negativo.

Palavras chave: betametasona; Corticosteróide; Fotoionização; Biodisponibilidade Relativa.

ABSTRACT

Betamethasone is a synthetic corticosteroid designed to exert a marked glucocorticoid activity. As the free alcohol, betamethasone finds widespread clinical applications related to its anti-inflammatory and immunosuppressant activity. Betamethasone was extracted from 0.5 ml human plasma by liquid–liquid extraction (LLE) using chloramphenicol as internal standard. The method has a chromatographic run of 2.5 min using a C18 analytical column (100mm×2.1mm i.d.) and the linear calibration curve over the range was linear from 0.05 to 50 ng ml⁻¹ ($r^2 > 0.993$). The between-run accuracy, based on the relative standard deviation replicate quality controls was 92.3% (0.15 ng ml⁻¹), 90.7% (4.0 ng ml⁻¹) and 97.2% (40 ng ml⁻¹). The between-run precision for the above-mentioned concentrations was 8.7, 9.0 and 9.8%, respectively. The method herein described was employed in a bioequivalence study of two formulations of dexchlorpheniramine/betamethasone 2 mg/0.25 mg tablets. The geometric mean and respective 90% confidence interval (CI) of betamethasone/Celestamine® percent ratios were 107.61% (101.62–113.95%) for AUC_{last}, 106.93% 102.08–112.00% for AUC_{0-inf} and 105.06% (96.56–114.31%) for C_{max}. In addition, the calculated 90% CI for mean C_{max}, AUC_{last} and AUC_{inf} betamethasone/celestamine® individual ratios were within the 80–125% interval defined by the Agência Vigilância Sanitária - ANVISA. In the present study, a fast, sensitive, robust method was developed for the determination and quantification of betamethasone in human plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, using photospray ionization in negative mode.

Keywords: betamethasone; Corticosteroid; Photospray; Relative Bioavailability

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A promulgação da lei 9.787 em 10 de fevereiro de 1999, que estabeleceu medicamento genérico, foi o início das inúmeras ações tomadas pelo Ministério da Saúde e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para atender esta nova diretriz e aumentar o acesso da população a medicamentos eficazes, seguros e de qualidade, a preços reduzidos.

Devido a essas ações, nos últimos anos houve um grande aumento na demanda de estudos clínicos para avaliação de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos e, conseqüentemente, da necessidade de quantificação de diferentes classes de fármacos, para fins de caracterização do perfil farmacocinético destes compostos (Ilha, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas em série (CLAE-EM/EM) tem sido a técnica mais empregada para a quantificação de fármacos em estudos farmacocinéticos por possibilitar a detecção de quantidades mínimas de compostos em matrizes de natureza complexa (Kauppila, 2004a).

1.1 *Medicamento Genérico*

Para um medicamento ser registrado como genérico, é necessário que comprove a sua equivalência farmacêutica e a sua biodisponibilidade relativa/bioequivalência em relação ao medicamento de referência indicado pela Anvisa, garantindo a sua intercambialidade com eficácia, qualidade e segurança (Brasil, 2003a).

O medicamento de referência é, geralmente, o inovador cuja sua biodisponibilidade foi determinada durante o desenvolvimento do produto e que teve sua eficácia e sua segurança

comprovada por meio de ensaios clínicos, antes da obtenção do registro para comercialização (Storpiritis, 1999).

Primeiramente, a equivalência farmacêutica entre dois medicamentos está relacionada à comprovação de que ambos contém o mesmo fármaco (mesma base, sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa), na mesma dosagem e forma farmacêutica, o que pode ser avaliada por meio de testes *in vitro* (Shargel e Yu, 1999; WHO, 1999).

Por outro lado, a biodisponibilidade relativa/bioequivalência, de acordo com a Anvisa, é comprovada entre equivalentes farmacêuticos que, administrados na mesma dose molar e nas mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação a biodisponibilidade (Oliveira, 2002), sendo que a biodisponibilidade indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina (Lei nº 9.787, de 10/2/99).

1.2 Equivalência Farmacêutica

Para a produção do medicamento genérico, o fabricante deve investir em desenvolvimento farmacotécnico de um produto que cumpra com as mesmas especificações *in vitro* do medicamento de referência, ou seja, comprovar sua equivalência farmacêutica (Dighe, 1999).

Considerando-se que os medicamentos sólidos de uso oral são aqueles que podem apresentar maiores problemas em relação a biodisponibilidade, torna-se obrigatório avaliar o impacto desses fatores sobre a dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica, realizando teste *in vitro* que permita visualizar como a dissolução ocorre em função do tempo (Banakar, 1992).

O teste de perfil de dissolução é utilizado como ferramenta no desenvolvimento de formulações, uma vez que evidencia diferenças na dissolução causadas por fatores ligados ao fármaco, aos excipientes e à técnica de fabricação empregada (Yugue et al., 1996; Storpirtis e Rodrigues, 1998).

Para obter o perfil de dissolução deve se realizar diversas coletas do meio de dissolução, em tempos determinados, determinando-se a porcentagem de fármaco dissolvido a cada tempo (Figura 1). O método utilizado para quantificação do fármaco deve estar previamente desenvolvido e validado. A partir da curva resultante pode-se determinar a cinética do processo de dissolução, bem como calcular diversos parâmetros, tais como o tempo para o início do processo de desagregação e a eficiência de dissolução (Porta et al., 2002).

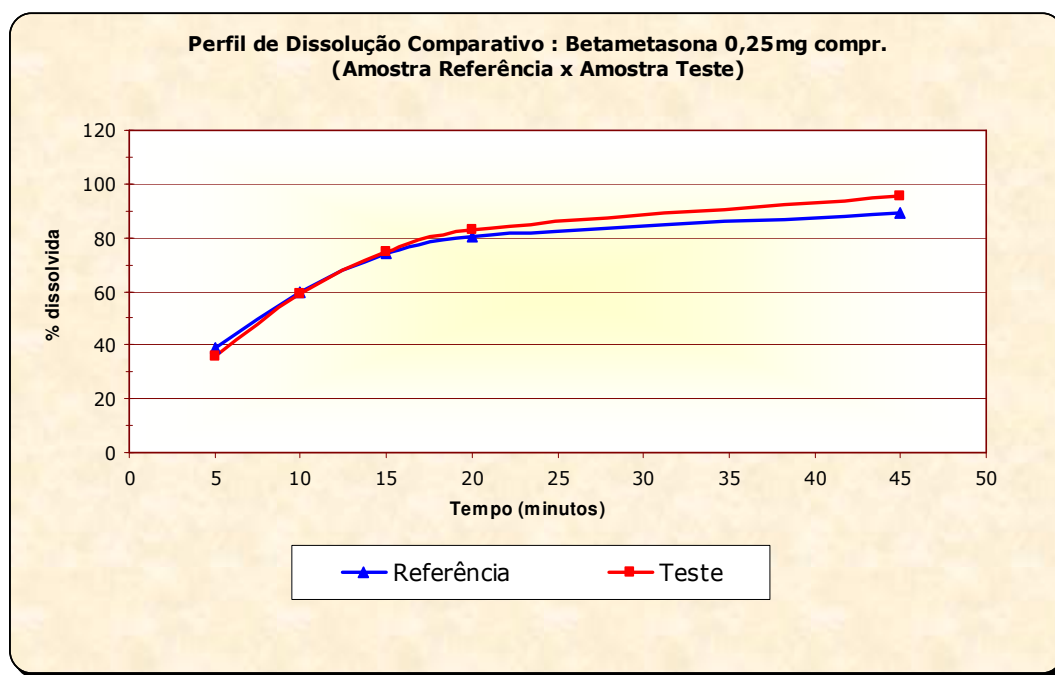


Figura 1. Exemplo de perfil de dissolução comparativo entre formulação teste e a referência.

1.3 Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência

O estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência é dividido basicamente em três etapas: clínica, analítica e estatística (Storpiris e Consiglieri, 1995; Consiglieri e Storpiris, 2000).

Na etapa clínica o cronograma de coleta das amostras deverá ser planejado de acordo com o tipo de forma farmacêutica (liberação imediata/modificada) e a meia-vida de eliminação do fármaco. Os critérios de inclusão e exclusão de voluntários participantes do estudo devem ser suficientes para selecionar voluntários saudáveis, evitando que as características fisiológicas dos indivíduos interfiram nos resultados (Shargel e Yu, 1999).

A etapa analítica é aquela em que o fármaco é quantificado nas amostras coletadas de voluntários sadios. No planejamento dessa etapa analítica deve ser estabelecido o analito a ser quantificado (fármaco inalterado, metabólito ou pró-fármaco) a matriz biológica utilizada (sangue total, plasma, soro ou urina), e o método analítico adequado. O método de quantificação deve ser específico para cada analito, exato e relativamente simples. Toda a metodologia deve estar devidamente validada antes da realização do estudo, apresentando todos os parâmetros de validação previamente estabelecidos (Bressole *et al.*, 1996; Causon, 1997).

A etapa estatística inclui inicialmente o cálculo do número adequado de voluntários para o fármaco em questão, elaboração da lista de randomização e também faz parte do planejamento da etapa estatística, o tratamento a que serão submetidos os dados gerados na etapa analítica avaliando os parâmetros farmacocinéticos (Shargel e Yu, 1999).

Para a avaliação da biodisponibilidade relativa/bioequivalência de dois medicamentos são determinados os parâmetros farmacocinéticos que melhor se correlacionam com os efeitos

terapêuticos no organismo (Storpirtis, 1994). Estes parâmetros relacionam-se com a quantidade de fármaco absorvida e à velocidade do processo de absorção (Bois et al., 1994; Storpirtis e Consiglieri, 1995).

Os parâmetros farmacocinéticos são obtidos das curvas de concentração sangüínea do fármaco versus tempo, e analisados estatisticamente para determinação da bioequivalência (Brasil, 2003b).

1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série

Durante anos a cromatografia líquida foi chamada de “clássica”, que consiste basicamente em colunas de vidros preenchidas com adsorventes, a qual utiliza a força da gravidade para forçar a passagem do eluente através da coluna para ocorrer a separação (Snyder, 1997).

Somente a partir da década 70, conseguiu-se um avanço considerável da cromatografia líquida moderna, um grande crescimento e popularidade que foram impulsionados pelas vantagens na tecnologia em coluna e na instrumentação, como por exemplo, o desenvolvimento de micropartículas como material de enchimento de melhor eficiência e estabilidade (Halasz e Horvath, 1964; Kirkland, 1968).

A utilização de colunas de tamanho reduzido, preenchidas com material finamente pulverizado ofereceu grande resistência ao fluxo de fase móvel, resultou no uso de sistemas de alta pressão, denominando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CLAE é uma técnica de separação que é considerada um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares (Jardim, 2006).

Do outro lado, a técnica de espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informação da massa molar e a estrutura química do analito, é uma técnica baseada na identificação da razão massa-carga (m/z) de íons, e para a sua utilização é fundamental a ionização dos compostos de interesse (De Laeter, 1990), sendo que a discriminação e a detecção dos íons se dão em fase gasosa, o que implica a utilização de um mecanismo que possibilite a transição dos compostos contidos nos eluentes proveniente da cromatografia líquida de alta eficiência para a fase gasosa (Brauman, 1995).

Assim, para que ocorra a associação da cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas, é necessário a utilização de uma interface que permita, efetuar esta mudança de fase, bem como a ionização dos compostos de interesse (Moraes e Lago, 2003). A associação dessas técnicas permite que o tempo de análise seja menor que o usualmente necessário quando a separação cromatográfica está acoplada aos outros métodos de detecção, como por exemplo, por ultravioleta (UV), proporcionando assim maior velocidade na análise de amostras, essencial em estudos de biodisponibilidade, que envolvem grandes quantidades de análises (Lagana et al, 2000).

O sistema da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em série (CLAE-EM/EM) é constituído basicamente de bomba de alta pressão, injetor, coluna cromatográfica, fonte de ionização, espectrômetro de massas e detector de íons com aquisição/processamento de dados conforme ilustrado na Figura 2 (Ardrey, 2003).

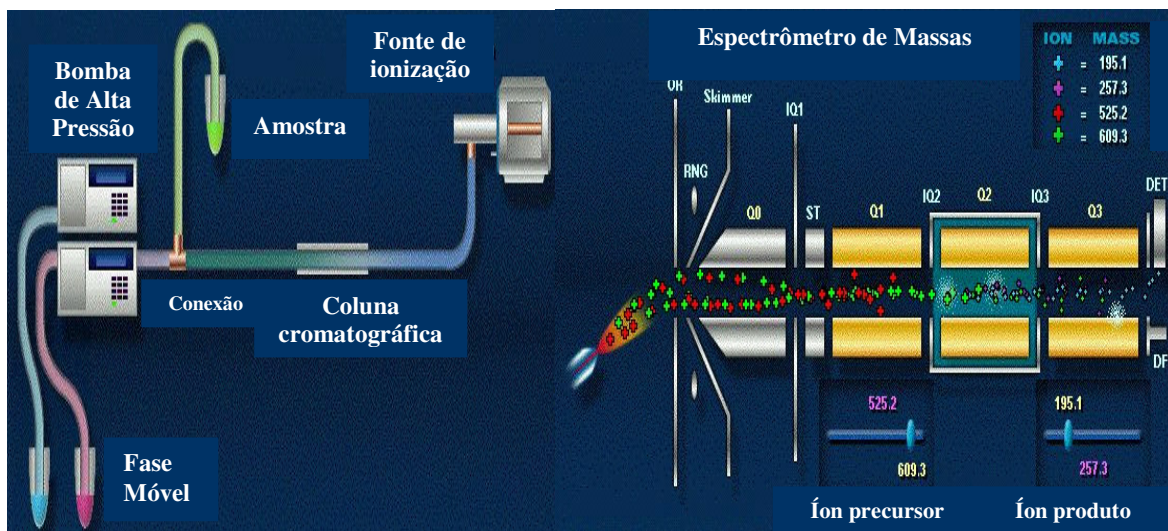


Figura 2. Esquema ilustrativo da técnica de CLAE-EM/EM.

1.4.1 Técnicas de Ionização

O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica (API) foi de fundamental importância para que a associação se transformasse em um método rotineiro, possibilitando o desenvolvimento de métodos quantitativos com elevado desempenho e alta sensibilidade e especificidade (Pereira *et al.*, 2005). Nesse sentido, as técnicas mais largamente empregadas são a ionização por eletronebulização (ESI) e a ionização química em pressão atmosférica (APCI) conforme ilustrados na Figura 3.

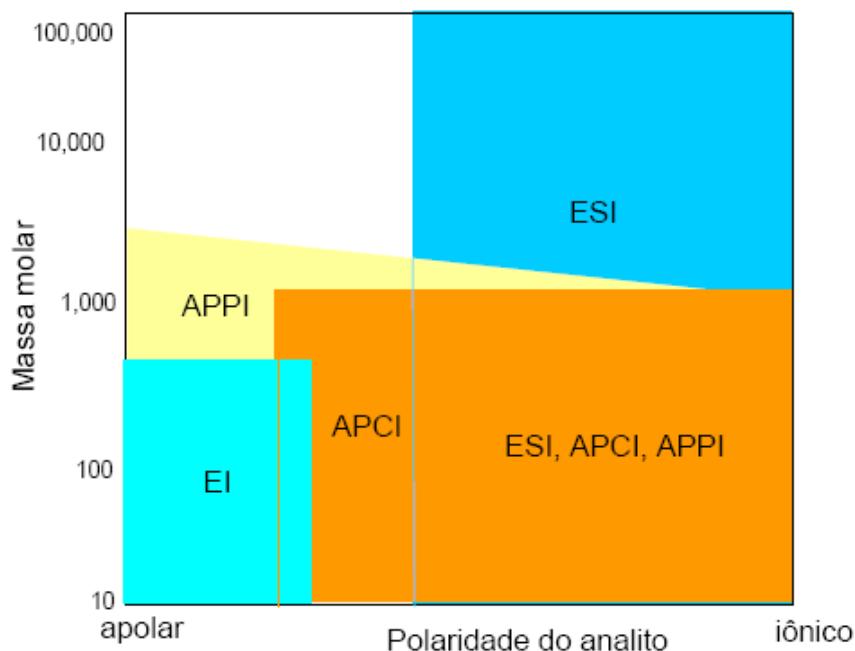


Figura 3. Demonstração das diferentes classes de substâncias às distintas técnicas de ionização disponíveis. (Boletim Waters 2007)

Na técnica de ionização por eletronebulização (ESI), o eluente proveniente da coluna cromatográfica é conduzido por um tubo capilar metálico ao qual é aplicado um alto potencial elétrico (positivo ou negativo), que leva à separação de cargas do solvente, podendo também haver dissociação iônica do fármaco de interesse, dependendo de suas características físico-químicas. Ao deixar o capilar, o líquido é vaporizado, formando minúsculas gotículas carregadas eletricamente que, por sua vez, são submetidas a um fluxo de Nitrogênio, destinado à evaporação do solvente. Conforme descrito por Watson (1997), na medida em que as gotículas vão reduzindo de tamanho, devido à evaporação do solvente, ocorre o aumento da força de repulsão entre os íons de mesma carga, até o ponto em que a força coulombica é suficientemente forte para romper a tensão superficial dessas gotículas, implicando a dissorção dos íons para a fase gasosa (Figura 4).

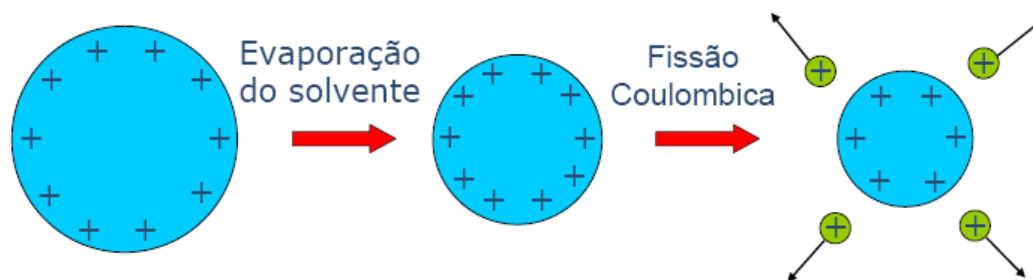


Figura 4. Figura ilustrativa da teoria da fissão coulombica. (Fonte: Boletim Waters 2007)

Já em fase gasosa, ocorrem reações químicas, resultando na ionização dos compostos de interesse. Os íons formados são tipicamente moléculas protonadas ($[M+H]^+$) ou aductos ($[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$), no caso de ionização em modo positivo, ou moléculas desprotonadas ($[M-H]^-$), no caso de ionização em modo negativo e que, portanto, mantém intactas as estruturas moleculares originais. São mais favorecidas por este tipo de processo as substâncias iônicas ou polares, uma vez que o campo elétrico no capilar propicia a dissociação e a formação de íons já em solução (Kauppila, 2004b).

A técnica de eletronebulização é considerada uma técnica branda, com eficiência na ionização de moléculas polares, lábeis e de peso molecular elevado conforme demonstrado na Figura 3, sendo uma situação comum a um grande número de drogas e metabólitos (Watson, 1997).

Na técnica de ionização química à pressão atmosférica (APCI) as moléculas são inicialmente vaporizadas e através da aplicação de uma descarga elétrica por meio de uma corona forma-se um plasma, no qual é proporcionada a ocorrência de reações químicas em fase gasosa, que levam à ionização dos compostos (Figura 5). As substâncias que são favorecidas por esse processo podem ser menos polares que as que se ionizam através de eletronebulização (Robb e Blades, 2006).

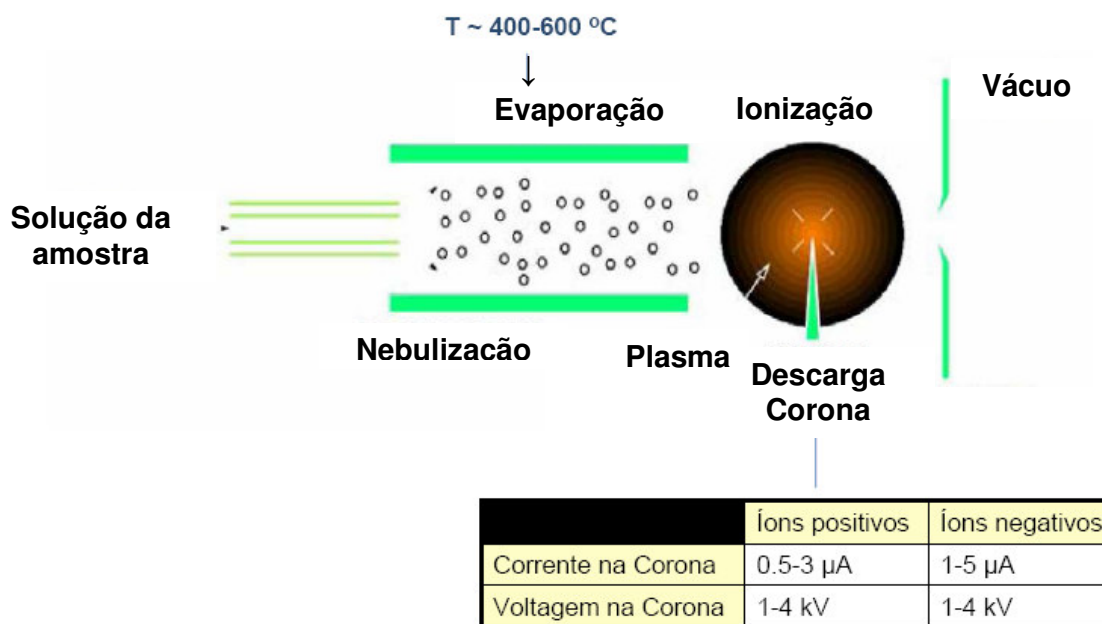


Figura 5. Figura ilustrativa da ionização química a pressão atmosférica. (Fonte: Boletim Waters 2007)

Porém existem diversos compostos que não são adequadamente ionizados pelas técnicas, como a APCI e ESI, sobretudo os compostos não polares. Assim o desenvolvimento de métodos que permitam a quantificação desses compostos não polares assume grande importância. Dentro desta categoria de compostos, estão os esteróides, tais como os corticóides e hormonioterápicos, os quais têm nos últimos anos, tem sido objeto de investigação para aprovação de medicamentos genéricos ou similares (Ilha,2006).

Em 2000 foi introduzido um novo modo de ionização para o sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, a fotoionização à pressão atmosférica (APPI). O recente desenvolvimento dessa técnica de ionização é de particular interesse já que possibilita a ionização de compostos pouco polares ou mesmo não polares.

A fotoionização à pressão atmosférica associada à cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas foi inicialmente descrita por Robb *et al.* (2000), cuja contribuição para a introdução desta técnica possibilitou de ionização direta dos compostos de

interesse e a associação de uma substância dopante, agindo como intermediária no processo de ionização desses compostos.

Nesta técnica, conforme relatado por Kauppila (2004a) a amostra é vaporizada, recebendo fótons provenientes de uma lâmpada de descarga krypton, cuja energia (10 eV) é capaz de ionizar substâncias que possuam energia de ionização inferior a este valor, o que pode incluir alguns dos compostos de interesse, possibilitando a transferência direta de carga elétrica para estes. Adicionalmente ao eluente, uma substância utilizada como dopante é introduzida, cuja energia de ionização é inferior a 10 eV, conforme demonstrado na Figura 6. A partir da ionização do dopante, já em fase gasosa, ocorrem reações com as moléculas dos compostos de interesse, possibilitando assim a formação de íons, tanto pela transferência direta de carga elétrica, por protonação ou desprotonação do analito. Em função da menor quantidade de energia utilizada, considera-se que esta é uma técnica de ionização ainda mais branda que a proporcionada pela eletronebulização, produzindo mínimas fragmentações das moléculas presentes no meio, o que resulta em menor complexidade do espectro produzido e, por conseguinte, maior seletividade.

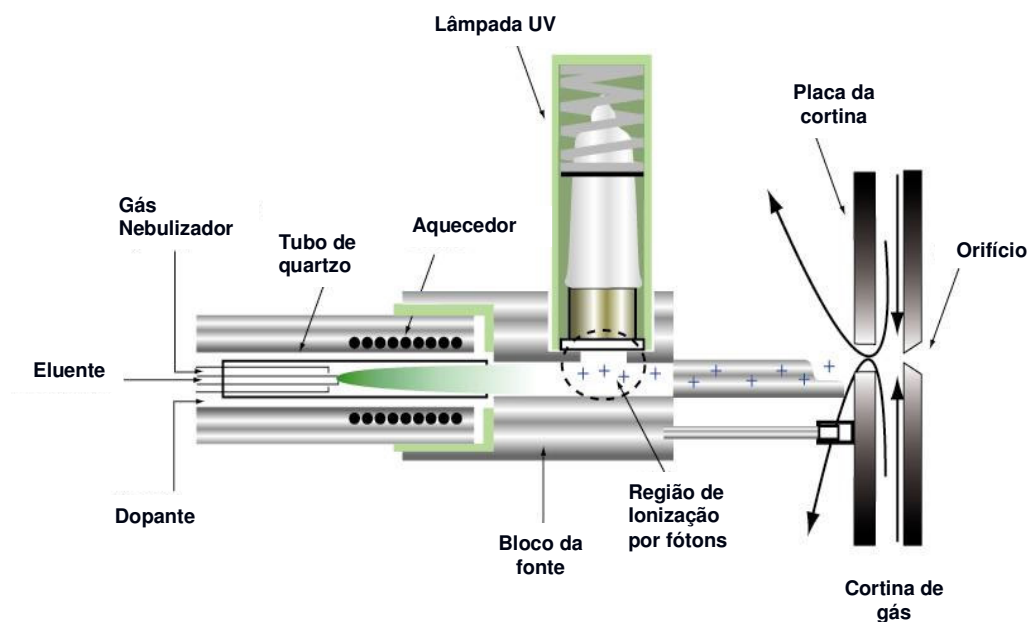


Figura 6. Esquema básico da fonte de fotoionização. (Fonte: Boletim Applied Biosystem 2000).

Ressalta-se que na bibliografia consultada já existem estudos que evidenciam que a técnica de fotoionização (APPI) é capaz de ionizar não somente os compostos não ionizáveis pelas outras duas técnicas já citadas, compostos não polares, mas também aqueles que o são, indicando a possibilidade de ser esta uma solução mais universal do que as atualmente utilizadas na associação da cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas (Syage e Evans 2001; Cai, 2005).

1.5 Métodos na Literatura

Na literatura são apresentados alguns métodos para quantificação de betametasona, em plasma humano e em outros tipos de matriz, como o leite, os quais foram analisados pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultra-violeta (CLAE) descrita por Petersen, 1979, pela cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) e pela cromatografia gasosa de alta eficiência acoplada a espectrometria de

massas (CGAE-EM) descritas por Houghton, 1982 , e mais recentemente pela cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (CLAE-EM/EM) descritas por Fiori 1998.

Na Tabela 1 são mostrados alguns parâmetros para cada técnica aplicada.

Tabela 1. Métodos descritos na literatura para quantificação de betametasona.

Item	(Petersen <i>et al.</i> 1979)	(Houghton <i>et al.</i> 1981)	(Houghton <i>et al.</i> 1982)	(Fiori et al. 1998)
Método Analítico	CLAE – UV	CGAE-EM	CLAE - EM (APCI)	CLAE - EM/EM (APCI)
Tempo de Retenção do Analito	6,5 minutos	5,5 minutos	13 minutos	5,3 minutos
Matriz	Plasma, Sangue e Urina	Urina	Urina	Leite
Volume de plasma	1000 µl	20mL	20mL	5mL
Extração	Extração líquido-líquido	Extração Fase Sólida com derivatização	Extração Fase Sólida	Extração Fase Sólida
Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	De 10 a 300 ng/mL	-	-	De 5 a 100 ng/mL

1.6 Betametasona

A betametasona é produzida pelo córtex da supra-renal a qual exerce atividade glicocorticóide, que é um derivado sintético da α -fluoroprednisolona, sendo assim análoga aos hormônios esteróides (Barnes,1998).

Glicocorticostéoides suprimem inflamações em uma ampla gama de doenças, incluindo doença alérgica, artrite reumatóide, doenças inflamatórias do intestino e doenças autoimunes.

Na verdade eles são freqüentemente a terapia mais efetiva disponível e seu uso é limitado somente pelos efeitos colaterais sistêmicos. A maior aplicação de glicocorticóide é em asma e glicocorticóides de inalação tem revolucionado os tratamentos e agora se tornou uma das terapias mais importantes no dias de hoje para pacientes com doenças crônicas (Styczynski *et al.*, 2002).

1.6.1 Córtex da supra-renal

A principal função do córtex supra-renal consiste em produzir hormônios glicocorticóides e mineralocorticóides, dos quais o cortisol e a aldosterona são respectivamente, os de maior importância no ser humano. São responsáveis por regular os carboidratos e as funções hemodinâmicas, sendo essenciais à vida, sobretudo em situações de estresse (Wyngaarden, 1992).

O córtex supra-renal ocupa cerca de 90% da glândula e circunda a medula de localização central, responsável pela produção de catecolaminas. É dividido em três zonas: glomerular, que produz aldosterona; reticular; e fasciculada, na qual as duas últimas ocupam cerca de 75% da glândula e são responsáveis pela produção do cortisol e androgênios (Wyngaarden, 1992).

1.6.2 Regulação da síntese de Glicocorticóides

O eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (HHSR) corresponde a um sistema regulador que integra funções endócrinas e neurológicas. As células neurosecretoras do núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo secretam o fator de liberação da corticotropina (CRF) e a arginina vasopressina (AVP) na microcirculação porta da hipófise. Na adeno-hipófise, ou

hipófise anterior, elas estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Este último promove, no córtex supra-renal, a liberação do cortisol. O cortisol é o produto final do HHSR e tem funções centrais e periféricas mediadas via dois tipos de receptores específicos, pelo menos: o tipo 1, ou receptor mineralocorticóide (MR), primeiramente descrito por McEwen et al, 1992, de alta afinidade; e o tipo 2, ou receptor glicocorticóide (GR), de baixa afinidade. Os receptores tipo 1 possuem alta afinidade pela corticosterona no rato e são encontrados em grandes concentrações em neurônios límbicos extra-hipotalâmicos do complexo septo-hipocampal, enquanto que, na hipófise, são encontrados em menor concentração. Também têm alta afinidade pela aldosterona e, por isso, foram denominados receptores mineralocorticóides por Beaumont e Fanestil, 1993. Os receptores tipo 2 possuem alta afinidade por glicocorticóides sintéticos, como a dexametasona e baixa afinidade por glicocorticóides endógenos (Sutano, 1987, Reu, 1986).

Praticamente todos os neurotransmissores afetam a liberação de CRF, que é o principal estimulante da liberação de ACTH (McQuade e Young, 2000; Muller et al. 2002). A AVP estimula menos intensamente, porém potencializa o efeito do CRF. As células secretoras do NPV recebem estímulos de várias regiões cerebrais, e as monoaminas, como a serotonina (5HT), a noradrenalina (NA) e a acetilcolina (Ach), além dos aminoácidos estimulantes e inibidores, estão envolvidos na regulação da liberação do CRF (McQuade e Young, 2000). Além desses reguladores extrínsecos, um mecanismo auto-regulador intrínseco também está envolvido: o cortisol endógeno, através da ligação aos receptores glicocorticóides no eixo HHSR e no hipocampo, inibe a atividade do eixo HHSR (McQuade e Young, 2000). As ações dos receptores MR e GR ainda não são totalmente esclarecidas, porém, possivelmente, os receptores MR atuam sobre o cortisol basal e em baixas concentrações, enquanto que os receptores GR atuam nas concentrações durante o ritmo circadiano e de estresse (McQuade e Young, 2000).

1.6.3 Mecanismo de ação

Os corticosteróides podem interferir nas funções cerebrais basicamente através de dois mecanismos: interagindo com o genoma e interagindo com as membranas celulares (Cowen, 2002). Os corticosteróides atravessam livremente as membranas celulares e, em neurônios que contêm receptores citoplasmáticos esteróide-específicos, o complexo esteróide-receptor (CER) penetra no núcleo celular. Então, o CER se liga à cromatina e regula a transcrição de genes específicos. Esses eventos moleculares possivelmente são importantes para se compreender os efeitos sobre o comportamento exercidos pelos esteróides, já que neurônios que contêm receptores esteróide-específicos encontram-se largamente concentrados no hipocampo, área septal e amígdala - partes do cérebro intimamente envolvidas no comportamento, humor, aprendizado e memória (Cowen, 2002).

Os eventos moleculares incluem alterações nos níveis das enzimas tirosina hidroxilase, triptofano hidroxilase, monoamina oxidase, dopamina-beta-hidroxilase e feniletanolamina-N-metiltransferase, que controlam a atividade das aminas, e alterações nos níveis de compilação do RNAm para somatostatina, CRF, ACTH, betaendorfina e proteínas G (Wolkowitz, 1999).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico, específico, rápido e sensível na quantificação de betametasona em plasma humano por Espectrometria de massas com a utilização da técnica de Fotoionização e posteriormente a comparação do perfil farmacocinético de duas formulações contendo betametasona/dexclorfeniramina comprimido em voluntários sadios e avaliar a sua bioequivalência.

Para o desenvolvimento e validação da metodologia, foram utilizados os seguintes aparelhos, padrões, reagentes e amostras biológicas, descritos nas Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 2. Padrões de referência.

Padrão	Descrição	Fabricante	Lote
betametasona	Analito	United States Pharmacopeia (USP)	122120
cloranfenicol	Padrão Interno	Sigma-Aldrich	42K0106

Tabela 3. Reagentes.

Reagentes	Descrição	Fabricante, País
Acetonitrila	Grau CLAE	J. T. Baker, USA
Metanol	Grau CLAE	J. T. Baker, USA
Éter	Grau Analítico	Mallicnkdrodt, USA
Água deionizada	Grau Analítico	Millipore, Brasil
Hexano	Grau Analítico	Mallicnkdrodt, USA
Acetato de Amônio	Grau Analítico	J. T. Baker, USA
Tolueno	Grau Analítico	J. T. Baker, USA

Tabela 4. Materiais utilizados na etapa analítica.

Materiais	Fabricante, País
Pipetas automáticas (P200, P1000 e P10000)	Gilson, França
Pipetas de plástico descartáveis - Tipo Amarela (5 - 200 µL) e Tipo Azul (200 - 1000 µL)	Gilson, França
Tubos de vidro descartáveis (120 x 12 mm)	Laborglass, Brasil
Tubos de polipropileno com 50 e 15 mL de capacidade	Costar, Brasil
Vial e tampas	OCP Diagnostics, Brasil
Agitador	Fischer, USA
Balança Analítica	KNWAAGEN, Brasil
Bomba de Infusão	Harvard Apparatus, USA

Tabela 5. Componentes da CLAE-EM/EM

Componente	Fabricante, País	Modelo
Espectrômetro de Massas	Applied Biosystems	API3000
Fonte de ionização (APPI)	Applied Biosystems	-
Cromatógrafo Líquido	Shimadzu, Japão	LC10AD
Auto Injetor	Shimadzu, Japão	LC10AD
Unidade Controladora	Shimadzu, Japão	SCL10AD
Bomba de Infusão	Harvard, USA	Harvard infusion pump 22

Tabela 6. Amostras biológicas.

Descrição	Fonte
Plasma humano Normal	Unidade Clínica Phillipe Pinel, Brasil
Plasma humano Hiperlipêmico	Unidade Clínica Phillipe Pinel, Brasil
Plasma humano Hemolizado	Unidade Clínica Phillipe Pinel, Brasil

4 METODOLOGIA

O Estudo foi conduzido em três etapas: Clínica, Analítica e Estatística e foi planejado de acordo com a resolução RE nº 397 de 12 de Novembro de 2004 - Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

4.1 Etapa Clínica

4.1.1 Seleção dos voluntários

Os voluntários participaram inicialmente de um processo de seleção, para que assinassem o Termo de Recrutamento (ANEXO 1) após o esclarecimento inicial sobre as condições nas quais foram desenvolvidas as pesquisas clínicas. Nesta etapa foram realizados exames, incluindo registro de ECG, pressão sanguínea sistólica e diastólica, frequência cardíaca e medida de temperatura corpórea e coleta de material para análises clínicas laboratoriais conforme tabela 7.

Tabela 7. Exames Laboratoriais

Categoria	Exames
ECG	ECG padrão com 12 derivações
Análise hematológica	Hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas
Análise Bioquímica	Uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicérides, ácido úrico, γ GT.
Urina	Sumário de Urina (urina I)
Fezes	Protoparasitológico
Sorologia	Análise Sorológica para: hepatite B, hepatite C e HIV(1+2) β -HCG para mulheres

Após o recebimento dos resultados de exame, foi realizada consulta médica para a obtenção do histórico médico e exame físico de cada voluntário, ocasião em que o médico informou ao voluntário quanto a sua aptidão física para participação no estudo ou forneceu as orientações pertinentes em caso contrário.

Após as informações adicionais relativas ao estudo e esclarecidas todas as dúvidas restantes, caso de acordo, os voluntários assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no Estudo (ANEXO 2).

Depois da seleção e observado um período de pelo menos 2 semanas sem fazer uso de qualquer medicação de forma regular ou uma semana sem fazer uso de medicação mesmo que de forma irregular, os voluntários que foram considerados qualificados para participar do estudo foram solicitados que, inicialmente, comparecessem ao laboratório clínico para coleta de amostras de sangue para realização dos testes laboratoriais de segurança pré-internação (creatinina, transaminases, hemoglobina e hematócrito e β -HCG – para as mulheres) no dia anterior ao previsto para internação.

No dia da internação, os voluntários compareceram à Unidade Clínica em Campinas para exame clínico pré-internação. Os voluntários que não apresentaram qualquer fato relevante que, segundo o protocolo, implique em desligamento do estudo, foram conduzidos através de transporte privativo à Unidade Clínica Phillipe Pinel em Itapira – SP, para efetivação da internação.

Os voluntários permaneceram na Unidade até aproximadamente 24 horas após a administração da medicação. Os voluntários receberam assistência e cuidados especializados durante todos os períodos de tratamento, o que incluiu uma averiguação sumária de suas condições quando de seu confinamento e no momento da alta.

Foi solicitado aos voluntários que relatassem qualquer evento adverso e a data de ocorrência (ANEXO 3). Eles foram também solicitados a notificar o investigador se houve ou não a necessidade de medicação adicional. Alguns efeitos adversos que ocorreram durante o período do estudo foram registrados no formulário de relato de caso (CRF).

Os exames laboratoriais pós-estudo (incluindo registro de ECG) foram repetidos cerca de 3 dias após a última coleta de sangue do ensaio, em horário previamente combinado. Após o recebimento destes resultados, os voluntários compareceram para o Exame Clínico de Alta, ocasião em que foram dispensados.

4.1.1.1 Critérios de Inclusão do Voluntário

Os seguintes critérios foram seguidos para que o voluntário fossem aceitos à participar do estudo:

- Voluntários de ambos os sexos com idade entre 18 a 50 anos. As mulheres não poderão estar grávidas e nem em regime de amamentação.
- Voluntário que apresentem seu índice de massa corpórea maior ou igual a 19 e menor ou igual a 28. (os limites do Índice de Massa Corpórea são definidos no *Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans, 2000, U.S. Department of Agriculture U.S. Department of Health and Human Services, Fifth Edition, 2000 pp 6-8*, tendo sido considerada uma tolerância de 12% quanto ao limite superior).
- Boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo médico, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico e psicológico, ECG, e exames laboratoriais complementares.
- Capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos e com intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.1.1.2 Critérios de Exclusão do Voluntário

Os seguintes critérios foram seguidos para a exclusão do voluntário à participar do estudo:

- O voluntário tem o conhecimento de hipersensibilidade à droga estudada ou a compostos quimicamente relacionados; história de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer droga;
- Histórico ou presença de doenças hepáticas ou gastrointestinais ou outra condição que interfere com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo da droga;
- Uso de terapia de manutenção com qualquer droga, excetuando-se anticoncepcionais por via oral;
- Tem história de doença hepática, renal, pulmonar, gastro-intestinal, 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;
- Achados eletrocardiográficos não recomendados a critério do investigador para participação no estudo.
- Os resultados dos exames laboratoriais complementares estão fora dos valores considerados normais, a menos que sejam considerados clinicamente irrelevantes pelo investigador.
- Voluntário é fumante.
- O voluntário ingere mais do que 5 xícaras de café ou chá por dia
- Tem história de abuso de álcool ou drogas;

- Fez uso de medicação regular dentro das 2 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;
- Foi internado por qualquer motivo até 8 semanas antes do início do primeiro período de tratamento deste estudo;
- Tratamento dentro dos 3 meses prévios ao estudo com qualquer droga conhecida de ter um potencial tóxico bem definido nos grandes órgãos.
- O voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentro dos três meses que antecedem o início deste estudo;
- O voluntário doou ou perdeu 450 mL ou mais de sangue dentre dos três meses que antecederam ao estudo ou que doou mais de 1500 mL dentro dos 12 meses precedendo o estudo.
- Teste positivo de gravidez.
- O voluntário tem qualquer condição que o impede de participar do estudo pelo julgamento do investigador

4.1.1.3 Critérios de Retirada do Voluntário

Os seguintes critérios foram seguidos para a exclusão do voluntário no estudo:

- Voluntário não deseja continuar no estudo por razões pessoais ou mesmo sem razão;
- Voluntário não deseja continuar no estudo devido os eventos adversos da droga de estudo;
- Voluntário não deseja continuar por razões outras que não efeitos adversos por exemplo: indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo.

- Não aderência às exigências estabelecidas,
- Eventos adversos ou sintomas ou sinais de possível toxicidade
- Doença intercorrente requerendo medicação.
- Resposta positiva à reavaliação de qualquer um dos critérios de exclusão, no momento da admissão ao primeiro período de tratamento ou em ocasião subsequente.
- Qualquer outra condição que, a juízo do investigador, seja do interesse para manutenção da saúde do voluntário.
- Todos os detalhes e razões da retirada do voluntário do estudo será anotada na parte do CRF destinada (Seção de Término do Estudo) e relatada aos monitores.

4.1.2 Dieta

A fim de manter a padronização dos grupos de tratamento, a dieta (alimentos e líquidos) oferecida obedeceu o mesmo padrão para todos os voluntários (ANEXO 5). Todos os alimentos e bebidas servidos foram ingeridos por completo.

A medicação foi administrada com 200mL de água mineral sem gás.

4.1.2.1 Jejum

Os voluntários permaneceram em jejum desde 8 horas antes da administração da medicação até 2 horas após a ingestão da medicação.

Os voluntários não poderão tomar líquidos desde 2 horas pré-administração da medicação e até 2 horas após a ingestão da medicação, exceto nas ocasiões especificamente programadas.

4.1.3 Aspectos Éticos

O protocolo clínico e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp (ANEXO 4). O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996) e Edimburgo (2000).

4.1.4 Planejamento da Pesquisa

4.1.4.1 Dados do Medicamento

Formulação Teste: Maleato de dexclorfeniramina + betametasona (2mg/0.25mg) comprimido da EMS Indústria Farmacêutica Ltda.

Formulação Referência: Celestamine® comprimidos de Maleato de dexclorfeniramina + betametasona (2mg/0.25mg) da Schering Plough.

4.1.4.2 Desenho do Estudo

O total de 26 voluntários sadios foram selecionados sendo 13 voluntários do sexo masculino e 13 do sexo feminino.

Estudo foi 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.

Foram coletadas amostras de sangue de voluntários sadios, antes da administração da formulação. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue tratado com o anticoagulante heparina sódica.

As formulações foram administradas em dose única por via oral seguidos de coletas de sangue até 72 horas após a dose conforme tabela 8. Os períodos de tratamento obedeceu um intervalo mínimo de 7 meias-vidas entre eles (*wash-out*). Considerando-se que a meia vida é de cerca de 12 horas para betametasona, planejou-se um intervalo mínimo de 14 dias entre as internações.

Os voluntários foram randomicamente designados a uma das seguintes seqüências de tratamento. Foi considerado previamente o balanceamento dos voluntários em função do sexo (ANEXO 6).

Tabela 8. Tempos de coletas.

Amostra	Imediatamente antes (dentro de 1 hora) da administração da
Pré-administração	medicação
Amostras	0:20h, 0:40h, 1:00h, 1:20h, 1:40h, 2:00h, 2:20h, 2:40h, 3:00
pós administração	h, 3:20h, 3:40h, 4:00h, 4:30h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h, 12h,
	14h, 16h, 18h, 24h, 48h e 72 horas após a administração

As amostras coletadas foram identificadas com a numeração do estudo, voluntário (código de identificação), período e horário de coleta.

O desenho do estudo foi baseado em dados obtidos do estudo realizado GDN132-03 sendo que foram recrutados 26 voluntários sadios. (ANEXO 7).

4.2 Etapa Analítica

4.2.1 Condições Gerais do método

4.2.1.1 Analito e Padrão Interno

betametasona

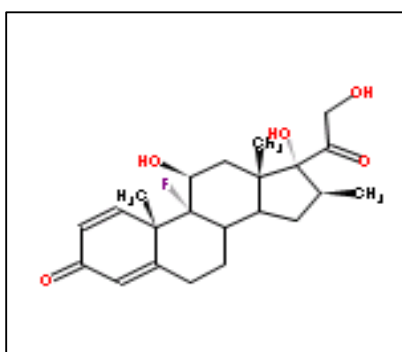


Figura 7. Estrutura Molecular da betametasona

Fórmula Molecular: $C_{22}H_{29}FO_5$

Peso Molecular: 392,4611

Massa Nominal: 392 Da

cloranfenicol (Padrão Interno)

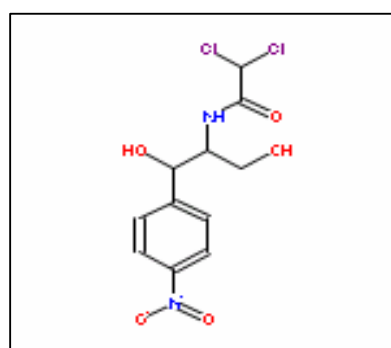


Figura 8. Estrutura Molecular do cloranfenicol

Fórmula Molecular: $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

Peso Molecular: 323,1294

Massa Nominal: 322 Da

Apesar do cloranfenicol não estar quimicamente relacionado com a betametasona, sua escolha como padrão interno foi devido ao tempo de retenção similar (1.2min para betametasona e 1.1min para cloranfenicol) semelhança do fator de resposta e recuperação do método.

4.2.1.2 Fonte de Fotoionização à pressão atmosférica (APPI)

Na fragmentação da betametasona, em modo negativo, foi observado que houve a formação do íon molecular $[M-H-CH_2O]^-$ de m/z 361 (Figura 10), com intensidade dez vezes maior que o íon molecular desprotonado $[M-H]^-$ de m/z 391 (Figura 9). A formação do íon $[M-H-CH_2O]^-$ provavelmente ocorreu na fonte pela perda do formaldeído (CH_2O), envolvendo a clivagem do carbono C20 e C21 demonstrado na Figura 11. Esta clivagem foi observada anteriormente pela dissociação da colisão-induzida do íon $[M + \text{acetato}]^-$ em Fonte de Electrospray (ESI), acoplado a espectrometria de massas (Antignac *et al*, 2000).

A transição mais intensa foi m/z 361 $\rightarrow$ m/z 307, que provavelmente ocorreu pela perda de um grupo metil, HF e uma molécula de água como também é demonstrado na Figura 11.

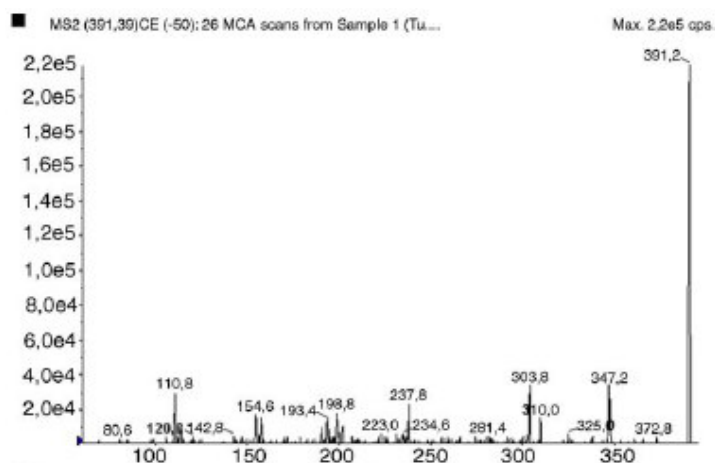


Figura 9. Espectro de massa do Íon produto da betametasona

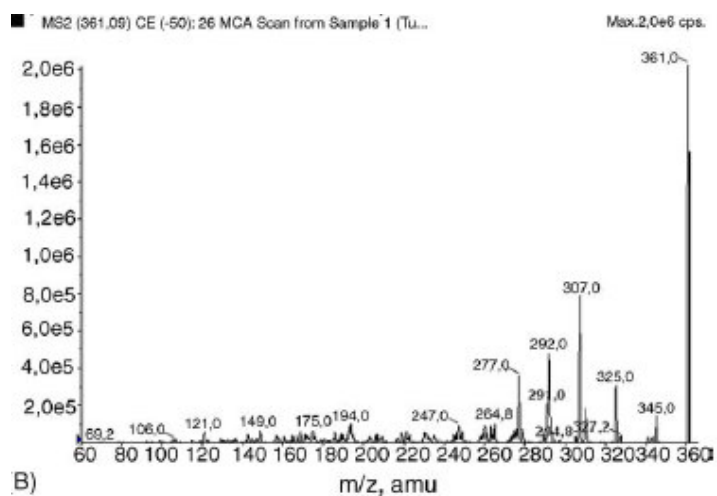


Figura 10. Espectro de massa do íon produto da betametasona – $\text{CH}_2\text{O-H}$

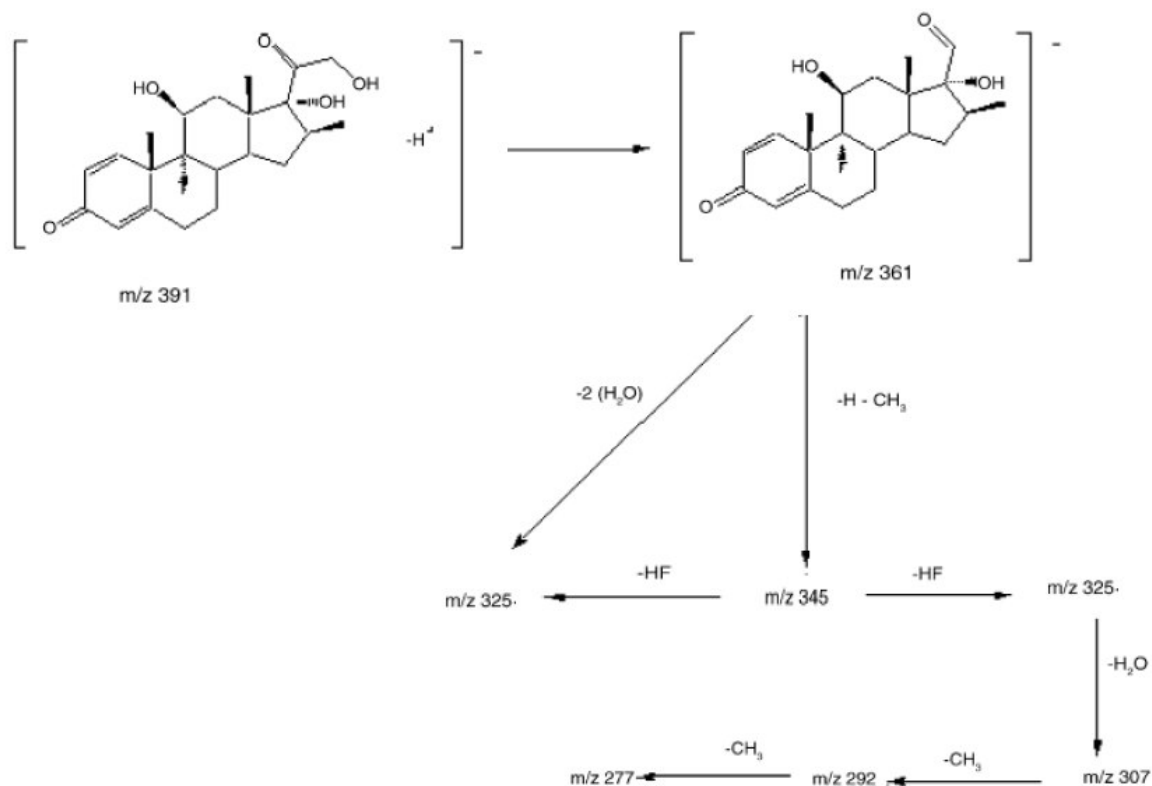


Figura 11. Caminhos propostos da fragmentação de massa da betametasona

Na fragmentação do cloranfenicol, observou-se que o íon molecular desprotonado $[\text{M}-\text{H}]^-$ foi o pico base no espectrômetro de massas (Figura 12). A transição mais intensa foi m/z

321 → m/z 152, que provavelmente ocorreu pela clivagem da ligação carbono-carbono no ramo alquila como é demonstrado na Figura Fig. 13.

Semelhante fragmentação do cloranfenicol foi anteriormente reportada através da análise pela técnica de eletrospray em modo negativo (Mottier *et al.*, 2003).

Dados na literatura mostram que em análises de resíduos de cloranfenicol em alimentos em LC-MS com a utilização da Ionização Química à pressão atmosférica (APCI) em modo negativo, o grupo funcional de cloranfenicol captura elétrons gerados da descarga corona e perde prótons, tornando-se negativo devido sua alta afinidade eletrônica (Takino *et al.*, 2003). Como também foi relatado um mecanismo similar, pela utilização da técnica de fotoionização, onde o íon molecular reage com o íon da fase móvel, o que leva a formação do íon molecular $[M-H]^-$ (Takino *et al.*, 2003).

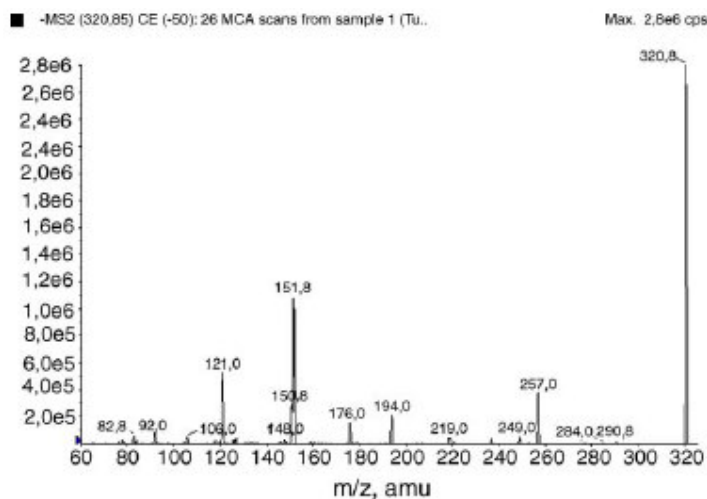


Figura 12. Espectro de massa do Íon produto do Cloranfenicol

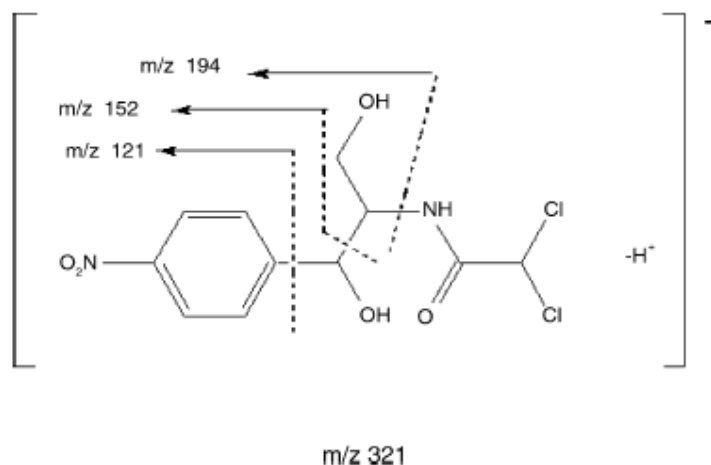


Figura 13. Caminhos propostos da fragmentação de massa do cloranfenicol

Devido a alta intensidade da transição m/z 361→307 (betametasona) e m/z 321→152 (cloranfenicol) e não detectar interferência em amostras branco de plasma humano essas transições foram escolhidas para o método.

4.2.1.3 Condições do Espectrômetro de Massas

O espectrômetro de massas utilizado foi o API3000, equipado com uma fonte de fotoionização à pressão atmosférica (APPI), operando em modo negativo (ESP⁻). A temperatura do bloco da fonte foi programada para 400°C, o nitrogênio foi utilizado como gás de colisão e o tolueno como dopante com fluxo de 10µL/min através da bomba de infusão. Os dados foram adquiridos pelo Software Analyst 1.3.4 (Applied Biosystems).

4.2.1.4 Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas usadas durante as análises são listadas na Tabela 9:

Tabela 9. Condições cromatográficas do método.

Parâmetros	Descrição
Fase Móvel	Acetonitrila/Água (80/20; v/v) 20mM Acetato de Amônio
Coluna Analítica	10cm x 2.1mm GENESIS C18 120A 4um
Pré Coluna	C18
Temperatura da Auto injetor	8 °C
Fluxo	0.350 mL/min
Pressão	120 Bar
Temperatura da Coluna	Temperatura Ambiente
Volume de Injeção	40uL
Tempo total de corrida	2.5 min

Sob essas condições, o tempo de retenção observado para o analito betametasona foi de 1,2 min e para o padrão interno cloranfenicol e 1,1 min.

4.2.1.5 Extração das amostras

O protocolo experimental para a extração das amostras foi seguido conforme a Figura 14.

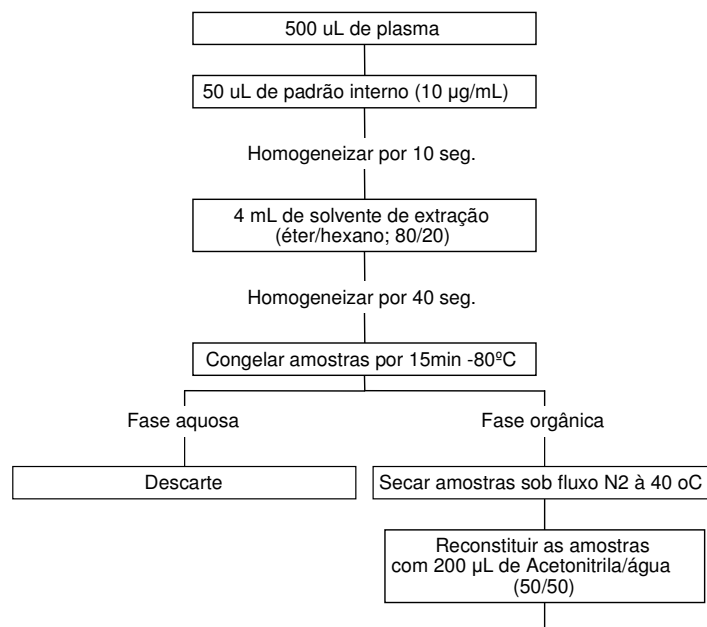


Figura 14. Método para extração das amostras

4.2.1.6 Preparo das Soluções Padrão

Todas as soluções preparadas foram preparadas em tubos de polipropileno rotulados adequadamente para serem armazenados a + 4°C na geladeira utilizando acetonitrila/água (50/50) como diluente.

4.2.1.6.1 Solução Padrão de betametasona

Foi pesado uma quantidade apropriada de betametasona em tubo de polipropileno e diluído em solução de acetonitrila/água (50/50), para a obtenção das soluções de concentração 1000 ug/mL.

4.2.1.6.2 Solução Padrão Interno cloranfenicol

Foi pesado uma quantidade apropriada de cloranfenicol dentro de tubo de polipropileno e diluído em uma solução de acetonitrila/água (50/50), para a obtenção das soluções de concentração 1000 ug/mL .

4.2.1.7 Preparo das soluções de Trabalho

As soluções de trabalho foram obtidas por diluições da solução de betametasona em acetonitrila/água (50/50), para a construção dos pontos da curva de calibração.

4.2.1.7.1 Soluções de Trabalho de betametasona para curva analítica

As soluções que foram utilizadas para preparação da curva analítica em plasma estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Preparo das soluções dos padrões da curva de calibração.

Concentração Final (ng/mL)	Fonte da Solução Mãe:		Volume do Diluente (mL)	Volume Final (mL)	Fator de Diluição
	Volume adicionado (in mL)	Concentração (ng/mL)			
100000	1.00	1000000	9.00	10	10.00
10000	1.00	100000	9.00	10	10.00
5000	2.50	10000	2.50	5	2.00
2000	1.00	10000	4.00	5	5.00
1000	1.00	10000	9.00	10	10.00
500	1.00	5000	9.00	10	10.00
200	1.00	2000	9.00	10	10.00
100	1.00	1000	9.00	10	10.00
50	1.00	500	9.00	10	10.00
20	1.00	200	9.00	10	10.00
10	1.00	100	9.00	10	10.00
5	1.00	50	9.00	10	10.00
2	1.00	20	9.00	10	10.00
1	1.00	10	9.00	10	10.00
0.5	1.00	5	9.00	10	10.00

4.2.1.7.2 Soluções de Trabalho de betametasona para controles de qualidade

As soluções que foram utilizadas para preparação dos controles de qualidade em plasma estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11. Preparo das soluções dos controles de qualidade.

Concentração final (ng/mL)	Fonte da Solução Mãe:		Volume do diluente (mL)	Volume final (mL)	Fator de diluição
	Volume adicionado (in mL)	Concentração (ng/mL)			
10000	1.00	100000	9.00	10	10.0
1000	1.00	10000	9.00	10	10.0
400	4.00	1000	6.00	10	2.5
150	1.50	400	2.50	4	2.7
40	1.00	400	9.00	10	10.0
15	1.00	150	9.00	10	10.0
1.5	1.00	15	9.00	10	10.0

4.2.1.7.3 Soluções de Trabalho do padrão interno

O preparo da solução do padrão interno está descrito na Tabela 12.

Tabela 12. Preparo da solução do padrão interno.

Concentração final (ng/mL)	Fonte da Solução Mãe:		Volume do diluente (mL)	Volume final (mL)	Fator de diluição
	Volume adicionado (in mL)	Concentração (ng/mL)			
100000.00	1.0	1000000	9.0	10	10
10000.00	1.0	100000	9.0	10	10
1000.00	1.0	10000	9.0	10	10
100.00	1.0	1000	9.0	10	10
10.00	0.4	1000	39.6	40	100

4.2.1.7.4 Preparo da curva de calibração em plasma

A curva de calibração consistiu de uma amostra branco (matriz processada sem o padrão interno), uma amostra zero (matriz processada com o padrão interno) e 8 padrões em plasma a serem quantificados.

Os padrões de calibração foram preparados pela contaminação do plasma humano com as soluções de trabalho descrito na Tabela 10. As análises foram executadas em duplicata para cada uma das concentrações conforme Tabela 13.

Tabela 13. Preparo da curva analítica em plasma.

Analito	Concentração no Plasma (ng/mL)	Solução de Trabalho		Volume de Plasma Adicionado (mL)	Volume Total (mL)
		Volume adicionado (in mL)	Concentração (ng/mL)		
Betametasona	0.05	0.05	0.5	0.45	0.50
Betametasona	0.10	0.05	1	0.45	0.50
Betametasona	0.20	0.05	2	0.45	0.50
Betametasona	1	0.05	10	0.45	0.50
Betametasona	5	0.05	50	0.45	0.50
Betametasona	10	0.05	100	0.45	0.50
Betametasona	20	0.05	200	0.45	0.50
Betametasona	50	0.05	500	0.45	0.50
Padrão Zero	-	-	-	-	-
Padrão Branco	-	-	-	-	-

4.2.1.7.5 Preparo dos controles de qualidade em plasma

As amostras dos controles de qualidade foram preparadas com o objetivo de monitorar a precisão e exatidão do método de quantificação.

As amostras do controle de qualidade e do limite inferior de quantificação foram preparadas adicionando as soluções trabalho do analito a ser quantificado ao plasma humano conforme Tabela 14.

Tabela 14. Preparo dos controles de qualidade em plasma.

Controle de Qualidade	Analito	Concentração no plasma (ng/mL)	Solução de Trabalho		Volume de Plasma Adicionado (mL)	Volume Total (mL)
			Volume adicionado (mL)	Concentração (ng/mL)		
Alto (C)	Betametasona	40	0.50	400	4.5	5
Médio (B)	Betametasona	4	0.50	40	4.5	5
Baixo (A)	Betametasona	0.15	0.50	1.5	4.5	5
LIQ	Betametasona	0.05	0.50	0.5	4.5	5

4.2.2 Validação do método analítico

Os estudos foram conduzidos de acordo com a Resolução nº 899 de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os testes foram realizados para demonstrar que o método analítico proposto é adequado e confiável.

A validação do método consistiu de um pré estudo que avaliou os parâmetros como sensibilidade, especificidade, linearidade, exatidão, precisão e reprodutibilidade; definição dos parâmetros do estudo tais como limite de quantificação, concentração dos padrões da curva de calibração e dos controles de qualidade; determinação da estabilidade do analito.

4.2.2.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade avalia habilidade do método bioanalítico de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz.

Para a realização da especificidade, foram testadas amostras de plasma humano normal, lipêmico e hemolizado. Cada amostra foi testada utilizando os procedimentos de extração e condições cromatográficas propostas e comparada com aquela obtida com uma solução do analito na concentração do limite inferior de quantificação.

As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20% e 5% da resposta na concentração utilizada.

4.2.2.2 Validação da Curva de Calibração/Linearidade

Para determinar a curva de calibração, oito padrões não zero foram preparados. As concentrações dos padrões foram definidas em testes preliminares, incluindo a primeira quantificação de amostras, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas.

Os parâmetros envolvidos assim como os critérios para determinar a validação da curva de calibração estão mencionados a seguir:

4.2.2.3 Determinação do Limite Inferior de Quantificação

O limite inferior de quantificação foi definido levando em conta o método de sensibilidade, precisão e exatidão. Para avaliar a precisão e exatidão, amostras dos CQ foram incluídas no procedimento de validação.

Os seguintes critérios foram estabelecidos para a determinação do LIQ:

- Não apresentar interferência na amostra branco no tempo retenção do analito, ou a resposta para o LIQ deve ser 7 vezes maior que qualquer interferência na amostra branco no mesmo tempo de retenção.
- Resposta do pico do analito identificável e reprodutível, com precisão de 20% calculada quando ambos os padrões em duplicata forem aprovados, e exatidão entre 80% - 120% em relação à concentração nominal do padrão.

4.2.2.4 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (Brasil, 2003b).

A linearidade foi determinada para avaliar a performance do método. A regressão linear de 1/x² foi executada na razão área do pico de betametasona e cloranfenicol *versus* as concentrações de betametasona de 8 padrões de plasma (0,05; 0,1; 0,2; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 50,0 ng/mL) em duplicata para gerar a curva de calibração.

A linearidade da curva de calibração foi avaliada dentro dos seguintes critérios:

- Desvio menor ou igual a 20% da concentração nominal do LIQ, para pelo menos uma das duplicatas;
- Desvio menor ou igual a 15% em relação a outros padrões para pelo menos uma das duplicatas;
- Pelo menos 75% dos padrões de cada concentração nominal obedecer aos critérios descritos acima;
- Apresentar um coeficiente de correlação igual ou maior que 0,98.

4.2.2.5 Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão, quatro concentrações distintas (CQA, CQB, CQC e LIQ) foram avaliadas usando oito amostras de cada concentração. A precisão e exatidão foram determinadas dentro de um mesmo dia de ensaio (precisão e exatidão intra-corrida), e entre diferentes dias (precisão e exatidão inter-corrida).

4.2.2.5.1 Determinação das Concentrações dos Controles de Qualidade (CQ) e Limite inferior de Quantificação (LIQ)

Os controles de qualidade foram definidos baseados nos critérios apresentados na tabela 15, e ajustados nos teste subsequentes e na quantificação das amostras levando em consideração a variação dos valores analíticos.

Tabela 15. Definições para determinação dos controles de qualidades.

Tipo do Controle de Qualidade	Nomenclatura	Definições	Valor definido (Concentração final no plasma)
Limite Inferior de Quantificação	LIQ	Mesma concentração do LIQ	0.05ng/mL
Controle de qualidade de baixa concentração.	CQA	Menor ou igual 3 x LIQ	0.15ng/mL
Controle de qualidade de média concentração.	CQB	Valor intermediário entre CQA e CQC	4.0ng/mL
Controle de qualidade de alta concentração.	CQC	75 a 90% da maior concentração da curva de calibração	40.0ng/mL

4.2.2.5.2 Precisão e Exatidão Intra-corrida

A validação da precisão e exatidão intra-corrida foi conduzida usando um ensaio contendo as seguintes amostras:

- Uma curva de calibração contendo os padrões para Betametasona;
- Oito amostras de CQ e LIQ de cada uma das concentrações;
- As amostras do CQ e LIQ foram preparadas de diferentes soluções “mãe” das amostras padrões.

Os seguintes critérios foram estabelecidos para a determinação precisão e exatidão intra-corrida:

- Precisão: para cada nível de concentração o CV não deve exceder 15%, com tolerância de 20% para o LIQ.
- Exatidão: valores médios de cada uma das concentrações CQA, CQB e CQC devem estar dentro de 15% do valor nominal, com tolerância de 20% para o LIQ.

4.2.2.5.3 Precisão e Exatidão Inter-corrida

A validação da precisão e exatidão inter-corrida foi conduzida usando três ensaios, cada um preparado com plasma humano coletado de fontes diferentes.

As mesmas condições de preparação das amostras definidas para a validação intra-corrida foram seguidas.

Os critérios estabelecidos para a determinação da precisão e exatidão inter-corrida foram os mesmos adotados para a validação intra-corrida.

4.2.2.6 Recuperação

A eficiência da extração do método analítico foi assegurada usando uma lista específica contendo as seguintes amostras:

- Cinco amostras do CQ de cada concentração (CQA, CQB e CQC), obtidos pelo processo de extração usual;
- Pelo menos três amostras de cada uma das concentrações mencionadas acima, obtidas por diluição das soluções de trabalho em plasma branco extraído.

A recuperação foi avaliada pelo cálculo da média da resposta de cada concentração e comparando as áreas dos picos das amostras extraídas do plasma com as áreas dos picos das amostras não extraídas de concentração correspondente.

A comparação com amostras não extraídas, ruídos nos resíduos de plasma foi realizada para eliminar o efeito matriz, dando uma recuperação verdadeira.

Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximo a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (Brasil, 2003b).

4.2.2.7 Testes de Estabilidade

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras (Brasil, 2003b).

A estabilidade do analito deve ser avaliada durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas.

Os procedimentos de estabilidade realizados avaliaram a estabilidade do analito em plasma humano sob condições distintas de temperatura e armazenamento, bem como a estabilidade do analito na solução estoque.

Foram utilizadas as concentrações baixa, média e alta dos controles de qualidade incluindo o analito e o padrão interno.

Cinco alíquotas de cada concentração foram extraídas e quantificadas imediatamente para obter os valores de referência e outras cinco alíquotas de cada concentração foram processadas para os testes desejados.

4.2.2.7.1 Estabilidade Pós-Processamento

Para avaliar a estabilidade pós-processamento, cinco alíquotas de cada tipo das amostras foram mantidas, imediatamente após preparação, na temperatura de pós-processamento durante a análise. As amostras extraídas foram deixadas à temperatura ambiente por 24hs.

4.2.2.7.2 Estabilidade com Ciclos de Congelamento e Degelo

Para avaliar a estabilidade, ciclos de congelamento e degelo foram estabelecidos para a estocagem das três concentrações distintas das amostras na temperatura de -20°C, seguido por um degelo à temperatura ambiente. Foram utilizadas cinco amostras de CQA, CQB e CQC.

O procedimento do teste ocorreu da seguinte maneira:

Ciclo 1 - As amostras foram congeladas a -20°C e mantidas no freezer por 24 horas. Após este período, foram descongeladas à temperatura ambiente e retornadas ao freezer.

Ciclo 2 - As amostras permaneceram congeladas por 12 horas. Após esse tempo, foram novamente descongeladas à temperatura ambiente e quando totalmente líquidas, retornaram ao freezer.

Ciclo 3 - As amostras permaneceram congeladas por 12 horas. Após esse tempo, foram novamente descongeladas à temperatura ambiente e quando totalmente líquidas. No último ciclo as amostras foram quantificadas junto com as amostras de referência preparadas a fresco.

4.2.2.7.3 Estabilidade de Curta Duração à Temperatura Ambiente

Para o teste proposto, cinco alíquotas de cada amostra de CQA, CQB e CQC foram mantidas antes do preparo à temperatura ambiente por 8 horas, o qual excede o tempo em que as amostras poderiam ser mantidas à temperatura ambiente depois de descongeladas até serem analisadas. A estabilidade do analito foi comparada com a respectiva amostra recém-preparada.

4.2.2.7.4 Estabilidade de Longa Duração

Alíquotas de cada amostra foram inicialmente congeladas a -20°C e então descongeladas para serem extraídas e quantificadas após 28 e 40 dias. Este tempo de armazenamento é superior ao intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última amostra dos voluntários.

Para a verificação da estabilidade, utilizaram-se cinco amostras de cada controle de qualidade CQA, CQB e CQC para 28 dias, porém para 40 dias as concentrações de CQA, CQB e CQC foram 1,5 ng/mL, 15 ng/mL e 150 ng/mL respectivamente.

4.2.2.7.5 Estabilidade da Solução Estoque

Para avaliar a estabilidade da solução padrão, as soluções de cada analito e dos padrões internos foram preparadas a fresco e comparadas com as mesmas soluções anteriormente avaliadas após 22 dias da preparação.

4.2.2.8 Teste de supressão iônica

A supressão do sinal do espectrômetro de massa pode ser causada por contaminação, como sais, proteínas, aminoácido que são introduzidos juntamente com a fase móvel no espectrômetro de massas, assim, o desenvolvimento de um método de uma extração não específica pode causar a supressão iônica que irá interferir na análise da amostra.

Para avaliar a supressão iônica no sinal do espectrômetro de massas uma amostra branca processada foi injetada no sistema da CLAE enquanto que uma solução concentrada de 1 µg/mL do analito foi introduzida através da bomba de infusão diretamente na fonte de ionização (Figura 15)

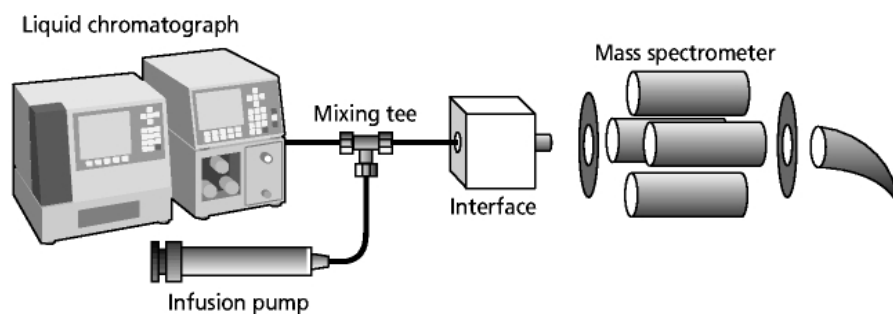


Figura 15. Sistema para realização do teste de supressão iônica.

4.3 Etapa Estatística

4.3.1 Análise Farmacocinética e Estatística

A taxa de eliminação constante (k_e) foi estimada por regressão linear dos pontos descrevendo a fase de eliminação em uma curva logarítmica-linear. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi derivado desta taxa constante ($t_{1/2} = \ln(2)/k_e$).

A bioequivalência entre as duas formulações foi avaliada pelo cálculo individual da razão teste/referência para o pico da concentração máxima (C_{max}), área sob a curva (ASC) da concentração plasmática até a última concentração observada (ASC_{last}), e a área sob a curva entre a primeira amostra (pré-dosagem) e infinito (ASC_{0-inf}). A concentração máxima e o tempo empregado para alcançar esta concentração (T_{max}) foram obtidos diretamente das curvas. As áreas sob as curvas da concentração de plasma de betametasona versus o tempo de zero até a última concentração detectada (ASC_{last}) foram calculadas pela aplicação de uma equação linear trapezóide. A extrapolação destas áreas ao infinito (ASC_{0-inf}) foi feita pela adição do valor C_{last}/ke para a ASC_{last} calculada (onde C_{last} é a última concentração quantificada).

Os dados da ASC e C_{max} para as duas formulações foram analisados pelo ANOVA para estabelecer se o intervalo de confiança (IC) de 90% da razão estava dentro do intervalo de 80 – 125% indicando bioequivalência como proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003c). Análises paramétricas e não-paramétricas das médias aritméticas e diferenças individuais de T_{max} entre as formulações teste e referência foram também executadas. O programa usado inclui o WinNonLin Professional Network Edition (Scientific Consulting, v. 1.5), Microsoft Excel (v. 7.0) e GraphPad Prism (v. 3.02).

5 RESULTADOS

5.1 Especificidade/Seletividade

Não foram encontradas interferências significativas no mesmo tempo de retenção do analito ou do padrão interno, como metabólitos, compostos de degradação, como demonstrado nos cromatogramas das Figuras 16, 17 e 18.

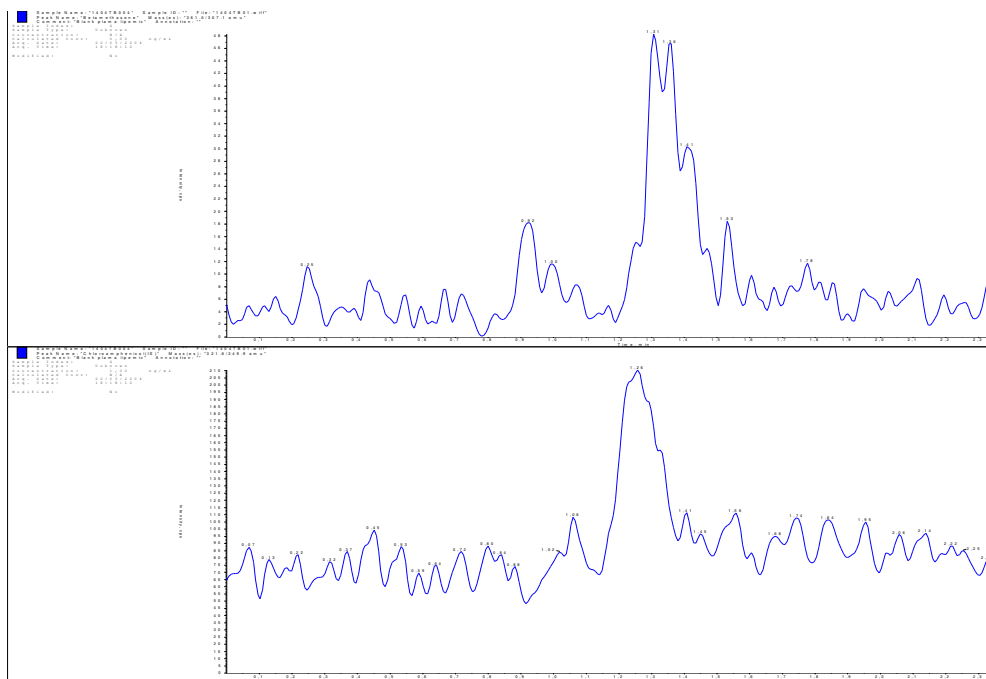


Figura 16. Corrida analítica com plasma lipêmico.

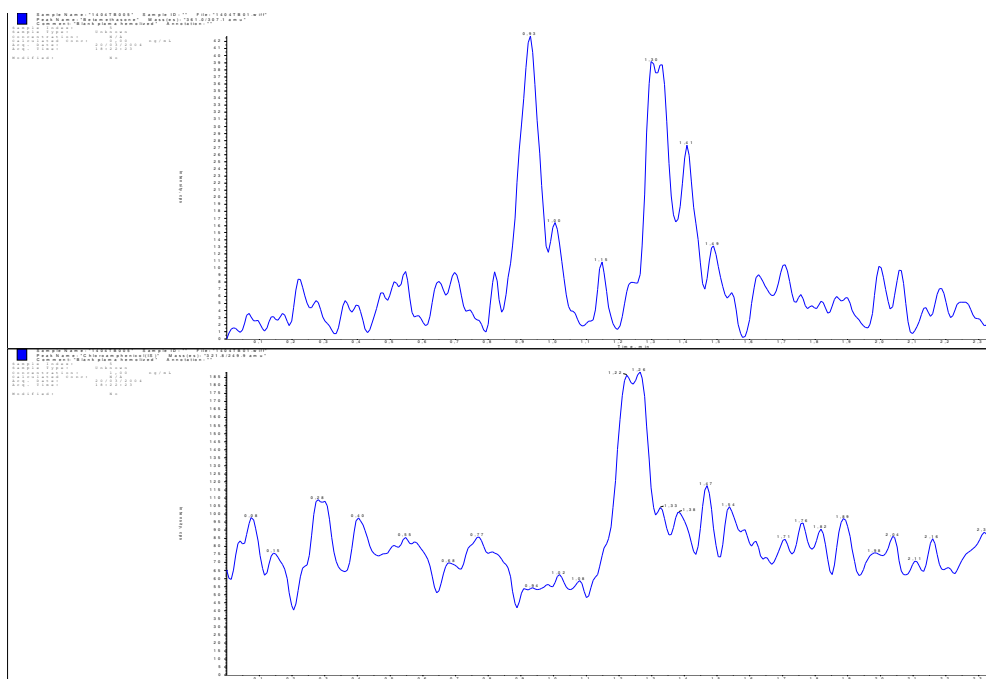


Figura 17. Corrida analítica com plasma hemolizado

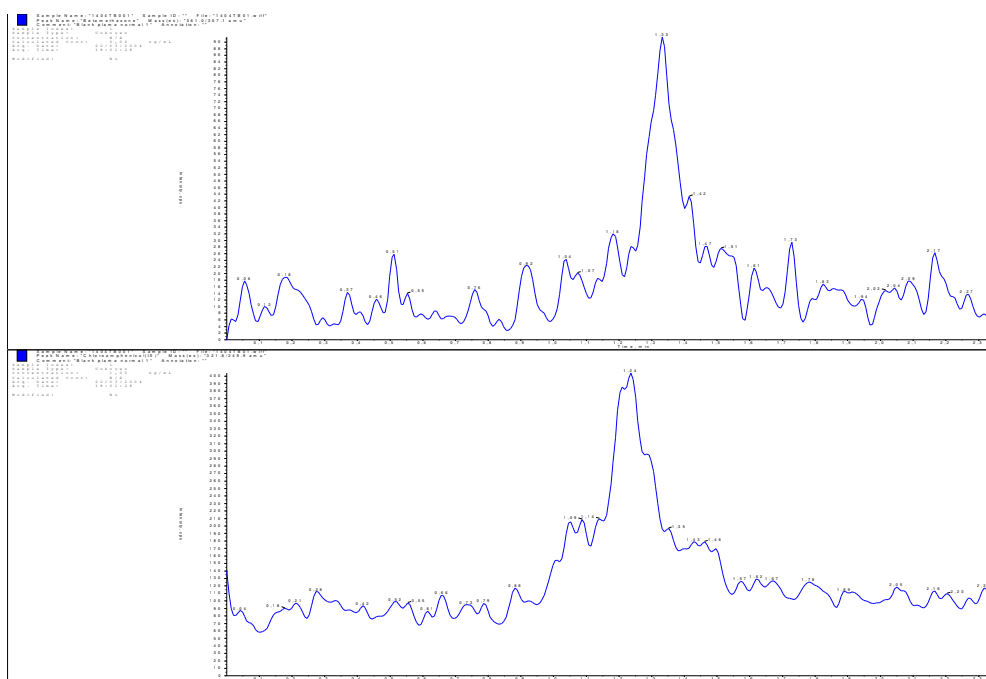


Figura 18. Corrida analítica com plasma normal

.Nas Figuras 19, 20, 21, 22 e 23 são mostrados cromatogramas típicos do zero, LIQ, CQA, CQB e CQC.

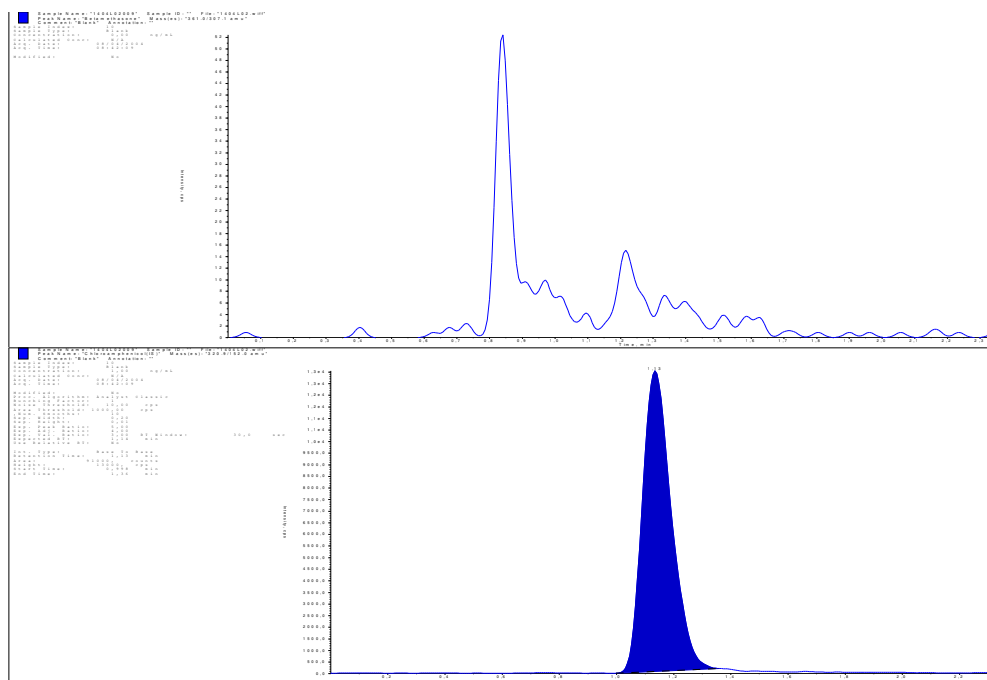


Figura 19. Cromatograma típico do zero (plasma branco + padrão interno)

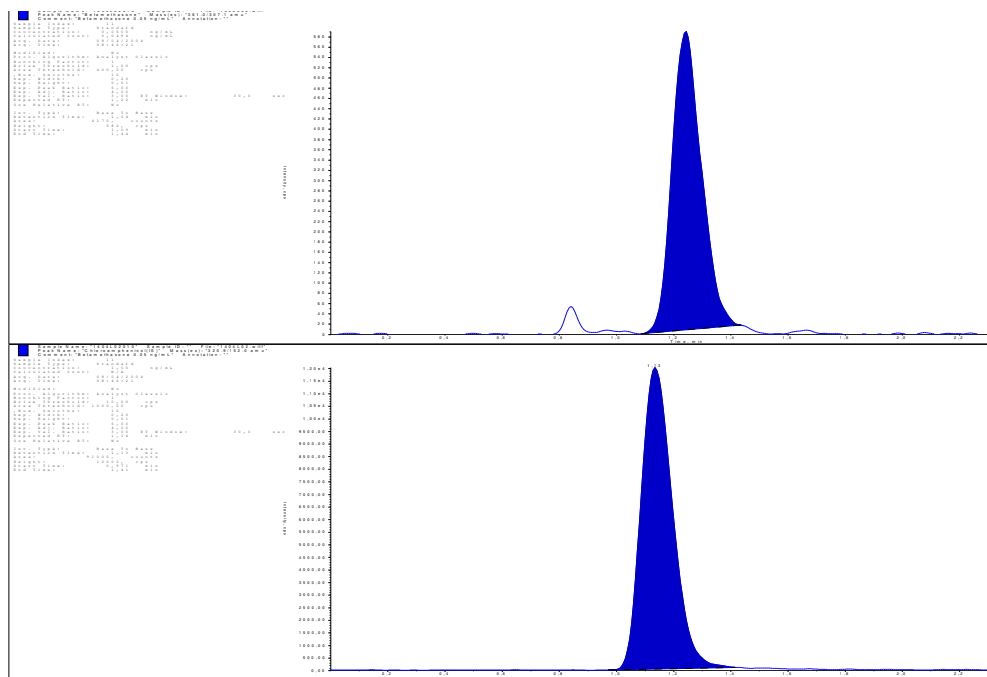


Figura 20. Cromatograma típico do Limite inferior de quantificação. (LIQ)

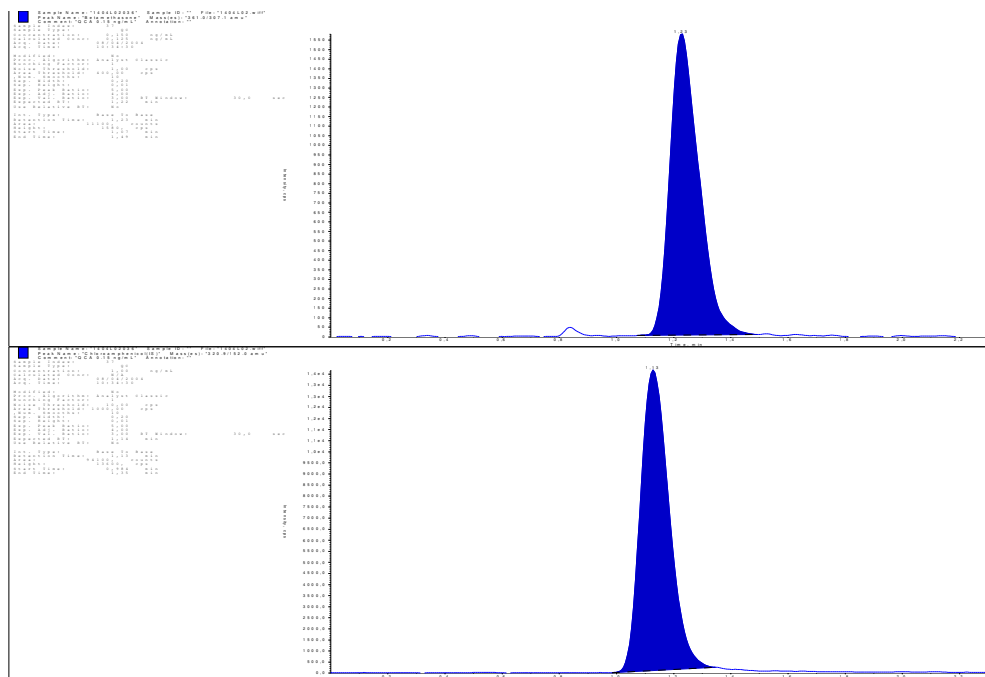


Figura 21. Cromatograma típico do controle de qualidade baixo (CQA).

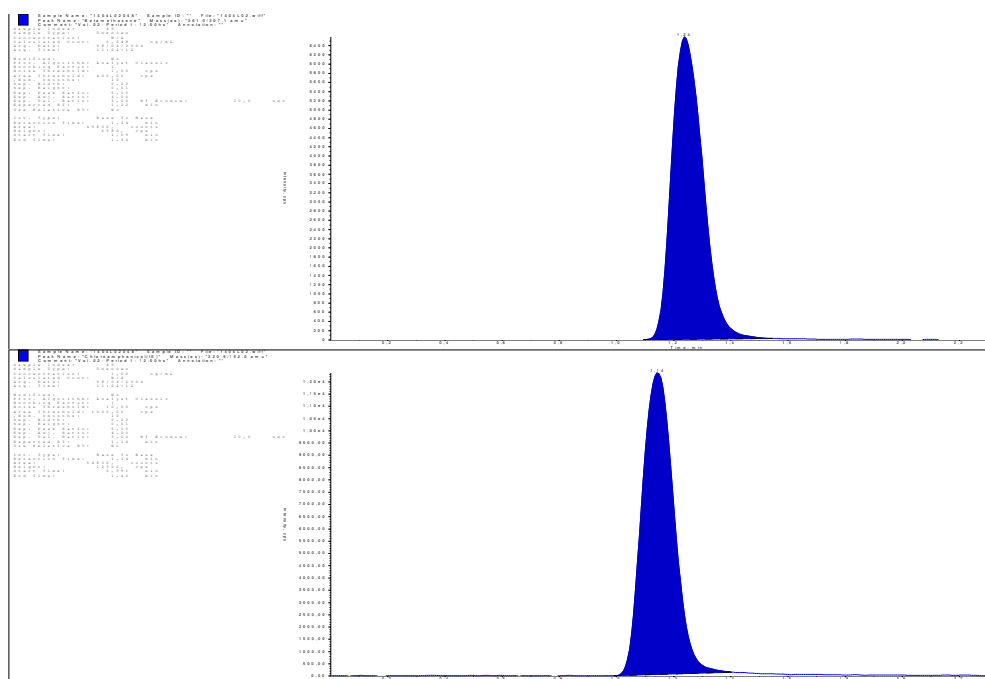


Figura 22. Cromatograma típico do controle de qualidade médio (CQB).

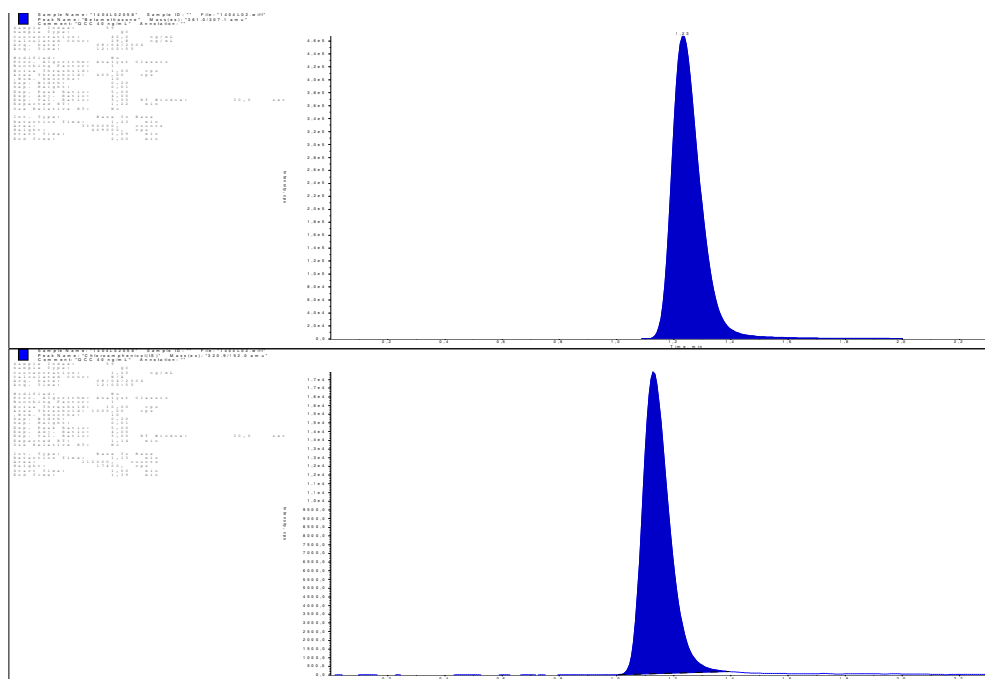


Figura 23. Cromatograma típico do controle de qualidade alto (CQC).

5.2 Linearidade

O método de regressão que descreve a curva de calibração de betametasona foi linear com peso $1/x^2$. Três curvas de calibração, preparadas independentemente de diferentes soluções padrões, foram avaliadas.

Dados da média das três curvas de calibração foram apresentados na Tabela 16 e sua típica curva de regressão linear na Figura 24.

Tabela 16. Média das três curvas das validações.

Concentração nominal (ng/mL)	Concentração quantificada (ng/mL)			Média (ng/mL)	Exatidão (%)	CV (%)	Concentração Aprovada?
	Identificação da corrida						
	1404VA04	1404VA05	1404VA06				
0.05	0.047	0.0506	0.0584	0.0520	104.0	11.2	Sim
	0.0501	0.0472	0.0405	0.0459	91.9	10.7	
0.10	0.0996	0.0983	0.0986	0.0988	98.8	0.7	Sim
	0.114	0.107	0.107	0.1093	109.3	3.7	
0.20	0.184	0.19	0.187	0.1870	93.5	1.6	Sim
	0.214	0.223	0.213	0.2167	108.3	2.5	
1.00	0.932	0.995	0.969	0.9653	96.5	3.3	Sim
	0.982	0.967	0.963	0.9707	97.1	1.0	
5.00	4.69	4.74	4.83	4.7533	95.1	1.5	Sim
	5.02	5.09	4.98	5.0300	100.6	1.1	
10.00	9.61	9.49	9.2	9.4333	94.3	2.2	Sim
	9.95	9.62	10.5	10.0233	100.2	4.4	
20.00	19.7	19.1	19.5	19.4333	97.2	1.6	Sim
	20.7	21.7	22.2	21.5333	107.7	3.5	
50.0	50.6	58.8	75.1	61.5000	123.0	20.3	Sim
	55	52.1	51.3	52.8000	105.6	3.7	
Coefficiente de Correlação	0.9999	0.9969	0.9890		0.9961		-

1404LIST02.rdb (Betamethasone): "Linear" Regression ("1 / (x * x)" weighting): $y = 0,961 x + -0,00167$ ($r = 0,9991$)

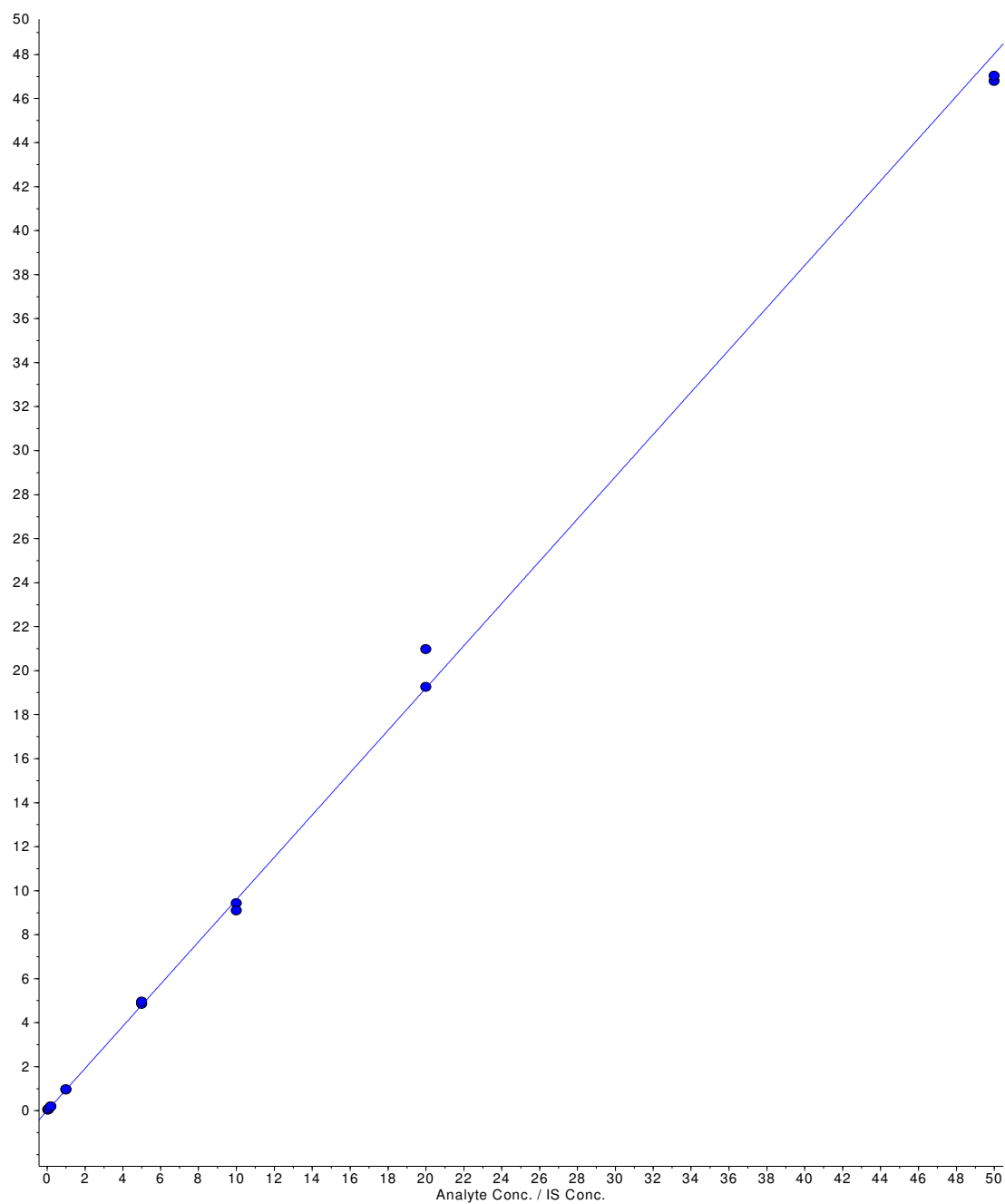


Figura 24. Típica curva do método de regressão linear.

5.3 Precisão e exatidão intra e inter-corrida

5.3.1 Limite inferior de Quantificação (LIQ)

O menor padrão 0.05 ng/mL provou ser o menor limite de quantificação (LIQ) do método , dentro dos valores estabelecidos precisão e exatidão ilustrado na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados de precisão e exatidão intra e inter-corridas para LIQ.

Identificação da Amostra		LIQ		
Identificação da Corrida	1404VA04	1404VA05	1404VA06	
Concentração quantificada (ng/mL)	0.0421	0.0484	0.0556	
	0.0533	0.0501	0.0545	
	0.0500	0.0488	0.0477	
	0.0446	0.0468	0.0454	
	0.0426	0.0526	0.0446	
	0.0420	0.0428	0.0517	
	0.0116*	0.0472	0.0373	
	0.0293	0.0501	0.0541	
Média Intra-Corrida (ng/mL)	0.0434	0.0484	0.0489	
Precisão Intra-Corrida (CV%)	17.5	6.0	12.9	
Exatidão Intra-Corrida (%)	86.8	96.7	97.7	
Média Inter-Corrida (ng/mL)		0.0469		
Precisão Inter-Corrida (CV%)		13.0		
Exatidão Inter-Corrida (%)		93.8		

*Valor excluído

5.3.2 Controles de Qualidade (CQ)

Os controles de qualidade CQA, CQB e CQC apresentaram resultados dentro dos valores estabelecidos para precisão e exatidão ilustrado na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados de precisão e exatidão intra e inter-corridas para controles de qualidade.

Identificação da Amostra	CQA			CQB			CQC		
Identificação da Corrida	1404	1404	1404	1404	1404	1404	1404	1404	1404
	VA04	VA05	VA06	VA04	VA05	VA06	VA04	VA05	VA06
Concentração Quantificada (ng/mL)	0.137	0.135	0.143	3.38	3.16	3.39	39.6	34.4	33.1
	0.137	0.143	0.143	3.87	3.45	3.64	44.5	37.9	36.6
	0.143	0.141	0.151	3.82	3.22	3.84	39.1	39.2	36.0
	0.166	0.132	0.137	4.06	3.22	3.89	39.4	41.7	41.5
	0.147	0.136	0.129	3.86	3.62	3.44	41.2	35.9	45.9
	0.108	0.197*	0.144	2.98	3.54	3.5	39.7	37.1	36.3
	0.146	0.135	0.146	3.86	3.60	4.41	38.6	35.1	39.4
	0.141	0.109	0.141	3.82	3.98	3.49	37.8	34.2	49.3
Média Intra-Corrida (ng/mL)	0.141	0.133	0.142	3.71	3.47	3.7	40.0	36.9	39.8
Precisão Intra-Corrida (CV%)	11.4	8.5	4.6	9.5	7.9	9.2	5.2	7.0	13.9
Exatidão Intra-Corrida (%)	93.8	88.7	94.5	92.7	86.8	92.5	100.0	92.3	99.4
Média Inter-Corrida (ng/mL)	0.138			3.63			38.9		
Precisão Inter-Corrida (CV%)	8.7			9.0			9.8		
Exatidão Inter-Corrida (%)	92.3			90.7			97.2		

*Valor excluído

5.4 Recuperação

Os resultados para o analito betametasona e o padrão interno cloranfenicol, mostraram uma recuperação próxima de 100% nas três diferentes concentrações como indicado na Tabela 19 e 20. Estes resultados estiveram de acordo com os parâmetros de consistência e reprodutibilidade, e foram considerados adequados para o método.

Tabela 19. Resultados da recuperação média para betametasona.

Analito: betametasona						
Tipo de Conc.	Tipo Plasma	Amostras não processadas (ng/mL)	Amostras Processadas (ng/mL)	Recuperação Individual (%)	Média da Recuperação (%)	CV (%)
CQA (Baixa)	Pool 1	0.1698	0.1308	77.0	92.6	15.7
	Pool 2	0.1712	0.1622	94.70		
	Pool 3	0.1482	0.157	105.90		
CQB (Média)	Pool 1	3.820	3.956	103.60	99.8	7.6
	Pool 2	3.744	3.870	103.40		
	Pool 3	4.058	4.082	100.60		
	Hemolizado	3.096	3.246	104.80		
	Lipêmico	4.446	3.848	86.50		
CQC (Alta)	Pool 1	44.58	39.20	87.90	97.2	14.4
	Pool 2	40.04	45.36	113.30		
	Pool 3	42.12	38.10	90.50		

Tabela 20. Resultados da recuperação média para cloranfenicol.

Analito: cloranfenicol						
Tipo de Conc.	Tipo Plasma	Amostras não processadas (ng/mL)	Amostras Processadas (ng/mL)	Recuperação Individual (%)	Média da Recuperação (%)	CV (%)
CQA (Baixa)	Pool 1	0.1416	0.1424	100.6	102.2	2.1
	Pool 2	0.1382	0.1446	104.6		
	Pool 3	0.1438	0.146	101.5		
CQB (Média)	Pool 1	3.934	3.8	96.6	94.9	1.3
	Pool 2	4.092	3.91	95.6		
	Pool 3	4.112	3.876	94.3		
	Hemolizado	4.33	4.108	94.9		
	Lipêmico	4.348	4.056	93.3		
CQC (Alta)	Pool 1	41.68	39.54	94.9	95.8	2.2
	Pool 2	0.1416	0.1424	100.6		
	Pool 3	0.1382	0.1446	104.6		

5.5 Estabilidade

5.5.1 Estabilidade pós-processamento

Os resultados obtidos no teste de pós-processamento indicam que amostras processadas podem, permanecer por pelo menos 24 horas no auto-injetor. Durante esse período as amostras não apresentou nenhuma degradação, conforme demonstrado na Tabela 21.

Tabela 21. Estabilidade pós-processamento.

Pós-processamento	betametasona (ng/mL)					
	Valores de Referência	Valores após 24 horas	Valores de Referência	Valores após 24 horas	Valores de Referência	Valores após 24 horas
	CQA = 0,15ng/mL		CQB = 4,0ng/mL		CQC = 40,0ng/mL	
Média	0.136	0.141	3.5	3.7	40	40
Variação (%)		3.6		5.7		0.6

5.5.2 Estabilidade com ciclo de congelamento e degelo.

Os resultados obtidos no teste de ciclo de congelamento e degelo indicam que amostras processadas podem, apresentar 3 ciclos de congelamento e degelo, quando estocados em temperatura de -20°C e transferidos à temperatura ambiente. Durante esse período as amostras não apresentaram nenhuma degradação, conforme a Tabela 22.

Tabela 22. Estabilidade de congelamento e degelo.

Ciclo de congelamento/degelo	betametasona (ng/mL)					
	Valores de Referência	Valores após 3 ciclos	Valores de Referência	Valores após 3 ciclos	Valores de Referência	Valores após 3 ciclos
	CQA = 0,15ng/mL		CQB = 4,0ng/mL		CQC = 40,0ng/mL	
Média	0.150	0.129	3.6	3.6	34	35
Variação (%)		-14.6		-1.0		3.1

5.5.3 Estabilidade de curta duração

Os resultados obtidos no teste de curta duração indicam que amostras processadas, após 8 horas na temperatura ambiente, não apresentaram degradação significativa, conforme a Tabela 23.

Tabela 23. Estabilidade de curta duração

	Teste Curta Duração		betametasona (ng/mL)			
	Valores de Referência	Valores após 8 horas	Valores de Referência	Valores após 8 horas	Valores de Referência	Valores após 8 horas
	CQA = 0,15ng/mL		CQB = 4,0ng/mL		CQC = 40,0ng/mL	
Média	0.143	0.145	3.9	3.6	35	34
Variação (%)		1.3		-7.1		-3.7

5.5.4 Estabilidade de longa duração

Os resultados obtidos no teste de longa duração indicam que betametasona em plasma humano podem ser armazenados em freezer a -20°C por pelo menos 40 dias, com nenhuma degradação significativa dos analitos após análise apresentando, portanto, estabilidade de longa duração. Conforme dados apresentados na Tabela 24 e 25.

Tabela 24. Estabilidade de longa duração (28 dias)

	Teste Longa Duração		betametasona (ng/mL)			
	Valores de Referência	Valores após 28 dias	Valores de Referência	Valores após 28 dias	Valores de Referência	Valores após 28 dias
	CQA = 0,15ng/mL		CQB = 4,0ng/mL		CQC = 40,0ng/mL	
Média	0.159	0.156	4.3	4.2	44	42
Variação (%)		-2.0		-2.6		-3.5

Tabela 25. Estabilidade de longa duração (40 dias)

	Teste Longa Duração		betametasona (ng/mL)			
	Valores de Referência	Valores após 40 dias	Valores de Referência	Valores após 40 dias	Valores de Referência	Valores após 40 dias
	CQA = 1,5ng/mL		CQB = 15ng/mL		CQC = 150ng/mL	
Média	1.59	1.37	16.3	14.4	147	138
Variação (%)		-14.2		-11.9		-6.5

5.5.5 Estabilidade da solução padrão

A concentração das soluções preparadas a fresco foi comparada com a concentração das soluções preparadas nos tempos de estocagem correspondentes de cada analito. O teste de estabilidade indicou que a betametasona não apresentou degradação após 22 dias quando estocados a + 4°C. Conforme os resultados apresentados nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26. Estabilidade da solução padrão para betametasona

Estabilidade Solução Padrão		betametasona (ng/mL)				
	Valores de Referência	Valores após 22 dias	Valores de Referência	Valores após 22 dias	Valores de Referência	Valores após 22 dias
	CQA = 0,15ng/mL		CQB = 4,0ng/mL		CQC = 40,0ng/mL	
Média	0.188	0.164	4.1	3.6	37	39
Variação (%)	-13.0		-13.5		3.4	

Tabela 27. Estabilidade da solução padrão para cloranfenicol

Estabilidade Solução Padrão		cloranfenicol (ng/mL)				
	Valores de Referência	Valores após 22 dias	Valores de Referência	Valores após 22 dias	Valores de Referência	Valores após 22 dias
	CQA = 0,15ng/mL		CQB = 4,0ng/mL		CQC = 40,0ng/mL	
Média	0.169	0.152	4.2	3.8	42	40
Variação (%)	-10.3		-8.6		-5.3	

5.5.6 Estabilidade da Solução de Trabalho

Os resultados obtidos no teste indicam que as soluções de trabalho podem permanecer por pelo menos 24 horas à temperatura ambiente, com nenhuma degradação significativa do analito conforme dados apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Estabilidade da solução de trabalho para betametasona.

Estabilidade Solução de Trabalho		betametasona (ng/mL)				
	Valores de Referência	Valores após 24 horas	Valores de Referência	Valores após 24 horas	Valores de Referência	Valores após 24 horas
	CQA = 0,15ng/mL		CQB = 4,0ng/mL		CQC = 40,0ng/mL	
Média	0.150	0.143	3.8	3.4	35	33
CV (%)	3.6	2.5	4.2	0.9	2.5	1.6
Variação	-4.5		-9.6		-6.7	

5.6 Supressão iônica

Para a metodologia aplicada no método o teste não apresentou supressão significativa na região onde os picos foram eluidos conforme demonstrados na Figura 25.

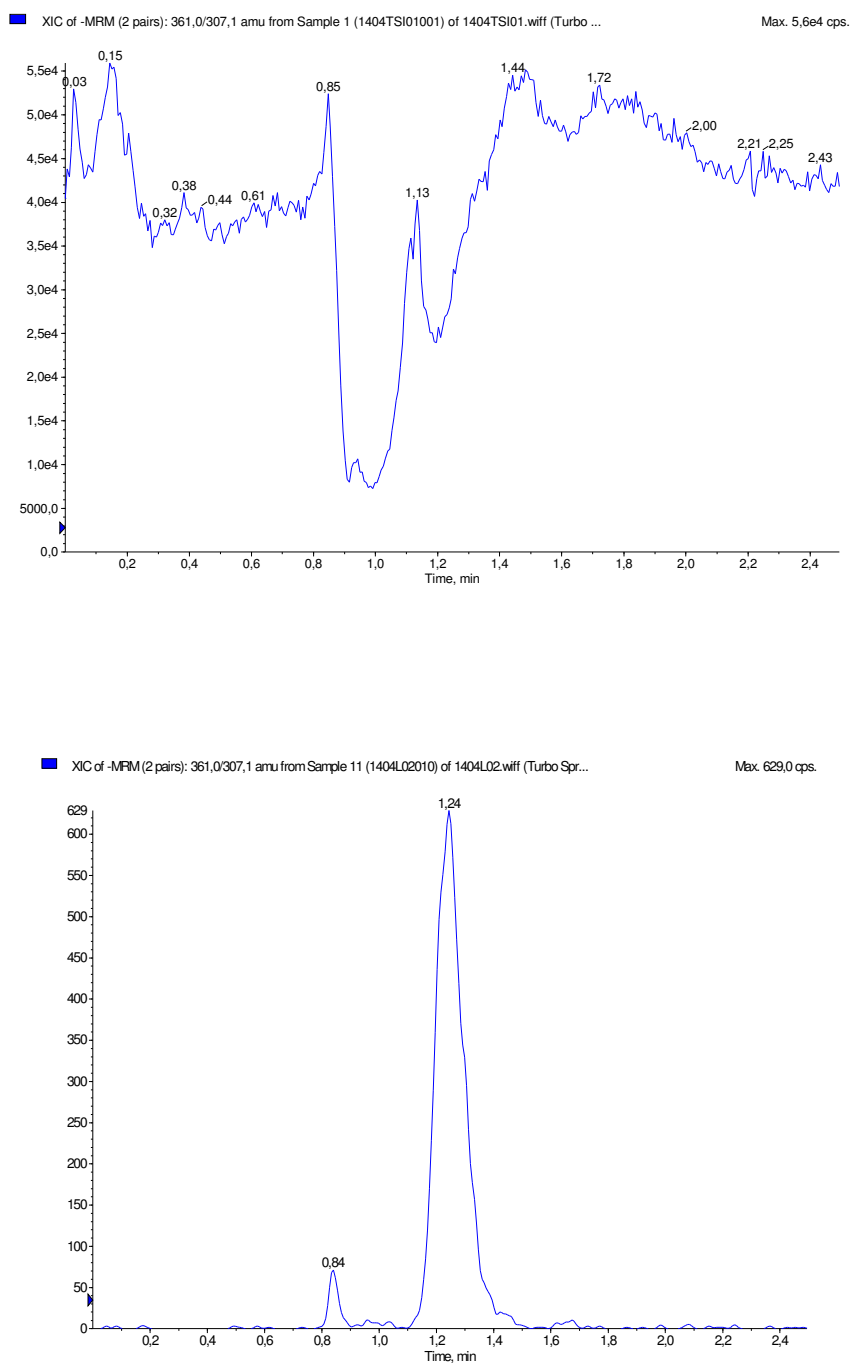


Figura 25. Supressão iônica comparada com a região de eluição do analito.

5.7 Análise Farmacocinética e estatística

A Figura 26 apresenta a curva média das concentrações plasmáticas de betametasona versus tempo após administração de cada uma das formulações. Podemos observar que os valores correspondentes de Cmax e Tmax foram equivalentes entre as formulações estudadas conforme demonstrado na Tabela 29.

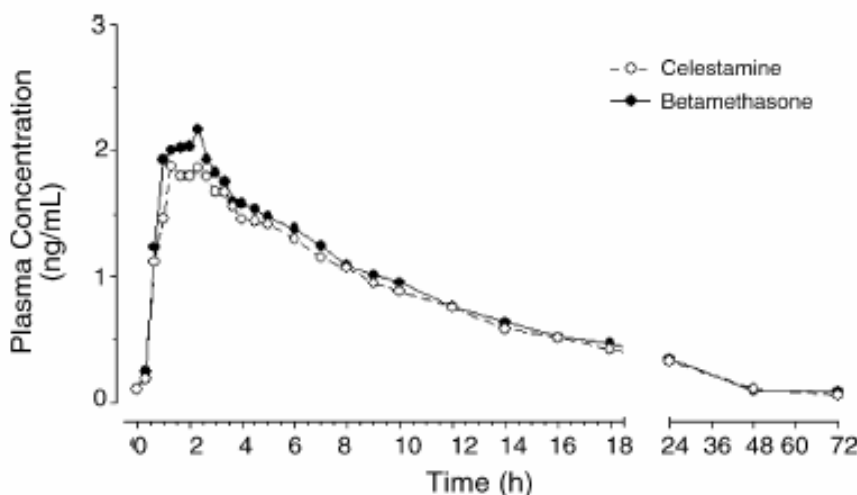


Figura 26. Perfil da concentração plasmática *versus* o tempo

Tabela 29. Média dos parâmetros farmacocinéticos para avaliação da bioequivalência.

Referência – Celestamine							
Variável	Unidade	N	Média	SD	Min	Max	CV%
AUCinf	(ng*hr)/mL	26	25.41	6.05	14.27	37.41	23.82
AUClast	(ng*hr)/mL	26	23.23	6.30	12.47	36.23	27.12
Clast	ng/mL	26	0.15	0.09	0.05	0.37	59.44
Cmax	ng/mL	26	2.33	0.48	1.63	3.58	20.55
Ke	1/hr	26	0.07	0.02	0.05	0.12	29.21
T1/2	hr	26	10.50	2.59	5.88	14.76	24.64
Tlast	hr	26	39.06	13.91	24.00	72.27	35.60
Tmax	hr	26	1.84	0.83	0.67	4.50	44.88
Teste - betametasona							
Variável	Unidade	N	Média	SD	Min	Max	CV%
AUCinf	(ng*hr)/mL	26	27.14	6.45	15.28	37.87	23.78
AUClast	(ng*hr)/mL	26	24.99	6.78	13.63	37.14	27.12
Clast	ng/mL	26	0.15	0.10	0.06	0.36	63.19
Cmax	ng/mL	26	2.49	0.74	1.55	4.70	29.86
Ke	1/hr	26	0.07	0.02	0.04	0.11	27.25
T1/2	hr	26	10.61	2.77	6.13	16.05	26.12
Tlast	hr	26	40.98	15.06	24.00	72.75	36.74
Tmax	hr	26	1.98	0.84	1.00	4.00	42.35

A Tabela 30 mostra os resultados da razão da média geométrica dos parâmetros farmacocinéticos para ASC_{0-72h} , ASC_{last} , ASC_{inf} e C_{max} .

Tabela 30. Parâmetros farmacocinéticos para avaliação da bioequivalência.

Parâmetro	Razão T/R	IC 90%
ASC_{0-72}	107,07%	102,15% – 112,23%
ASC_{last}	107,61%	101,62% – 113,95%
ASC_{0-inf}	106,93%	102,08% – 112,00%
$C_{máx}$	105,06%	96,56% – 114,31%

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento e validação de metodologias para quantificações de fármacos em matrizes biológicas é uma ferramenta de grande importância para estudos de bioequivalência e conseqüentemente o controle de qualidade dos medicamentos disponíveis. A validação de um método bioanalítico deve garantir que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Portanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade recuperação adequadas à análise (Brasil, 2003a).

Sendo assim a escolha da técnica de ionização para o desenvolvimento de um determinado método analítico é de grande importância e deve ser adequada ao tipo de fármaco a ser analisado, devido as suas características químicas. Logicamente, quando se considera a detecção através de espectrometria de massas, a eficiência de ionização está diretamente ligada na sensibilidade de um determinado método analítico, já que a detecção é proporcional à quantidade de íons que atingem o detector.

Introduzida em 2000 por Robb et al. a técnica de associação da CLAE à espectrometria de massas, a fotoionização à pressão atmosférica com assistência de uma substância dopante tem-se tornado objeto de crescente investigação, como pode ser verificado pelo surgimento de diferentes revisões sobre o assunto por Raffaelli e Saba, 2003 e Hanold et al., 2004.

Para a quantificação de betametasona o presente trabalho foi pioneiro com a utilização da técnica de fotoionização, o qual apresentou algumas vantagens às outras propostas encontradas na literatura devido sua simples extração das amostras, tempo de corrida analítica pequeno e alta sensibilidade com o Limite Inferior de Quantificação de 0,05ng/mL conforme demonstrado na Tabela 31.

Tabela 31. Parâmetros do presente trabalho e dos os métodos descritos na literatura

Item	(Pereira <i>et al.</i> , 2005)	(Petersen <i>et al.</i> , 1979)	(Houghton <i>et al.</i> , 1981)	(Houghton <i>et al.</i> , 1982)	(Fiori <i>et al.</i> , 1998)
Método Analítico	CLAE - EM/EM (APPI)	CLAE - UV	CGAE-EM	CLAE - EM (APCI)	CLAE - EM/EM (APCI)
Tempo de Retenção do Analito	1,2 minutos	6,5 minutos	5,5 minutos	13 minutos	5,3 minutos
Matriz	Plasma	Plasma, Sangue e Urina.	Urina.	Urina.	Leite.
Volume de plasma	500 µl	1000 µl	20mL	20mL	5mL
Extração	Extração líquido-líquido	Extração líquido-líquido	Extração Fase Sólida com derivatização	Extração Fase Sólida	Extração Fase Sólida
Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	De 0,05 a 50 ng/mL	De 10 a 300 ng/mL	-	-	De 5 a 100 ng/mL

Após administração oral de Maleato de dexclorfeniramine/betametasona 2.0mg/0,25mg, os valores betametasona observados para C_{max} e T_{max} foram similares aos encontrados no estudo GDN132-03 conforme citado no trabalho e equivalente entre as formulações.

A média geométrica da razão de betametasona/Celestamine e seus intervalos de confiança de 90% (CI) para C_{max} foi de 105.06% (96.56–114.31%), para ASC_{last} foi de 107.61% (101.62–113.95%), para ASC_{0-inf} foi de 106.93% (102.08–112.00%) e ASC_{0-72h} 107.07% (102.15–112.23%) o qual estavam incluído dentro do intervalo de 80-125% definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003c), estabelecendo assim a bioequivalência para taxa e extensão de absorção entre as duas formulações.

7 CONCLUSÃO

O trabalho desenvolvido foi pioneiro na utilização de CLAE por Espectrometria de Massas com fonte de Fotoionização para quantificação para betametasona, o qual apresentou algumas vantagens às outras literaturas encontradas devido a simples extração das amostras, menor tempo de corrida analítica (2.5min) e alta sensibilidade com o Limite Inferior de Quantificação de 0,05ng/mL.

Os resultados encontrados indicam que o método é preciso e exato (de acordo com a legislação vigente) o suficiente para determinação de betametasona na rotina analítica

Os resultados para as razões de Cmax e ASC estavam dentro do intervalo de IC90% (80-125%) estabelecidos pela ANVISA, demonstrando que a formulação Teste de Betametasona comprimidos é bioequivalente a formulação Referência Celestamine® comprimidos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antignac PJ, Le Bizec B, Monteau F, Poulain F, Andre F. Rapid Collision-induced dissociation of corticosteroids in electrospray tandem mass spectrometry and development of a screening method by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Commun. Mass Spectrom 2000,14:33-39.

Arancibia A. Calidad Biofarmacéutica. Estudios “in vitro” e “in vivo”.Acta Farm. Bonarense 1991; 10(2):123-133.

Ardrey RE. Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction. New York: Wiley, 2003

Banakar, U.V. Pharmaceutical dissolution testing. New York, Marcel Dekker, 1992;437.

Beaumont K, Fanestil DD. Characterization of rat brain aldosterone receptors reveals high affinity for corticosterone. Endocrinology. 1983;113:2043-51.

Bois FY, Tozer TN, Hauck WW, Chen M, Patnaik R, Williams RL. Bioequivalence: performance of several measures of extend of absorption. Pharm. Res. 1994; 11(5):715-722.

Brasil. Lei 9.787, 10 fev. 1999. Altera a Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003a.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 898, de 29 de Maio de 2003. Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativabioequivalência. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003b.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 2 de junho de 2003c.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 397 de 12 de Novembro de 2004. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Diário Oficial da União, Brasília, 6 de novembro de 2004.

Brauman JI. Some historical background on the double-well potential model. J. Mass Spec. 1995;30:1649-1651.

Bressole F, Bromet PM, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 1996; 689(1):3-10.

Cai Y, Kingery D, McConnell O, Bach II AC. Advantages of atmospheric pressure photoionization mass spectrometry in support of drug discovery. Rapid Commun Mass Spectrom 2005; 19:1717-24

Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: view point and discussion. J. chromatogr B: Biom. Appl. 1997; 689(1):175-180.

Chaoulhoff F. Regulation of 5-HT receptors by corticosteroids: where do we stand? *Fundam Clin Pharmacol.* 1995;9(3):219-33.

Conciglieri VO, Storpirtis S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. *Rev. Bras. Cienc. Farm* 2000; 36(1):13-21.

Cowen PJ. Cortisol, serotonin and depression: all stressed out? *Br J Psychiatry.* 2002;180:99-100.

De Laeter JR. Mass spectrometry in cosmochemistry. *Mass Spectrom* 1990; 9(4):453-497

Dighe SV. A review of the safety of generic drugs. *Transplant. Proc.* 1999; 31(3A):235-245.

Halasz I, Horvath CG. Micro Beads Coated with a Porous Thin Layer as Column Packing in Gas Chromatography. *Anal. Chem.* 1964; 36(7):1178-1186.

Hanold KA, Fischer SM, Cormia PH, Miller CE, Syage JA. Atmospheric Pressure Photoionization. 1. General Properties for LC/MS. *Anal. Chem.* 2004; 76:2842-51.

Ilha, J. O. Quantificação de fármacos em estudos de biodisponibilidade relativa por espectrometria de massas com a utilização da técnica de fotoionização [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Jardim ICSF, Collins CH, Guimarães LFL. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins CH, Braga GL, Bonato PS. Unicamp. São Paulo: Editora da Unicamp; 2006. p.273-398

Kauppila T. Atmospheric Pressure Photoionization - Mass Spectrometry [Academic Dissertation]. Helsinki (Finland); University of Helsinki; 2004a.

Kauppila TJ, Kotiaho T, Kostianen R, Bruins AP. Negative Ion-Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 2004b; 15:203-11.

Kennett GA, Dickinson SL, Curzon G. Central serotonergic responses and behavioral adaptation to repeated immobilization: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. Eur J Pharmacol. 1995;119:143-52.

Kirkland JJ. A High-Performance Ultraviolet Photometric Detector for Use with Efficient Liquid Chromatographic Columns. Anal. Chem. 1968; 40(2):391-396.

Lagana A, Fago G, Fasciani L, Marino A, Mosso M. Determination of diphenyl-ether herbicides and metabolites in natural waters using high-performance liquid chromatography with diode array tandem mass spectrometric detection. Analytica Chimica Acta 2000; 414(1-2):79-94.

McEwen BS, Davis PG, Parsons B, Pfaff DW. The brain as a target for steroid hormone action. Annu Rev Neurosci. 1992;2:65-112.

McQuade R, Young AH. Future therapeutic targets in mood disorders: the glucocorticoid receptor. *Br J Psychiatry*. 2000;177:390-5.

Moraes MCB, Lago CL. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânica e organometálicas. *Quim. Nova* 2003; 26(4):556-563.

Mottier P, Parisod V, Gremaud E, Guy PA, Stadler RH. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.A* 2003, 994:75-84.

Muller MB, Holsboer F, Keck ME. Genetic modification of corticosteroid receptor signaling: novel insights into pathophysiology and treatment strategies of human affective disorders. *Neuropeptides*. 2002;36(2-3):117-31.

Oliveira CF. Manual de boas práticas em biodisponibilidade e bioequivalência. 1 ed. Brasília: Dupligráfica Editora Ltda. 2002, v. 1, p. 8.

Pereira AS, Bicalho B, Lilla S, Nucci GD. Desafios da Química Analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. *Quim Nova* 2005; 28(Suplemento):S107-111.

Porta V, Yamamichi E, Storpirtis S. Avaliação biofarmacêutica *in vitro* de cápsulas de fluconazol. *Rev. Bras. Cienc. Farm* 2002; 28(3):333-343.

Raffaelli S, Saba A. Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 2003; 22:318-31.

Reu JM, De Kloet ER. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. J Steroid Biochem. 1986;24:269-72.

Robb DB, Blades MW. Factors Affecting Primary Ionization in Dopant-Assisted Atmospheric Pressure Photoionization (DA-APPI) for LC/MS. J Am Soc Mass Spectrom 2006; 17:130-138.

Robb D, Covey TR, Bruins AP. Atmospheric Pressure Photoionization: Ionization Method for Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Anal Chem 2000; 72(15):3653-9.

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

Storpirtis S. Fundamentos científicos e conceitos utilizados em farmacocinética, biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. São Paulo: s.c.p., 1994. 7p. [Simpósio: Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos, 1994].

Storpirtis S, Conciglieri VO. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. Rev. Bras. Cienc. Farm 1995; 31(2):63-70.

Storpirtis S, Rodrigues D. In vitro evaluation of dissolution properties and degradation products of omeprazole in enteric-coated pellets. *Drug Dev. Ind. Pharm* 1998; 24(11):1101-1107.

Storpirtis, S. Biofarmacotécnica: Fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos 1999. p78.

Sutano W, De Kloet ER. Species-specificity of corticosteroid receptors in hamster and rat brains. *Endocrinology*. 1987;121:1405-11.

Styczynski J, Wysocki M, Debski R, Balwierz W, Rokicka-Milewska R, Matysiak M, Balcerska A., Kowalczyk J., Wachowiak J., Sońta-Jakimczyk D., Chybicka A. Cross-resistance to five glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic and non-lymphoblastic leukemia samples tested by the MTT assay: preliminary report. *Acta Biochim* 2002; 49: 93-98.

Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JC. Hardcover. Practical HPLC Method Development. 2 edição. Wiley 1997.

Syage JA, Evans MD. Photoionization Mass spectrometry – A powerful new tool for drug discovery. *Spectrometry* 2001; 16(11):14-21.

Takino M, Daishima S, Nakahara T. Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.A* 2003, 1011:67-75.

World Health Organization. Marketing authorization of pharmaceutical products with special reference to multisource (generic) products: a manual for a drug regulatory authority. Geneva: [s.n.], 1999.

Watson, J. T. Introduction to Mass Spectrometry. Philadelphia. Lippincott – Raven, 1997, 496p.

Wolkowitz OM, Reus VI. Treatment of depression with antigluocorticoid drugs. Psychosom Med. 1999;61:698-711.

Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC. Tratado de medicina interna. 19.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992. v.2.

Yugue RT, Ferraz HG, Yugue SC, Fernandes E, Storpirtis S. Perfil de dissolução do cloridrato de diltiazem a partir de formas farmacêuticas sólidas de ação prolongada comercializadas no Brasil. Rev. Bras. Cienc. Farm 1996; 32(2):77-80.

9 ANEXOS

ANEXO 1 – TERMO DE RECRUTAMENTO

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

Responsável: Dr Gilberto De Nucci

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário de um processo de recrutamento para um projeto de pesquisa clínica sob responsabilidade do Prof Dr. Gilberto De Nucci da Unidade Clínica Phillipe Pinel. O abaixo-assinado está ciente que:

I - A sua participação neste processo de recrutamento tem como objetivo avaliar suas condições de saúde para possível participação em um projeto de pesquisa clínica.

II - Será submetido aos seguintes exames laboratoriais hemograma completo; bioquímica sanguínea (glicose no sangue, proteínas totais, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos). Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV 1 e HIV2) no sangue e protoparasitológico (nas fezes) serão feitos somente no pré estudo. Será submetido também a exame do coração (eletrocardiograma). As mulheres também realizarão um teste para gravidez (β -HCG).

III - Obteve todas as informações necessárias para decidir conscientemente sobre a participação no referido processo.

IV - Tem a liberdade de desistir ou interromper a participação no processo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e que esta desistência não implicará em qualquer penalidade.

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

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

VII – Caso seja selecionado para um ensaio de pesquisa clínica, poderá entrar em contato com 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.

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

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

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

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura da enfermagem

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de Biodisponibilidade Comparativa de uma Formulação de Maleato de Dexclorfeniramina + Betametasona (2mg/0.25mg) - formulação teste da EMS Indústria Farmacêutica Ltda. versus uma Formulação Maleato de Dexclorfeniramina + Betametasona (2mg/0.25mg) do Produto de Referência Schering Plough (Celestamine®) em Voluntários Sadios de ambos os Sexos

GDN 14/04-UP

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 às 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 Clínica Phillipe Pinel. O abaixo-assinado está ciente que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar se a formulação de Maleato de Dexclorfeniramina + Betametasona (2mg/0.25mg) produzida pela EMS Indústria Farmacêutica Ltda. – formulação teste atinge níveis no sangue equivalentes ao Celestamine® (Maleato de Dexclorfeniramina + Beatmetasona - 2mg/0.25mL) da Schering Plough - *Formulação Referência*. Você receberá 1 comprimido de cada uma das formulações acima, cada uma em uma ocasião diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá um sorteio.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

Antes de sua participação no estudo e após a sua participação você será convidado a ir 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 sanguínea (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 (β -HCG). 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 36 horas cada período, com um intervalo mínimo de 14 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 1 comprimido de Maleato de Dexclorfeniramina + Betametasona (2mg/0.25mg), acompanhado de 200mL de água sem gás; c) serão coletadas 27 amostras de sangue de 3,5 mL, cada, através de agulha introduzida em veia superficial para a dosagem do medicamento e mais uma amostra de 25 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 405 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 a sua participação no ensaio clínico: a) comparecer às internações na data e horários informados; b) permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos 8 horas) em cada internação; c) tomar toda a medicação prevista; d) ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; e) retornar à Unidade 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 da associação de Maleato de Dexclorfeniramina e Betametasona de maneira continuada pode causar efeitos colaterais como distúrbios gastrintestinais, dermatológicos, neurológicos, endócrinos, oftálmicos, metabólicos, psiquiátricos, enjôo, boca seca, e visão borrada. Entretanto, o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração de dose única de Maleato de Dexclorfeniramina + Betametasona 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 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\$ 500,00), 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 vocês terão como despesa apenas os gastos de deslocamento da residência ou trabalho até a Unidade Clínica para internação ou para a realização dos exames e consultas, bem como coletas de amostras após a alta. O transporte de Campinas até a Unidade de Internação em Itapira será providenciado pela equipe do Estudo. 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 por parte da nossa equipe.

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

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

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A 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 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 Pesquisa Galeno (Fone 23427133) 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 o 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 qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

São Paulo, ____/____/____

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

CONTROLE INTERNO

Nº do Estudo: ____/____

Nº do Voluntário: _____

TELEFONES PARA CONTATO

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

ANEXO 3 – FOLHA DE EVENTO ADVERSO

FOLHA DE EVENTO ADVERSO

Nº de Ordem do Evento _____

Data Preenchimento _____

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

Detalhes Evento			
Início do Evento Adverso	Data	Período _____ (de tratamento)	☐ Antes da administração do Produto sob Investigação * ☐ Após a administração, durante a internação ☐ Após ter recebido alta da internação
	Hora		
Queixa / Diagnóstico			
Última Dose	Data	Hora	Dose administrada (em mg)

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

Classificações			
Expectativa	☐ Esperado	☐ Não Esperado →	Quando a natureza, intensidade ou frequência não é consistente com a informação disponível na literatura
Intensidade	☐ Fraco	☐ Moderado	☐ Intenso
Relação c/ Terapia	☐ Não Relacionado	☐ Possível	☐ Provável ☐ Não Classificável
Seriidade	☐ Não Sério	☐ Sério	→ Nº Identificação do Ev. Adv. Sério:

Conduta	
Conduta Imediata (escolha 1 ou mais opções que se apliquem)	Dose: ☐ Reduzida ☐ Aumentada ☐ Interrompida ☐ Encerrada ☐ Não Aplicável
	☐ Tratamento Farmacológico * ☐ Outra Terapia ☐ Hospitalização ☐ Observação (ou nenhuma ação imediata) ☐ Outros ☐ Não Aplicável
	☐ Desnecessário ☐ Solicitados Exames:
Exames Complem.	* Os Tratamentos Farmacológicos são descritos na Folha de Terapias Adicionais constante no CRF.
Próximo Acomp.	☐ Através dos retornos já programados ☐ Solicitado retorno adicional em:
Desligamento	☐ O médico retirou o Voluntário do Estudo em função do Evento ☐ O Voluntário resolveu interromper sua participação no estudo em função do Evento
Outras Informações e/ou Evolução	

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

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

Médico Responsável pelas informações Assinatura Data

ANEXO 4 – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



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, 16/03/04.
(Grupo II)

PARECER PROJETO: N° 101/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE UMA FORMULAÇÃO DE MALEATO DE DEXCLORFENIRAMIDA + BETAMATASONA (2MG/0.25MG) – FORMULAÇÃO TESTE DA EMS INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA. VERSUS UMA FORMULAÇÃO MALEATO DE DEXCLORFENIRAMINA+BETAMATASONA (2MG/0.25MG) DO PRODUTO DE REFERÊNCIA SCHERING-PLOUGH (CELESTAMINE®) EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto De Nucci

INSTITUIÇÃO: Unidade Clínica Phillipe Pinel/Itapira

APRESENTAÇÃO AO CEP: 03/03/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 16/09/04 e 17/03/05

II - OBJETIVOS

Avaliar comparativamente a biodisponibilidade de dois produtos contendo maleato de dexclorfeniramina+betamatsona a fim de determinar se são bioequivalentes.

III - SUMÁRIO

É um estudo aberto, randomizado, cruzado, com dois tratamentos, dois períodos, nos quais 26 voluntários, de ambos os sexos, recebem, em cada período distinto, uma das formulações.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um projeto de bioequivalência. O protocolo é adequado, bem como o recrutamento dos voluntários. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é claro e de fácil entendimento.

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 III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 16 de março de 2004.


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

ANEXO 5 – REFEIÇÕES

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

ANEXO 6 – LISTA DE RANDOMIZAÇÃO

Voluntários			Sequência da Administração	
Número	Sexo	Inicial	Período I	Período II
1	M	AS260979M	T	R
2	M	BP190867M	R	T
3	M	CP220773M	R	T
4	M	DS141182M	T	R
5	M	DS291271M	R	T
6	M	ES270880M	T	R
7	M	FP300481M	T	R
8	M	GF141179M	R	T
9	M	IA060974M	T	R
10	M	JS031177M	R	T
11	M	MT310165M	R	T
12	M	OL171174M	T	R
13	M	RA291170M	R	T
14	F	AC071179F	T	R
15	F	CS280281F	R	T
16	F	FA300874F	R	T
17	F	HR010560F	R	T
18	F	JC030478F	T	R
19	F	JM151080F	R	T
20	F	MV250172F	T	R
21	F	MC190663F	T	R
22	F	RL080963F	R	T
23	F	RC150377F	T	R
24	F	RR220975F	T	R
25	F	SS200959F	R	T
26	F	TC141178F	T	R

T – Formulação Teste - Maleato de Dexclorfeniramina + Betametasona (2mg/0.25mg) – EMS

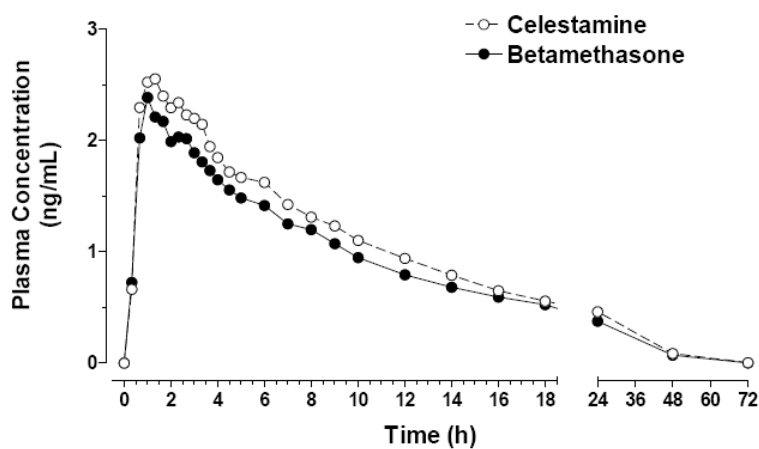
R – Formulação de Referência - Celestamine[®] - Schering Plough

ANEXO 7 – ESTUDO GDN132-03

Maleato de Dexclorfeniramina e Betametasona (2 e 0,25mg/mL)
(Formulação Teste da Schering Plough)

versus

Maleato de Dexclorfeniramina e de Betametasona (0,4 e 0,05mg/mL) (Celestamine Xarope® da Schering Plough)



	Betamethasone			
	Celestamine®		Dexchlorpheniramine / Betamethasone	
	Mean	SD	Mean	SD
AUC _{last} ([ng*h]/mL)	32.33	6.16	26.64	4.76
AUC _{inf} ([ng * h]/mL)	34.75	5.54	29.12	4.91
AUC _(0-72h) ([ng * h]/mL)	34.78	5.91	30.37	5.25
C _{max} (ng/mL)	2.91	0.62	2.64	0.48
T _{1/2} (h)	12.35	3.24	10.59	2.88
	Median	(Range)	Median	(Range)
T _{max} (h) – median	1.17	0.67 3.67	1.33	0.67 3.00