

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO BIOFARMACÊUTICA**

CLÁUDIA DE SOUZA PEDROSA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS
GÊNICOS EM VOLUNTÁRIOS DE UM ESTUDO DE
BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE DUAS FORMULAÇÕES
DE VARFARINA**

Belo Horizonte, MG

2012

CLÁUDIA DE SOUZA PEDROSA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS
GÊNICOS EM VOLUNTÁRIOS DE UM ESTUDO DE
BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE DUAS FORMULAÇÕES
DE VARFARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Biofarmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Inovação Biofarmacêutica.

Área de concentração em Formulações Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati

Belo Horizonte, MG

2012

**“AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GÊNICOS
EM VOLUNTÁRIOS DE UM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA
ENTRE DUAS FORMULAÇÕES DE VARFARINA”**

CLÁUDIA DE SOUZA PEDROSA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 10 de fevereiro de 2012, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:



PROF. DR. FRÉDÉRIC JEAN GEORGES FREZARD
ICB/UFMG



PROFA. DRA. NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO
UFJF



PROF. DR. CARLOS ALBERTO TAGLIATI
FAFAR/UFMG, ORIENTADOR

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2012.

Dedico esse trabalho a minha querida família,
pai, mãe, irmãos e aos meus inúmeros familiares, tios e primos,
que sempre estiveram ao meu lado apoiando todas as minhas escolhas.
Também aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado
festejando minhas conquistas e alegrando meus dias.

E à minha querida vovó Gelita,
que foi um exemplo de vida para mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais e irmãos que sempre estiveram ao meu lado, apoiaram minhas decisões com muito carinho e compreensão. Um amor incondicional.

Aos professores que souberam transmitir seus conhecimentos e que de alguma forma marcaram a minha vida acadêmica. Seria injusto não citar as excelentes professoras Lígia e Dora, da Faculdade de Farmácia. Estiveram presentes nos momentos mais difíceis, naqueles momentos que precisamos decidir para onde ir e o que fazer. Com toda a sabedoria me ajudaram a chegar até aqui.

À equipe do Departamento de Bioequivalência do Hermes Pardini, que depois de tanto dedicarmos em prol da excelência, conseguimos construir uma história de sucesso que marcou a minha vida para sempre. Nelci, sempre dedicada e preocupada em deixar o material todo organizado. Lílian Lee, um capricho para registrar as listas nos *databooks* e sempre disposta a ajudar. Letícia, sempre pontual e rápida na pipeta. Magda, com toda sua experiência e perfeição estava lá na frente do equipamento ajudando a descobrir qual era o problema da vez. Flávia, organizada, dedicada e questionadora, foi com jeitinho que conseguiu seu espaço tão merecido. Mariana, Leandro e Maria, foi muito bom trabalhar com vocês e poder dividir toda essa história em tão pouco tempo.

À Irilda, por causa da sua dedicação e empenho que esse trabalho chegou até aqui. Quem disse que seria fácil, não é mesmo? Obrigada por acreditar que era possível realizar um trabalho com qualidade, sempre superando expectativas.

Ao querido amigo, Thales. Iniciamos um sonho juntos nas escadas da Faculdade de Farmácia, construímos uma história e certamente ainda vamos viver bons momentos nesse “mundinho” da Bioequivalência.

Aos grandes pesquisadores do Departamento de Genética Humana do Hermes Pardini, vocês foram muito importantes para minha compreensão dos fundamentos das técnicas de determinação dos polimorfismos. Agradeço em especial às queridas Michele e Penha, vocês que estavam à frente das análises, ao experiente Frederico, que na reta final foi tão prestativo, e à querida Vanessinha que com toda a sua simplicidade e grande inteligência acompanhou todas as determinações dos polimorfismos e mostrou o melhor caminho.

À equipe da Synchrophar, que conduziu com excelência toda a etapa clínica do estudo, especialmente ao querido Sandro Evandir, uma pessoa que admiro por acompanhar todos os detalhes dos estudos com seriedade e uma calma invejável.

À querida amiga Paula Chelini, que esteve ao meu lado durante esse ano cheio de incertezas. Ajudou-me nas avaliações estatísticas e sempre estava disponível para tirar as minhas dúvidas.

Aos amigos da Farmacopéia Brasileira e CEDAFAR, Fernando, Paulinha, Geovani, Naialy, Tiago Assis, Carlos Eduardo, Luciano, Raíssa, Míriam, Sônia, Nilton, Eld, Léo, Edna, Márcia e Lúcia. Tenho certeza que o pouco tempo que estive com vocês aprendi a ser uma pessoa melhor. As boas risadas me fizeram acreditar que podemos viver uma vida mais leve sem desconstruir nossos objetivos. Todos os momentos estão guardados na minha memória com muito carinho.

Ao professor Pianetti, por confiar em mim e acreditar no meu trabalho. Foi a partir dessa oportunidade que percebi que é possível recomeçar, e que o recomeço é muito engrandecedor. Obrigada.

Às minhas queridas primas e tias que sempre me escutavam dizer que precisava estudar e terminar minha dissertação. De tão repetitivo virou gozação e agora ficou marcada a noite especial para autógrafos. Amo todas vocês!

Ao meu orientador, Carlos Alberto Tagliati, que aceitou acompanhar mais essa etapa da minha formação, apoiou minhas decisões e contribuiu na elaboração dessa dissertação.

E agradeço ao meu Deus pai e meu anjinho da guarda que sempre estão ao meu lado me protegendo, iluminando e dando força para ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada por nunca me deixar desistir e sempre colocar desafios no meu caminho.

“O futuro mais brilhante é baseado num passado intensamente vivido. Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as decepções do passado. A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma eternidade.”

Clarice Lispector

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E NOTAÇÃO	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Justificativa.....	3
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivo Geral	4
1.2.2 Objetivo Específico	4
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 Descrição do fármaco em estudo.....	6
2.2 Boas Práticas Clínicas	11
2.3 Técnicas Analíticas Aplicadas à Metodologia Bioanalítica	13
2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	13
2.3.2 Espectrometria de Massas	16
2.4 Técnicas para Determinação de polimorfismos.....	19
2.4.1 Técnica de Reação em Cadeia por Polimerase.....	20
2.5 Conceitos dos Parâmetros de Desempenho Analítico	21
2.5.1 Seletividade e Especificidade	22
2.5.2 Sensibilidade.....	22
2.5.3 Exatidão e precisão	23

2.5.4	Linearidade	24
2.5.5	Limite Inferior de Quantificação	26
2.5.6	Limite Superior de Quantificação.....	28
2.5.7	Limite de Detecção	30
2.5.8	Robustez	33
2.5.9	Recuperação.....	34
2.6	Estudos de Estabilidade de Métodos Bioanalíticos	35
2.6.1	Estabilidade após Ciclos de Congelamento e Descongelamento	35
2.6.2	Estabilidade Pós-Processamento	36
2.6.3	Estabilidade de Curta Duração	36
2.6.4	Estabilidade de Longa Duração	37
2.6.5	Estabilidade das Soluções Padrão	37
2.7	Aspectos Gerais Sobre Modelos de Regressão.....	38
2.7.1	Premissas do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO)...	38
2.7.2	Estimação dos Parâmetros do Modelo de Regressão Ponderado	41
2.7.3	Teste de Homocedasticidade	44
2.7.4	Escolha do Fator de Ponderação.....	45
2.7.5	Teste da Significância da Regressão	46
2.7.6	Intervalo de Confiança para a Resposta Média	48
2.8	Avaliação da Bioequivalência	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1	Materiais	54
3.1.1	Substâncias Químicas de Referência.....	54
3.1.2	Produtos farmacêuticos comerciais	54
3.1.3	Solventes e Reagentes	54

3.1.4	Equipamentos e Acessórios	55
3.2	Métodos	56
3.2.1	População estudada, posologia e forma de administração	56
3.2.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas	57
3.2.2.1	Preparo da fase móvel e solução de lavagem	58
3.2.2.2	Preparo da solução mãe e soluções de trabalho de varfarina.....	58
3.2.2.3	Preparo da SQR e soluções de trabalho de <i>p</i> -cloro-varfarina.....	60
3.2.2.4	Preparo em matriz biológica dos padrões da curva de calibração e controles de qualidade	62
3.2.3	Método de extração de amostras em matriz biológica	64
3.2.4	Validação do Método Bioanalítico	65
3.2.4.1	Efeito de Matriz	66
3.2.4.2	Especificidade	66
3.2.4.3	Recuperação	67
3.2.4.4	Linearidade	68
3.2.4.5	Precisão	69
3.2.4.6	Exatidão	69
3.2.5	Estudo de Estabilidade	69
3.2.5.1	Estabilidade Após Ciclos de Congelamento e Descongelo.....	70
3.2.5.2	Estabilidade Pós-Processamento.....	70
3.2.5.3	Estabilidade de Curta Duração.....	70
3.2.5.4	Estabilidade de Longa Duração	71
3.2.5.5	Estabilidade das Soluções-Padrão	71
3.2.6	Genotipagem.....	72

3.2.6.1	Extração de DNA	72
3.2.6.2	Genotipagem dos Polimorfismos *1, *2 e *3 do Gene CYP2C9	73
3.2.6.3	Genotipagem dos Polimorfismos 1639GG e 1639GA do Gene VKORC1	75
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1	Doseamento de Varfarina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas	78
4.2	Método Bioanalítico	79
4.2.1	Seletividade e Especificidade	79
4.2.2	Recuperação.....	85
4.2.3	Método dos Mínimos Quadrados Ponderado	86
4.2.3.1	Ajuste de Modelos de Regressão	87
4.2.4	Precisão e Exatidão em Listas de Validação	93
4.2.5	Limite de Detecção	96
4.3	Estudo de Estabilidade em Matriz Biológica e em Solução.....	98
4.3.1	Estabilidade após Ciclos de Congelamento/Descongelamento	98
4.3.2	Estabilidade Pós-Processamento	99
4.3.3	Estabilidade Curta Duração	100
4.3.4	Estabilidade Longa Duração.....	101
4.3.5	Estabilidade em Solução Mãe	102
4.3.6	Estabilidade em Solução de Trabalho	104
4.4	Análise descritiva das medidas farmacocinéticas.....	105
4.4.1	Análise Descritiva de Concentração Máxima	111
4.4.2	Análise Descritiva de Área Sob a Curva	113
4.4.3	Análise dos Efeitos Aleatórios e dos Efeitos Fixos.....	117

4.4.4	Avaliação da Bioequivalência Média	119
4.5	Polimorfismos gênicos obtidos para os voluntários	119
4.6	Avaliação da Bioequivalência Considerando os Polimorfismos dos Voluntários	122
4.7	Avaliação da Relação Normalizada Internacional dos Voluntários Durante o Estudo	124
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Fórmula estrutural da varfarina.....	7
Figura 2.2 Ciclo da vitamina K. Inibição da ação das redutases pela varfarina (barras), inibindo assim a síntese de vitamina K1 e vitamina KH ₂ . Fonte: KLACK e CARVALHO, 2006.....	9
Figura 2.3 Esquema de um analisador tipo <i>Tandem</i> , Q ₁ : primeiro quadrupolo, Q ₃ : terceiro quadrupolo.....	17
Figura 2.4 Representação de analisador quadrupolo associado com analisador de massas <i>Time-of-flight</i> (<i>tempo de voo</i>). Fonte: LINDON, J.C. <i>et al.</i> , 2000.....	18
Figura 2.5 Representação esquemática de fonte de ionização – <i>Eletrospray</i> Fonte: LINDON, J.C. <i>et al.</i> , 2000.....	18
Figura 2.6 Representação do perfil farmacocinético após administração oral, dose única; C _{max} : concentração máxima, T _{max} : tempo máximo e ASC: área sob a curva.	27
Figura 2.7 Trecho inicial apresentando linearidade (correspondendo à reta cheia) e prolongamento da reta indicando perda de linearidade (reta tracejada).....	29
Figura 2.8 Esquema para determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) considerando β_0 negativo, com valores em x, concentração do analito, e em y, resposta (MEIER, P. C., 2000).	32
Figura 2.9 Diagrama genérico para esquematizar a análise da regressão linear	43
Figura 3.10 Representação dos resultados para os diferentes alelos do gene CYP2C9 no gel de agarose, 1) CYP2C9*1*1, 2) CYP2C9*1*2, 3) CYP2C9*1*3, 4) CYP2C9*2*2, 5) CYP2C9*3*3 e 6) CYP2C9*2*3.	74
Figura 3.11 Reação da PCR-TR e liberação do grupo fluoróforo.....	76

Figura 3.12 Resultados gráficos dos possíveis polimorfismos do gene VKORC1 por PCR em tempo real, a) 1639AA, b) 1639GG e c) 1639GA.	77
Figura 4.13: Estruturas químicas do analito, (a) varfarina, e do padrão interno, (b) <i>p</i> -cloro-varfarina.	79
Figura 4.14 Padrão de fragmentação de varfarina e estrutura sugerida do fragmento principal.....	80
Figura 4.15 Padrão de fragmentação de <i>p</i> -cloro-varfarina e estrutura sugerida do fragmento principal.....	80
Figura 4.16 Cromatogramas obtidos por CLAE-EM/EM para padrão interno, (a) <i>p</i> -cloro-varfarina 342,9 > 162,8; e analito, (b) varfarina 309,27 > 163,0.....	81
Figura 4.17 Cromatogramas obtidos por CLAE-EM/EM para amostras brancas de bolsas de plasma normal, (“a”, “b”, “c” e “d”), amostras brancas de bolsa de plasma lipêmico (e) e bolsa de plasma hemolisado (f).....	82
Figura 4.18 Modelo do Teste de Interferência Iônica	83
Figura 4.19 Cromatogramas do Teste de Interferência Iônica com sobreposição de cromatogramas de LIQ e (a) branco de pool de plasma normal (b) branco de plasma lipêmico e (c) branco de plasma hemolisado, todos analisados sob infusão de solução de varfarina (309,2 > 163) e <i>p</i> -cloro-varfarina (342,9 > 162,8) ambas na concentração de 1 µg/mL.....	84
Figura 4.20 Dispersão de resíduos padronizados obtida no modelo não padronizado... ..	88
Figura 4.21 Dispersão dos erros relativos percentuais <i>versus</i> concentração para os dados de varfarina	89
Figura 4.22 Dispersão dos resíduos padronizados <i>versus</i> concentração de varfarina em ng/mL, <i>x</i> , para modelos de regressão linear ponderados	90
Figura 4.23 Gráfico de probabilidade normal e resultados do teste de normalidade de AD dos resíduos para o modelo de regressão linear ponderado pelo fator $1/x^2$	91

Figura 4.24: Curva de calibração de varfarina por CLAE-EM/EM e obtida pelo programa *MassLynx*, na faixa de 5,0 a 1000,0 ng/mL..... 94

Figura 4.25 Curva de concentração plasmática dos medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®), para cada um dos 31 indivíduos..... 106

Figura 4.26 Curva de concentração plasmática dos medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®), com concentrações médias dos voluntários 111

Figura 4.27 C_{max} por voluntários para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®) 112

Figura 4.28 *Boxplots* de C_{max} para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®), nas escalas original e logarítmica 112

Figura 4.29 Gráficos de probabilidade normal para C_{max} para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®), nas escalas original e logarítmica, respectivamente. 113

Figura 4.30 ASC_t por voluntários para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®) 114

Figura 4.31 *Boxplots* de ASC_t para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®), nas escalas original e logarítmica 114

Figura 4.32 Gráficos de probabilidade normal para ASC_t para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®), nas escalas original e logarítmica..... 115

Figura 4.33 Dispersão da razão de ASC_t por ASC_∞, para os medicamentos referência e teste, dos voluntários participantes do estudo 116

Figura 4.34 *Boxplots* da razão de ASC_t por ASC_∞, na escala normal, para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®) 117

- Figura 4.35 Intervalos de bioequivalência para C_{max} e ASC na escala logarítmica para todos os dados, para voluntários com polimorfismo *1*1 do CYP2C9 e com alelo G do VKORC1 123
- Figura 4.36 *Boxplots* dos valores de RNI para os diferentes tempos de coleta nas duas fases do estudo e para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®) 126
- Figura 4.37 Valores de RNI em função dos diferentes tempos de coleta para as fases 1 (linhas cheias) e 2 (linhas tracejadas) e para os grupos de aleatorização, TR e RT. 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Análise de Variância para Testar a Significância da Regressão.....	47
Tabela 3.2 Esquema de aleatorização para a administração dos medicamentos	57
Tabela 3.3 Condições analíticas determinadas para o método cromatográfico.....	57
Tabela 3.4 Condições analíticas definidas no espectrômetro de massas.....	58
Tabela 3.5 Características da SQR de varfarina para o preparo da solução mãe	59
Tabela 3.6 Soluções mãe de VAR preparadas na validação do método bioanalítico.....	59
Tabela 3.7 Soluções de trabalho para obtenção de curva de calibração para a lista 09VAL0039V01LVA01	60
Tabela 3.8 Soluções de trabalho para obtenção de controles de qualidade das listas de validação.....	60
Tabela 3.9 Características da SQR de <i>p</i> -cloro-varfarina para o preparo da solução mãe	61
Tabela 3.10 Soluções mãe de <i>p</i> -VAR preparadas na validação do método bioanalítico	61
Tabela 3.11 Soluções de trabalho para obtenção da solução de padrão interno.....	61
Tabela 3.12 Preparo de pontos da curva de calibração e controles de qualidade em plasma humano utilizando as soluções de trabalho	63
Tabela 3.13 Condições determinadas para o procedimento de extração.....	65
Tabela 3.14 Preparação de amostras de curva de calibração e controles de qualidade a serem analisadas em listas de estabilidade em solução	72
Tabela 4.15 Determinação da recuperação real do procedimento de extração líquido- líquido das amostras de plasma para varfarina e <i>p</i> -cloro-varfarina.....	85
Tabela 4.16 Determinação da recuperação absoluta do procedimento de extração líquido-líquido das amostras de plasma para varfarina e <i>p</i> -cloro-varfarina ..	86

Tabela 4.17 Variável resposta da razão entre área de VAR pela área de *p*-VAR para determinação do modelo de regressão..... 87

Tabela 4.18 Resultados do ajuste dos modelos de regressão linear ponderado para os dados da Tabela 4.17 89

Tabela 4.19 Concentrações de varfarina para as amostras da lista CPL, em ng/mL, obtidas a partir do modelo de regressão com fator de ponderação $1/x^2$ 92

Tabela 4.20 Concentrações calculadas para as alíquotas das curvas de calibração nas Listas de Validação..... 93

Tabela 4.21 Concentrações calculadas para as alíquotas dos três níveis de controles de qualidade em Lista de Validação do método bioanalítico de varfarina..... 94

Tabela 4.22 Determinação de concentração, precisão e exatidão em Listas de Validação do método bioanalítico de varfarina 95

Tabela 4.23 Determinação de precisão e exatidão das concentrações do LIQ e CQD em Listas de Validação do método bioanalítico de varfarina..... 96

Tabela 4.24 Estimativas dos parâmetros dos modelos de regressão linear ponderado .. 97

Tabela 4.25 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento..... 99

Tabela 4.26 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade após período de pós-processamento de 47 horas e 21 minutos. 100

Tabela 4.27 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de curta duração, com período de 20 horas e 17 minutos..... 101

Tabela 4.28 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de longa duração, com período de 128 dias e 11 horas. 102

Tabela 4.29 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de solução mãe para varfarina preparada em metanol, com período de 128 dias..... 103

Tabela 4.30 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de solução mãe de <i>p</i> -cloro-varfarina preparada em metanol, com período de 44 dias.....	103
Tabela 4.31 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade das soluções de trabalho de varfarina por período de 22 horas e 5 minutos.	104
Tabela 4.32 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade das soluções de trabalho de <i>p</i> -cloro-varfarina por período de 18 horas e 55 minutos.	105
Tabela 4.33 Estatística descritiva das medidas farmacocinéticas dos medicamentos referência e teste	110
Tabela 4.34 Medidas farmacocinéticas das médias das concentrações plasmáticas dos medicamentos referência e teste	111
Tabela 4.35 ANOVA para C _{max} na escala logarítmica.....	117
Tabela 4.36 ANOVA para ASC _t na escala logarítmica.....	118
Tabela 4.37 Intervalo de confiança paramétrico para C _{max} e ASC _t na escala logarítmica	119
Tabela 4.38 Polimorfismos relativos aos genes CYP2C9 e VKORC1 dos voluntários participantes do estudo	120
Tabela 4.39 Frequência dos polimorfismos identificadas para os genes CYP2C9 e VKORC1 para os voluntários.....	121
Tabela 4.40 Frequência dos polimorfismos para CYP2C9 em brasileiros e em outras populações	121
Tabela 4.41 Frequência dos alelos para VKORC1 em brasileiros e em outras populações	122
Tabela 4.42 Intervalo de confiança paramétrico para C _{max} e ASC _t na escala logarítmica para todos os voluntários, com polimorfismos CYP2C9*1*1 e VKORC1 com presença do alelo G.....	123
Tabela 4.43 Estatística descritiva dos valores de RNI dos voluntários na fase 1	124

Tabela 4.44 Estatística descritiva dos valores de RNI dos voluntários na fase 2.....	125
Tabela 4.45 Valores médios de RNI para os tempos de coleta para as fases 1 e 2	127
Tabela 4.46 Valores médios de RNI para os tempos de coleta considerando os grupos de aleatorização e as fases do estudo.....	127
Tabela 1 Medidas farmacocinéticas dos indivíduos para o medicamento referência...	139
Tabela 2 Medidas farmacocinéticas dos indivíduos para o medicamento teste	140
Tabela 3 Estatísticas das concentrações plasmáticas ao longo do tempo (horas) do medicamento referência.....	141
Tabela 4 Estatísticas das concentrações plasmáticas ao longo do tempo (horas) do medicamento teste	142
Tabela 5 Medidas de RNI dos voluntários em dez coletas (horas) na fase 1	143
Tabela 6 Medidas de RNI dos voluntários em dez coletas (horas) na fase 2	144

LISTA DE ABREVIATURAS E NOTAÇÃO

ACN	Acetonitrila
AD	Teste de Anderson Darling
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área Sob a Curva
BPC	Boas Práticas Clínicas
CA	Coefficiente Angular Médio de Curvas de Calibração
CC	Curva de Calibração
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
C_{max}	Concentração máxima
CPL	Curva em Plasma
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQD	Controle de Qualidade Diluído
CV	Coefficiente de Variação
d_i	Resíduos padronizados
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
ER%	Erro Relativo Percentual
IC	Intervalo de Confiança
IHP	Instituto Hermes Pardini
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC_I	Limite de Confiança Inferior
LC_S	Limite de Confiança Superior
LD	Limite de Detecção
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LQ	Limite de Quantificação
LSQ	Limite Superior de Quantificação
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MMQOP	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários Ponderado
ng	Nanograma
PCR	Reação em Cadeia por Polimerase
PCR-TR	Reação em Cadeia por Polimerase em Tempo Real
PI	Padrão Interno
POP	Procedimento Operacional Padrão
r	Coefficiente de Correlação de Pearson
R^2	Coefficiente de Determinação
Res	Respostada razão da área do analito pela área do padrão interno
RNI	Relação Normalizada Internacional
s	Desvio Padrão
SER%	Somatória dos Erros Relativos Percentuais

SNP	Polimorfismo isolado de nucleotídeos
SQ_E	Soma de Quadrados dos erros
SQ_R	Soma de Quadrados da regressão
SQ_T	Soma de Quadrados Total
SQR	Substância Química de Referência
Tmax	Tempo máximo
TOF	<i>Time-of-Flight Mass Analyser</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta
VAR	Variância
°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µL	Microlitro

RESUMO

O padrão de estudos de bioequivalência 2x2 *crossover*, dose única, é empregado rotineiramente para determinar a intercambialidade entre medicamentos referência e produtos genéricos. Sabe-se também que a variabilidade individual dos voluntários participantes em relação aos parâmetros cinéticos de fármacos é um fator impactante à escolha do desenho do estudo a ser conduzido. No presente trabalho, foram determinados os polimorfismos dos genótipos CYP2C9 e VKORC1 dos 31 voluntários participantes de um estudo comparativo de duas formulações de varfarina. Com os resultados cinéticos desse estudo foi avaliado o impacto da biotransformação do fármaco e os resultados individuais dos polimorfismos dos voluntários na averiguação da bioequivalência. Assim, para a quantificação de varfarina em plasma humano nos diferentes tempos de coleta, foi desenvolvida e validada uma metodologia bioanalítica e foram avaliados os diferentes polimorfismos para os genótipos citados dos voluntários participantes do estudo comparativo de bioequivalência. As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas foram realizadas utilizando coluna Nova Pak C₁₈ (150 mm x 3,9 mm), mantida a temperatura de 30°C. A fase móvel foi composta de acetonitrila:água (80:20, v/v) com ácido fórmico e solução de amônio, na vazão de 0,600 mL/min. Os tempos de retenção típicos para varfarina e p-cloro-varfarina (padrão interno) foram 2,24 e 2,42 minutos, respectivamente. O espectrômetro de massas, equipado com fonte de *electrospray* positivo, foi empregado no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), monitorando as transições de 309,2 > 163,0 e 342,9 > 162,8, para o analito e padrão interno, respectivamente. O método de quantificação proposto demonstrou correlação significativa dos resultados ($r=0,999541$) na faixa de concentração de 5,0 – 1.000,0 ng/mL. Para a determinação dos

polimorfismos dos genótipos CYP2C9 e VKORC1 foram utilizadas as técnicas de PCR e PCR em tempo real. Foram encontrados 7 voluntários mutantes com alelos *2 ou *3 para CYP2C9, e 4 voluntários mutantes com polimorfismo AA para VKORC1.

A avaliação comparativa entre as formulações foi realizada com a construção dos intervalos de bioequivalência. Foram realizadas três comparações, entre as quais, uma considerando todos os voluntários e outras duas considerando somente os voluntários selvagens para os polimorfismos CYP2C9 e VKORC1. Os resultados obtidos neste estudo indicam que, para estes voluntários, os polimorfismos mutantes não influenciaram na conclusão da bioequivalência, pois para todos os intervalos de bioequivalência calculados, a conclusão foi pela bioequivalência entre as formulações.

Palavras-chave: Varfarina, Bioequivalência, Polimorfismo, CYP2C9, VKORC1.

ABSTRACT

The standard single dose 2x2 crossover bioequivalence study is routinely used to determine the interchangeability of reference drugs and generic products. It's also known that individual variability of participating volunteers in relation to drug kinetic parameters is a factor which impacts the choice of study design to be conducted. In this work the polymorphisms of CYP2C9 e VKORC1 genotypes were determined in 31 volunteers participating in a study matching two warfarin formulations. The impact of drug biotransformation and the single results of the polymorphisms of the volunteers within the investigation of bioequivalence were assessed through the results of this kinetic study. Thus, a bioanalytical method was developed and validated aimed at the quantitation of warfarin in human plasma at different time sampling. The different polymorphisms of the abovementioned genotypes were also assessed in volunteers participating in the comparative bioequivalence study. The high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry analysis were performed using Nova-Pak C18 column (150 mm x 3.9 mm), maintained at 30°C. The mobile phase was composed of acetonitrile:water (80:20, v/v) plus formic acid and ammonia solution, at a 0.600 mL/min flow rate. The typical retention times for warfarin and p-chloro-warfarin (internal standard) were 2.24 and 2.42 minutes, respectively. The mass spectrometer equipped with positive electrospray source was used in multiple reaction monitoring (MRM) mode, in order to monitor the 309.2>163.0 and 342.9>162.8 transitions for both the analyte and internal standard. The proposed method for results quantification demonstrated a significant correlation of the results ($r=0.999541$) within concentration ranging from 5.0 to 1000.0 ng/mL. PCR and real-time PCR techniques were employed to determine the polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 genotypes. Seven

volunteers were found with mutant for gen CYP2C9 with alleles *2 or *3, and four others were found with mutants for gen VKORC1 with polymorphisms AA.

A comparative assessment of the formulations was performed by means of the construction of bioequivalence intervals. There were three comparisons, one of which considering all the volunteers, and two more considering only the wild volunteers for the polymorphisms of both CYP2C9 and VKORC1. The results indicate that, for these volunteers, mutant polymorphisms did not affect bioequivalence completion, since the conclusion headed towards bioequivalence between the formulations considering all the calculated bioequivalence intervals.

Keywords: Warfarin, Bioequivalence, Polymorphism, CYP2C9, VKORC1

1 INTRODUÇÃO

A comparação do perfil físico-químico e farmacocinético de dois medicamentos que contenham a mesma substância ativa é um recurso para avaliar a possibilidade de utilização alternativa, ou seja, a intercambialidade entre o produto referência, ou inovador, e o produto teste. Supondo que ambos tenham essencialmente concentrações equivalentes no plasma ao longo do mesmo tempo, as mesmas irão resultar em concentrações essencialmente similares no local de ação, e, por esse motivo, um efeito similar. Assim, os dados farmacocinéticos podem ser utilizados em substituição a resultados terapêuticos para estabelecer a bioequivalência entre os produtos analisados. (EMEA, 2001)

Dessa forma, os estudos de bioequivalência são baseados na avaliação da biodisponibilidade da substância em estudo após administração, em momentos distintos, das formulações a serem comparadas. Uma publicação da EMEA em 2001 definiu biodisponibilidade como a taxa e extensão pela qual a substância ativa ou fração ativa é absorvida a partir de uma forma farmacêutica e torna-se disponível no sítio de ação. Assim, o objetivo é estabelecer a equivalência entre os parâmetros farmacocinéticos e inferir que o medicamento teste possui a mesma eficácia e segurança do medicamento referência, o qual possui eficácia clínica comprovada.

Muito já se discutiu a respeito da padronização dos critérios a serem aceitos em estudos de bioequivalência para fármacos apresentando considerável variabilidade. Nesse contexto, fármacos que exibem variabilidade intra-individual superior a 30% de CV nas medidas de farmacocinética, ASC e/ou Cmax, são considerados altamente variáveis (BLUME, H.; MIDHA, K., 1993). Conhecidamente, alguns fármacos apresentam grande variabilidade interindividual o que confere grande impacto na comparação de formulações. E para assegurar poder estatístico de pelo menos 80% para

a avaliação da bioequivalência entre duas formulações o número de voluntários (n) participantes do estudo é o fator que mais influencia. Dessa forma, para atingir a variabilidade tão baixa quanto possível com um n exequível, uma estratégia é selecionar voluntários com a maior homogeneidade possível, ou seja, com características físicas e clínicas bastante semelhantes e um número de participantes capaz de estimar diferenças entre as formulações.

Se um medicamento é conhecido por ser sujeito a polimorfismos genéticos importantes, os estudos poderiam ser realizados em grupos de indivíduos de fenótipos conhecidos ou genótipos para o polimorfismo em questão (EMEA, 2001). Assim, a fenotipagem e/ou genotipagem dos voluntários também podem ser consideradas em estudos *crossover* de bioequivalência por razões de segurança ou farmacocinética (EMEA, 2001).

Outra fonte de variação que influencia na avaliação do estudo é a incerteza de medida do método bioanalítico empregado. Entretanto essa incerteza pode ser bem controlada na etapa de desenvolvimento do método e ficar dentro dos limites de tolerância, rigorosamente, pré-estabelecidos. Se as condições analíticas forem definidas adequadamente, incluindo as etapas de preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação, a metodologia atenderá ao propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. E é na etapa de validação que se comprova a adequação da metodologia.

Assim, as validações de métodos têm sido reconhecidas como um dos pontos críticos nas cadeias de qualidade laboratoriais (SOUZA, 2007). Processos de validação fornecem parâmetros de produtividade, indicam adequação para uso de um determinado método e têm dominado na prática. Considerando que procedimentos de validação são fundamentalmente baseados em teste de hipóteses estatísticas, torna-se importante uma

verificação cuidadosa de que premissas feitas com relação aos princípios destes testes não sejam violadas (THOMPSON, 2002).

1.1 Justificativa

O campo dos testes de bioequivalência continua a oferecer muitos desafios para as indústrias de medicamentos genéricos. Com a rápida escalada dos custos desses estudos, especialmente quando repetir estudos torna-se necessário, a indústria procura por parceiros qualificados com a finalidade de aprimorar o delineamento para a execução dos mesmos. O sucesso do delineamento para um estudo de bioequivalência está vinculado ao planejamento cuidadoso bem antes que o estudo seja conduzido. Inevitavelmente, esse planejamento reduz os custos de um estudo (NIAZI, S., 2007) e o sucesso para a liberação do registro compreenderá um pequeno prazo, desde a internação dos voluntários até a liberação para a comercialização.

Vários são os fatores que conferem variabilidade nos resultados dos estudos de bioequivalência, os quais podem levar a falhas na comparação entre os medicamentos teste e referência. As propriedades físico-químicas das substâncias em estudo são fatores impactantes para determinar a bioequivalência. É importante também considerar possíveis variações para drogas que são rapidamente biotransformadas na parede do intestino ou no fígado durante a absorção, e as que são instáveis em partes específicas no trato gastrointestinal que exigem revestimento ou formulações especiais. Também podem conferir variação em estudos comparativos drogas dose-dependente de absorção, distribuição, metabolismo ou eliminação (NIAZI, S., 2007).

Dessa forma, considerando que: i) no tratamento com varfarina a dificuldade se deve à ampla variação interindividual quanto à dose necessária para atingir o objetivo terapêutico, a estreita faixa farmacológica e ao grande risco de reações adversas,

principalmente de hemorragia; ii) indivíduos com variações genéticas respondem farmacologicamente diferente à varfarina, influenciando na posologia desta; iii) estudos indicam que as variantes genéticas do VKORC1 são as maiores determinantes da variação da sensibilidade à varfarina no início e na manutenção da anticoagulação com a varfarina (RIEDER, *et al.*, 2005); iv) os polimorfismos do CYP2C9 causam interferência significativa no RNI após as duas primeiras semanas de anticoagulação (ZOLER, M.L., 2008); a correlação de estudos genéticos com os resultados farmacocinéticos de estudos de bioequivalência trará informações valiosas para a compreensão dos fatores que interferem na absorção, biotransformação e excreção do fármaco, bem como a variabilidade observada nas concentrações plasmáticas dos produtos nos estudos de bioequivalência.

O trabalho proposto tem por finalidade determinar a variabilidade de alguns polimorfismos gênicos dos voluntários participantes de um estudo de bioequivalência e avaliar possível relação da variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos da substância varfarina aos resultados da genotipagem.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi o de comparar estatisticamente duas formulações de varfarina a partir dos parâmetros farmacocinéticos, C_{max} , ASC_t e ASC_{∞} , e verificar a influência dos polimorfismos gênicos dos voluntários participantes do estudo.

1.2.2 Objetivo Específico

Os objetivos específicos foram:

1. Desenvolver e validar um método sensível, rápido e específico para quantificação de varfarina em plasma humano;
2. Avaliar o perfil farmacocinético de duas formulações, teste e referência de varfarina, administradas em voluntários sadios do sexo masculino participantes de um estudo de bioequivalência de duas formulações;
3. Realizar genotipagem dos polimorfismos*1, *2 e *3 do gene CYP2C9 e 1639GG e 1639GA do gene VKORC1;
4. Avaliar o grau de impacto dos polimorfismos dos voluntários participantes na avaliação da bioequivalência de duas formulações do fármaco varfarina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Descrição do fármaco em estudo

Os fármacos anticoagulantes visam a alterar o equilíbrio entre as reações pró-coagulantes e anticoagulantes. A eficácia e a toxicidade desses fármacos são necessariamente entre mescladas. Por exemplo, o efeito terapêutico desejado de anticoagulação pode ser contrabalançado pelo efeito tóxico de sangramento devido a uma superdose de anticoagulante. De modo semelhante, a estimulação excessiva da fibrinólise pode levar à destruição sistêmica do fibrinogênio e dos fatores de coagulação. (MAJERUS, P.W. e TOLLEFSEN, D.M., 2006). A varfarina, fármaco de escolha desse trabalho, é o protótipo dos anticoagulantes orais e, sem dúvida alguma, o mais frequentemente descrito. Entretanto, a ação anticoagulante de todos os fármacos dessa classe é semelhante, diferindo principalmente na sua potência e na duração de ação.

A varfarina sódica é um anticoagulante sintético quimicamente denominada 3-(alfa-acetonilbenzil)-4-hidroxicumarina e é uma mistura racêmica de *R* e *S*-enantiômero, de quantidades aproximadamente iguais para os dois isômeros opticamente ativos. É um pó cristalino, branco, inodoro, é descolorida pela luz e é muito solúvel em água, solúvel em álcool, pouco solúvel em clorofórmio e em éter (AVRAHAM, *et al.*; 2000; Coumadin[®], 2008). Sua fórmula empírica é $C_{19}H_{15}NaO_4$ e sua fórmula estrutural pode ser representada como a seguir.

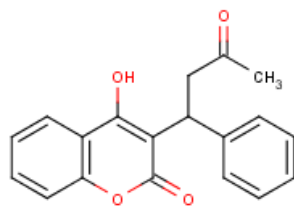


Figura 2.1 Fórmula estrutural da varfarina

A varfarina é rápida e amplamente absorvida através do trato gastrointestinal, após administração oral é absorvida por completo, atingindo a concentração máxima nas primeiras 4 horas (Coumadin[®], 2008). Esse fármaco circula ligado a proteínas plasmáticas; distribui-se amplamente em todos os tecidos e se acumula rapidamente no fígado. Aproximadamente 97% das moléculas da substância apresentam-se ligadas à albumina plasmática. Entre os isômeros *R* e *S* da mistura racêmica da varfarina, o enantiômero *S* é 2 a 5 vezes mais ativo farmacologicamente que o enantiômero *R* em humanos (MAJERUS, P.W. e TOLLEFSEN, D.M., 2006).

Estes isômeros são metabolicamente transformados por vias diferentes. A *R*-varfarina é primariamente metabolizada por redução da cadeia lateral acetil em varfarina álcoolis, que são excretados na urina, e a *S*-varfarina é metabolizada por oxidação a 7-hidroxi-*S*-varfarina, que é eliminada na bile. O fármaco é lentamente degradado e apresenta ligeiro efeito cumulativo, capaz de manter a atividade do tempo de protrombina (TP) nos níveis desejados, em geral, valores de Relação Normalizada Internacional (RNI) entre 2 e 3 são considerados alvo para pacientes anticoagulados. A meia-vida da varfarina varia de 20 a 60 horas, com média de cerca de 40 horas. A meia-vida da *R*-varfarina varia de 37 a 89 horas, enquanto que a da *S*-varfarina varia de 21 a 43 horas (SUSANNE, 2005).

A biodisponibilidade de soluções de varfarina sódica racêmica é quase completa quando o fármaco é administrado por via oral, intramuscular, intravenosa ou retal.

Entretanto, os diferentes preparados comerciais de comprimidos de varfarina variam quanto à sua taxa de dissolução, resultando em alguma variação na taxa e na extensão de absorção do fármaco. Alguns dos fatores mais comumente descritos que provocam uma redução no efeito dos anticoagulantes orais incluem redução da absorção do fármaco secundariamente à indução de enzimas hepáticas por barbitúricos, rifampicina, fenitoína ou ingestão crônica de álcool; ingestão de grandes quantidades de alimentos ou suplementos ricos em vitamina K; e aumento dos níveis dos fatores de coagulação durante a gravidez. Por conseguinte, o tempo de protrombina (TP) diminui na maioria desses casos. Em geral, a varfarina pode ser detectada no plasma dentro de 1 hora após a sua administração oral, e obtêm-se concentrações máximas dentro de 2 a 8 horas (MAJERUS. e TOLLEFSEN, 2006).

Cerca de 10% dos pacientes necessitam de menos de 1,5 mg/dia de varfarina para alcançar uma RNI alvo de 2,0-3,0. Esses pacientes tendem a possuir 1 ou 2 alelos variantes da CYP2C9 do citocromo P450, que é a principal enzima responsável pela conversão da *S*-varfarina em seus metabólitos inativos (AITHAL *et al.*, 1999). Em comparação com o alelo CYP2C9*1 do tipo selvagem, foi constatado que os alelos variantes CYP2C9*2 e CYP2C9*3 inativam a *S*-varfarina com muito menos eficiência *in vitro*. Esses alelos variantes são observados em 10-20% dos caucasianos, porém em <5% dos negros ou dos asiáticos (MAJERUS. e TOLLEFSEN, 2006). O *clearance* da varfarina em indivíduos CYP2C9*3-homozigotos é de apenas 10% dos valores normais, e esses indivíduos podem tolerar menores doses diárias da droga do que aqueles que são homozigotos para o alelo normal do tipo selvagem (KATZUNG, 2004).

A varfarina inibe a ação das duas redutases presentes no ciclo da vitamina K, a vitamina K redutase e a vitamina K epoxi redutase (Figura 2.2), reduzindo a quantidade de vitamina KH₂ reduzida disponível, limitando, portanto, o processo da gama

carboxilação dos fatores da coagulação II, VII, IX e X e das proteínas anticoagulantes C e S. Estes fatores da coagulação são sintetizados em grande parte no fígado e tornam-se ativos após a carboxilação dos resíduos de glutamato amino-terminais formando os resíduos de gama-carboxi glutamato (Gla) de ligação de Ca^{2+} (MAJERUS. e TOLLEFSEN, 2006).

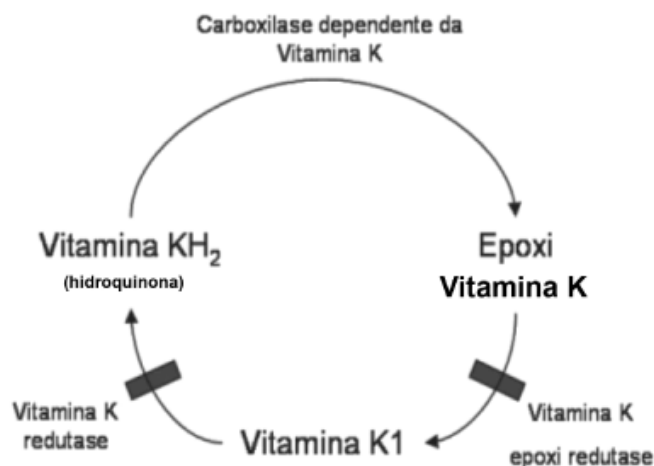


Figura 2.2 Ciclo da vitamina K. Inibição da ação das redutases pela varfarina (barras), inibindo assim a síntese de vitamina K1 e vitamina KH_2 .

Fonte: KLACK e CARVALHO, 2006

A vitamina K1 também pode ser convertida na hidroquinona correspondente por uma segunda redutase, a DT-diaforase. Esta última enzima requer altas concentrações de vitamina K1 e é menos sensível aos agentes cumarínicos, o que pode explicar porque a administração de vitamina K em quantidades suficientes pode neutralizar até mesmo grandes doses de anticoagulantes orais (MAJERUS. e TOLLEFSEN, 2006).

Para monitorar a terapia com uso de varfarina, deve-se determinar o TP do paciente juntamente com o de uma amostra de plasma misturado normal em presença de um agente de tromboplastina. Ocorre prolongamento do TP quando os níveis funcionais de fibrinogênio, do fator V ou dos fatores II, VII ou X dependentes de vitamina K estão

diminuídos. Os níveis reduzidos de fator IX ou das proteínas C ou S não têm nenhum efeito sobre o TP. As medidas do TP são convertidas em RNI através da seguinte equação:

$$RNI = \left(\frac{TP_{pac}}{TP_{ref}} \right)^{ISI} \quad (2.1)$$

onde TP_{pac} é o tempo de protrombina do paciente, TP_{ref} é o tempo de protrombina do plasma de referência e ISI é um valor dependente de cada lote de tromboplastina.

O valor de ISI, geralmente fornecido pelo fabricante, indica a sensibilidade relativa do TP determinado por uma tromboplastina específica a reduções dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K, em comparação com um padrão de tromboplastina humana da Organização Mundial da Saúde. Os reagentes com valores mais baixos de ISI são mais sensíveis aos efeitos dos anticoagulantes orais, pois ocorre maior prolongamento do TP em comparação com aquele obtido com um reagente menos sensível apresentando ISI mais elevado (MAJERUS. e TOLLEFSEN, 2006).

Um monitoramento criterioso deve ser implementado aos pacientes uma vez que interações medicamentosas e outras interações potencializam o risco de hemorragias, elevadas concentrações plasmáticas de varfarina estão associadas a uma redução mínima na biossíntese dos fatores da coagulação dependentes de vitamina K (ALVING *et al.*, 1985) e a ingestão de vitamina K na alimentação diária podem alterar a eficácia do tratamento.

As apresentações do anticoagulante varfarina comercializadas no mercado farmacêutico brasileiro estão disponíveis em embalagens com 10 ou 30 comprimidos nas dosagens de 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 mg, sendo que o medicamento referência Marevan® é comercializado nas dosagens de 5,0 e 7,5 mg. O estudo de bioequivalência foi

conduzido para avaliar comparativamente duas formulações de varfarina sódica, na forma de comprimido simples, e dosagem de 7,5 mg.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a administração da varfarina em estudos de bioequivalência deve ser feita preferivelmente em jejum, assim como a dosagem deve ser a do fármaco inalterado. Adicionalmente aos resultados do estudo de bioequivalência clássico, aleatorizado de modelo cruzado em dois períodos, foram avaliados também os polimorfismos dos voluntários participantes para os genótipos CYP2C9 e VKORC1, a fim de investigar sua relação com os parâmetros farmacocinéticos, após dose única de duas formulações.

Um estudo conduzido por Palacio L, *et al.* (2009), avaliou a resposta da dose de varfarina em indivíduos de ascendência hispânica, considerando três grupos, sensível ($2,28 \pm 0,50$ mg/dia), intermediário ($4,2 \pm 0,76$ mg/dia) e resistente ($7,40 \pm 1,54$ mg/dia). As doses foram maiores para os indivíduos com variações que contém o alelo CYP2C9*1 comparados com os indivíduos com variantes compostos de outros alelos. Da mesma forma, os indivíduos com genótipos VKORC1-1639GG e VKORC1-1639GA também foram necessárias maiores doses em comparação com o genótipo AA. Uma análise de regressão linear multivariada, nesse mesmo estudo, mostrou que 38,2% da variância dose-resposta foi explicada por um modelo envolvendo idade (20,9%), VKORC1-1639G/A (11,3%) e variações alélicas CYP2C9*1, *2 e *3 (7,1%).

2.2 Boas Práticas Clínicas

Um ensaio clínico é um estudo sistemático de medicamentos e/ou especialidades medicinais em voluntários sadios que seguem estritamente as diretrizes do método científico previamente descrito em protocolo aprovado por um comitê de ética. Seu

objetivo é descobrir ou confirmar os efeitos e/ou identificar as reações adversas ao produto investigado e ou estudar a farmacocinética dos ingredientes ativos, de forma a determinar sua eficácia e segurança em humanos.

Com isso, os princípios éticos baseados primariamente na Declaração dos Direitos Humanos de Helsinki devem ser a base para a aprovação e condução dos ensaios clínicos. Três princípios éticos básicos de igual força moral a saber, respeito pelas pessoas, beneficência e justiça, permeiam todos os princípios de Boas Práticas Clínicas.

Toda conduta e decisões por parte do pesquisador principal devem garantir a solidez científica do estudo por um lado e sua solidez ética por outro. Além disso, devem ser estabelecidas diretrizes para garantir que os dados obtidos com a pesquisa sejam armazenados de forma adequada e que possam ser confirmados, independentemente de onde o estudo for conduzido.

Um documento de grande importância é o consentimento informado (TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), meio pelo qual um indivíduo confirma voluntariamente seu desejo de participar de um estudo, particularmente após ter sido informado sobre todos os aspectos relevantes à sua decisão de participar. Este documento se fundamenta em dois propósitos essenciais:

- Assegurar que o sujeito controla a decisão de participar ou não da pesquisa clínica;
- Assegurar que o sujeito participa apenas quando a pesquisa é consistente com os seus interesses, valores e preferências.

O indivíduo deve decidir por participar ou não da pesquisa clínica de maneira livre e racional. Todas as informações devem ser precisas e verdadeiras, além de serem transmitidas ao sujeito em linguagem clara para facilitar a compreensão. Dessa forma, ele pode avaliar as implicações para sua própria situação clínica, pesar todas as opções, fazer perguntas e, então, tomar uma decisão livre e voluntária.

Os ensaios clínicos devem ser cientificamente sólidos, os profissionais envolvidos devem ser qualificados adequadamente por meio de educação, treinamento e experiência para desempenhar suas tarefas relativas ao ensaio clínico e aos sujeitos da pesquisa, devem ser descritos protocolos claros e detalhados, sendo estes aprovados por comitê de ética, o ensaio clínico deve ser conduzido em consonância ao protocolo que recebeu aprovação, as regras de privacidade devem estar em consonância com a(s) exigência(s) regulatória(s) aplicável(is), em suma, todos os princípios das BPC fundamentam uma conduta ética aos estudos.

2.3 Técnicas Analíticas Aplicadas à Metodologia Bioanalítica

2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) define cromatografia como o método físico de separação, no qual os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma das quais estacionárias, enquanto a outra se movimenta numa direção definida. A mistura que contém os componentes a serem separados é dissolvida na fase móvel. Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária, alguns componentes são fortemente retidos pela fase estacionária e por isso se movem lentamente com o fluxo da fase móvel. Outros componentes que interagem fracamente com a fase estacionária são

transportados mais facilmente pela fase móvel, e, conseqüentemente, possuem tempos de retenção menores. Devido às diferenças em mobilidade, os componentes da mistura podem ser separados e analisados de forma qualitativa e/ou quantitativa, pela própria técnica de cromatografia ou em conjunto com outras técnicas experimentais, tais como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas.

Um sistema cromatográfico pode ser representado basicamente por quatro componentes principais:

- um módulo para introdução de amostra (injetor);
- a fase móvel;
- a fase estacionária (coluna cromatográfica);
- um detector.

Várias técnicas cromatográficas são utilizadas e as diferenças entre elas estão na composição destes quatro componentes e em sua importância relativa. Por exemplo, na cromatografia gasosa a utilização do injetor para a introdução da amostra é de fundamental importância e deve ser escolhido em função das propriedades dos analitos de interesse, tais como, sua estabilidade e volatilidade, bem como em função da quantidade dos analitos presentes. Uma escolha incorreta pode comprometer o sucesso da análise. Em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o injetor é simplesmente necessário para introduzir o analito ao sistema sem conferir qualquer característica de distinção entre as substâncias. Um tipo muito comum, o *loop* de injeção, é quase que usado exclusivamente.

Os dois componentes responsáveis pela separação das substâncias que ocorre no sistema cromatográfico são a fase móvel e a estacionária. A fase móvel é um líquido que flui sob alta pressão (acima de 400 bar (4×10^7 Pa)) a um fluxo constante, e então

reproduz a cromatografia, já a fase estacionária é empacotada no interior de uma coluna capaz de suportar as altas pressões do sistema cromatográfico.

A cromatografia, separação das substâncias de uma mistura, ocorre se os componentes por interagir de maneira diferente com a fase móvel e/ou fase estacionária apresentarem tempos de retenção diferentes partindo da posição inicial, introdução da amostra.

Existem dois extremos:

- (i) todos os analitos têm total afinidade com a fase móvel e não interagem com a fase estacionária – todos os analitos se movem juntos com a fase móvel, eles atingem o detector rapidamente e não são separados
- (ii) todos os analitos têm total afinidade com a fase estacionária e não interagem com a fase móvel – todos os analitos ficam retidos na coluna e não alcançam o detector.

Portanto, o papel da cromatografia é de obter a separação das substâncias explorando as propriedades da fase móvel e/ou estacionária, baseando-se no conhecimento dos analitos e em investigações práticas.

Diversos detectores podem ser usados em conjunto com a CLAE, o tipo escolhido pode ser determinante para o tipo da análise e para o sucesso da análise. Os detectores são utilizados rotineiramente, incluindo o de ultravioleta, de fluorescência, eletroquímico, condutivímetro e detector por índice de refração, sendo que cada um apresenta suas vantagens e desvantagens. Muito já se discutiu a respeito da aplicação destes detectores, mas é indiscutível que o espectrômetro de massas possui vantagens

significativas frente aos demais. Uma tendência atual é introduzir a técnica de espectrometria de massas para obter métodos mais sensíveis e seletivos.

A seguir estão apresentadas algumas características e conceitos importantes a respeito do espectrômetro de massas. É importante ressaltar que a proposta desse trabalho não é descrever toda a técnica para plena compreensão, mas de discutir aspectos essenciais para esclarecer qual a importância da utilização do equipamento CLAE-EM/EM (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas) em métodos bioanalíticos.

2.3.2 Espectrometria de Massas

O espectrômetro de massas é aplicado para obter a massa molecular e informações estruturais para alíquotas em picogramas do material e prover seletividade pela técnica de decomposição de íons por reações múltiplas caracterizando o analito de interesse. É um detector ideal para caracterizar tanto qualitativamente quanto quantitativamente.

A grande vantagem da espectrometria de massas como uma técnica de detecção é que confere tanto a seleção de analitos por massa molecular quanto informações da estrutura da molécula de interesse. É uma técnica com grande sensibilidade e seletividade, características imprescindíveis para analisar amostras com matrizes complexas, como é o caso de amostras biológicas.

O triplo quadrupolo, um tipo de analisador, é extensamente utilizado entre os instrumentos *tandem*. *Tandem* na espectrometria de massas (MS/MS) é um termo que abrange um número de técnicas em que um estágio da espectrometria de massas, não necessariamente a primeira, é usado para isolar o íon de interesse e o segundo estágio é então usado para comprovar a relação deste íon com suas outras formas ou com

fragmentos obtidos por decomposição. A técnica, como sugere o nome, consiste em três etapas de ajustes nos quadrupolos em série (Figura 2.3).

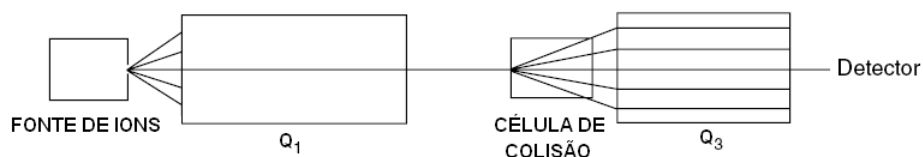


Figura 2.3 Esquema de um analisador tipo *Tandem*, Q₁: primeiro quadrupolo,
Q₃: terceiro quadrupolo

No primeiro quadrupolo (Q₁) ajusta-se o íon de interesse, no segundo não se usa como uma câmara de separação, mas como uma célula de colisão, onde os fragmentos do íon precursor são obtidos e transportados até o terceiro quadrupolo (Q₃), e na sequência seleciona-se um dos fragmentos formados. Nos dois ajustes de massas há o controle para uma única unidade de relação m/z ou um intervalo de valores de relação m/z . É importante destacar que a relação m/z , lê-se massa/carga, é a razão entre massa molecular da estrutura e a sua carga, que pode ser positiva ou negativa.

Em espectrometria de massas existem outros tipos de analisadores, além do Quadrupolo, (p.ex.: *Ion-Trap* e *Time-of-Flight Mass Analyser* – TOF), que são utilizados para análises qualitativas ou quantitativas para diferentes classes de substâncias químicas. Também é possível configurar dois analisadores como representados na Figura 2.4.

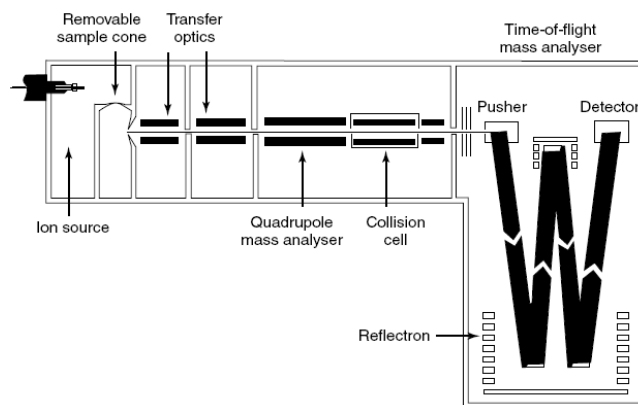


Figura 2.4 Representação de analisador quadrupolo associado com analisador de massas

Time-of-flight (tempo de voo). Fonte: LINDON, J.C. *et al.*, 2000

É na fonte de ionização (*Ion source*), representada na figura anterior, que ocorre a ionização da substância e a volatilização da fase móvel, quando utilizada a cromatografia líquida. Muitos avanços tecnológicos na espectrometria de massas melhoraram a sensibilidade das técnicas e propiciaram aumento no escopo das classes de substâncias a serem analisadas. O *Eletrospray* foi o tipo de fonte que permitiu acoplar a cromatografia líquida de alta eficiência ao espectrômetro de massas e sua configuração perpendicular à entrada para o analisador aumentou a sensibilidade da técnica.

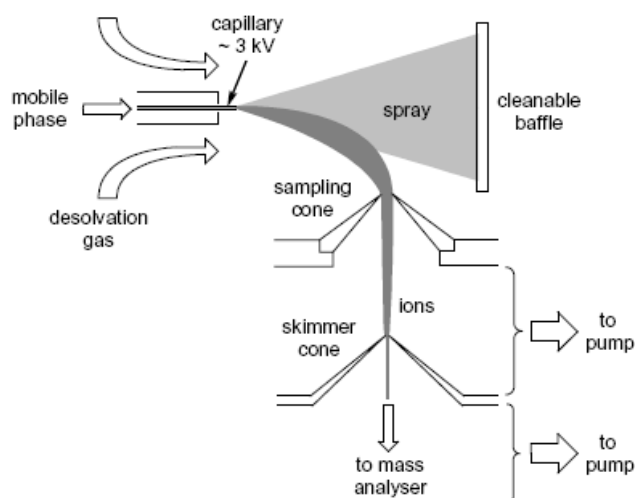


Figura 2.5 Representação esquemática de fonte de ionização – *Eletrospray*

Fonte: LINDON, J.C. *et al.*, 2000

Mesmo com grande fluxo de solvente orgânico chegando à interface da fonte de ionização com o analisador, o vácuo no interior do espectrômetro é preservado e os interferentes não ionizados não são direcionados para o interior do analisador. Como nos analisadores, há vários tipos de fontes para as várias aplicações. Assim, é importante conhecer quais as diferenças e para qual aplicação a configuração é indicada.

2.4 Técnicas para Determinação de polimorfismos

As bases moleculares de diferenças farmacogenéticas começaram a ser elucidadas na década de 1980, com a clonagem e a caracterização do gene debrisoquina 4-hidroxilase (*CYP2D6*). A partir daí, inúmeros genes envolvidos na metabolização de fármacos foram caracterizados. Desde então, a ênfase dos estudos farmacogenéticos tem sido a identificação de polimorfismos em um único gene. Apesar de características monogênicas serem importantes determinantes da ação de um fármaco, o efeito farmacológico como um todo é resultado da interação de vários genes, cada um codificando uma proteína envolvida em uma ou várias etapas do metabolismo, transporte, distribuição e ação do fármaco. Por exemplo, se um indivíduo for portador de duas variantes genéticas, uma cujo produto afete a inativação do fármaco e outra cujo produto afete a sua ligação a um receptor; o primeiro polimorfismo irá determinar a concentração do fármaco e o outro irá alterar a forma como a pessoa responderá a essa concentração. Essas interações poligênicas são mais difíceis de quantificar do que efeitos monogênicos, mas certamente nos dão um panorama mais real sobre a resposta ao fármaco (HUTZ, MH; FIEGENBAUM, M.; 2004).

Os recentes avanços em pesquisa molecular, métodos de análise de DNA e bioinformática que começaram na década de 1990 têm elucidado os mecanismos dos efeitos farmacológicos, das diferenças genéticas na patogenia das doenças e dos

polimorfismos em genes importantes para a determinação das diferenças de respostas a fármacos entre indivíduos. Essas inovações certamente contribuirão para a instalação da farmacogenômica como uma realidade na medicina do século XXI (HUTZ, MH; FIEGENBAUM, M.; 2004).

Duas técnicas envolvidas na identificação dos polimorfismos foram empregadas neste trabalho, a técnica de reação em cadeia por polimerase (PCR) e a reação em cadeia por polimerase em tempo real (PCR-TR), as quais estão apresentadas a seguir uma síntese de sua utilização e aplicação.

2.4.1 Técnica de Reação em Cadeia por Polimerase

Esta técnica é muito conhecida pela sigla PCR, originada do inglês *Polymerase Chain Reaction*, é um método de amplificação de ácido desoxirribonucléico (DNA) sem o uso de um organismo vivo. Idealizada por Kary Mullis nos meados dos anos 80, e, assim como o sequenciamento de DNA ela tem revolucionado a genética molecular, tornando possível uma nova abordagem para o estudo e a análise de genes (WATSON, 2009).

A PCR é um método muito sensível de análise e por isso é realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar ou tornar errôneo o resultado. Essa técnica explora certas características do processo de replicação do DNA. A DNA polimerase usa o DNA de fita única como molde para a síntese de uma nova fita complementar. Esse molde de DNA de fita simples pode ser produzido pelo simples aquecimento do DNA de fita dupla a temperaturas próximas à de ebulição (WATSON, 2009).

Em primeiro lugar, deve-se extrair o material genético da célula ou outro material a ser estudado sem danificá-lo. Normalmente o material extraído é o DNA, mas

também pode-se trabalhar com o RNA. Depois de extraído o DNA, a este é adicionada uma mistura, também conhecida como pré-mix, que contém os desoxirribonucleotídeos trifosfatos, dNTPs, que são as bases nitrogenadas ligadas com um três fosfato, os *primers* também chamados de oligonucleotídeos ou iniciadores, e a enzima DNA polimerase em uma solução tampão. Toda esta mistura é colocada no termociclador, o qual faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação de específicos fragmentos a serem amplificados. A PCR em tempo real - PCR-TR é uma técnica muito semelhante à descrita anteriormente, o que a diferencia é a aquisição dos dados durante todo o período de tempo relativo à amplificação dos fragmentos da PCR. Ou seja, os dados relativos ao número de fragmentos são constantemente adquiridos e é possível acompanhar o aumento desses fragmentos durante os ciclos de aquecimento e resfriamento.

2.5 Conceitos dos Parâmetros de Desempenho Analítico

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos são: seletividade e especificidade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite inferior de quantificação, limite superior de quantificação e robustez. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes como figura analítica de mérito. A seguir serão apresentados alguns conceitos importantes para melhor compreensão do processo de validação de métodos bioanalíticos.

2.5.1 Seletividade e Especificidade

Um método bioanalítico deve ser capaz de medir a quantidade exata de um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para confirmar esta capacidade deve-se obter resultados de amostras contendo o fármaco, ou medicamento, contaminadas com impurezas ou interferentes e comparar com os resultados de amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por materiais. Propostas de ensaios analíticos como este comprovam que o método é seletivo, pois o sinal da resposta do detector é exclusivamente do composto de interesse.

Assim, o parâmetro seletividade refere-se à capacidade do método diferenciar o analito entre as várias substâncias presentes nas amostras. Se esse parâmetro não for assegurado, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas.

A especificidade também é um parâmetro relacionado ao evento da detecção do método analítico, por isso que muitas vezes é confundido com seletividade. Dizer que o método é específico significa que produz resposta para um único analito, ou seja, somente medirá aquela substância que é a de interesse.

Em suma, quando o método produz respostas para várias espécies químicas, mas é capaz de distinguir a resposta do analito das outras respostas pode ser chamado de seletivo e quando somente um analito for avaliado será específico. Dessa forma, um método pode ser seletivo e específico ao mesmo tempo.

2.5.2 Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do método de distinguir, de maneira confiável, duas concentrações próximas (BRITO *et al.*, 2003). Sejam dx e dY , respectivamente, a

diferença de concentração do analito e a diferença entre as respostas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico expresso como:

$$S = \frac{dY}{dx} \quad (2.2)$$

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração, dx , do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido, dY . Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da resposta monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito. Entretanto, tornou-se comum o uso errôneo desse termo para designar método com baixo limite de detecção. O conceito e a maneira de calcular esse parâmetro de desempenho analítico serão discutidos nesse trabalho.

2.5.3 Exatidão e precisão

Os parâmetros de validação exatidão e precisão são considerados os mais importantes. A exatidão implica na combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos e a precisão está associada aos erros aleatórios de um sistema de medição. Ou seja, a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (DOQ-CGCRE-008, 2003), e ao resultado incide um erro sistemático, ou tendência, que é intrínseco ao método. Outra maneira para avaliar a exatidão do método recentemente desenvolvido é a comparação do método com um segundo método de referência bem estabelecido.

A precisão representa o grau de repetitividade entre os resultados das análises individuais. Quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra

homogênea, em idênticas condições de ensaio, aos resultados incide um erro aleatório que está relacionado, principalmente, às pequenas variações de preparo das amostras e às injeções do sistema cromatográfico. A precisão representa o quanto que o valor obtido distancia do nominal, é calculada como coeficiente de variação (CV%) dos resultados de ensaio, expressa em porcentagem a partir da razão do desvio padrão pela média das replicatas analisadas.

2.5.4 Linearidade

Os experimentos descritos para avaliação da linearidade frequentemente envolvem preparo de curvas de calibração com ou sem matriz, em sua maioria com cinco a seis níveis de concentração, incluindo ou não o ponto zero, e com um mínimo de duas a sete replicatas por nível. Em geral, utiliza-se o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) como ferramenta estatística para avaliação da linearidade. A maior parte das referências recomenda a estimativa dos parâmetros de desempenho analítico, além de uma análise dos resíduos do modelo de regressão, incluindo a inspeção do diagrama de dispersão (x,y) e do gráfico dos resíduos da regressão.

Contudo, os procedimentos para análise de dados propostos na literatura são muitas vezes controversos. Enquanto alguns autores recomendam a avaliação do coeficiente de correlação como indicador de linearidade, outros enfatizam que esta estatística não deve ser utilizada neste contexto. Considerando essa contradição, é importante destacar que o coeficiente de determinação (R^2) não é indicado para medir a adequação do modelo, uma vez que ele pode ser artificialmente aumentado através da adição, ao modelo, de termos polinomiais de ordens superiores em x . Além disso, em

geral, não mede a magnitude da inclinação da linha de regressão, e sim está associado à correlação linear entre Y e x .

Já a inclinação da curva de calibração, β_1 , mede a mudança prevista na média de Y para uma mudança unitária em x . Assim, quanto maior for essa variação em Y maior é a inclinação, e em termos analíticos, mais sensível é o método. A seguir, está apresentada a equação geral da reta considerando o erro associado aos resíduos.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon \quad (2.3)$$

onde, β_0 é o coeficiente linear, β_1 é o coeficiente angular e ε é o erro aleatório da equação associado aos resíduos, as premissas deste modelo serão discutidas mais detalhadamente neste trabalho.

No “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, publicado no Diário Oficial da União pela ANVISA de 2003, foi preconizado que “para os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência deve-se utilizar padrão interno, sempre que métodos cromatográficos forem utilizados”. Com isso, a determinação da quantidade de padrão interno adicionado deverá ser criteriosa para não proporcionar uma baixa sensibilidade ao método.

Para os métodos cromatográficos, a resposta, Res , é definida como a razão da área do analito de interesse pela área do padrão interno (equação 2.4). Quanto maior for o valor de área do padrão interno, menor será a sensibilidade do método após variação da concentração do analito em x .

$$Res = \frac{(\text{área do analito})}{(\text{área do padrão interno})} \quad (2.4)$$

A definição dos limites superior e inferior da faixa de trabalho, presente nos itens a seguir, é normalmente derivada dos estudos de linearidade publicados em artigos científicos, da concentração da amostra a ser quantificada e obtida experimentalmente. Ou seja, a faixa de trabalho é dependente da intenção da aplicação do procedimento. É importante destacar que esse intervalo deve estabelecer uma relação linear com o valor de concentração do analito e deve ser determinada a exatidão e linearidade exigidas sob as condições especificadas para o ensaio. A relação linear pode ser válida sobre a faixa linear de trabalho, mas é improvável que essa relação linear extrapole além desses intervalos. Em outras palavras, à medida que nos movemos além dos valores limítrofes da curva de calibração, tornamo-nos menos certos acerca da validade do modelo adotado (MONTGOMERY, D.C, *et al.*, 2006).

Segundo a Resolução RE 899 da ANVISA “não é permitido estimar a concentração das amostras através de extrapolação da curva de calibração abaixo do Limite Inferior de Quantificação ou acima do maior padrão. Em vez disso, a curva deve ser redefinida ou as amostras de concentrações superiores devem ser diluídas e reanalisadas.” Assim, a determinação desse intervalo e a relação linear entre a resposta do sinal e concentração do analito é de fundamental importância para a aplicação do método bioanalítico validado.

2.5.5 Limite Inferior de Quantificação

O Limite Inferior de Quantificação (LIQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Esse limite é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como

concentração do analito na amostra. A importância de determinar um valor suficientemente baixo para os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência é para melhor traçar o perfil farmacocinético do analito sob estudo.

A faixa de trabalho deve ter um limite inferior de quantificação suficientemente baixo a fim de quantificar os primeiros pontos de coleta das amostras responsáveis pelo início do perfil farmacocinético, fase absorptiva do fármaco, e também quantificar os pontos de concentrações mais baixas da região de eliminação do fármaco, após a concentração máxima (C_{\max}), fase β . Na Figura 2.6 pode-se observar um perfil farmacocinético típico de um fármaco no organismo, considerando um sistema monocompartimental, com as fases de absorção, de distribuição (fase α) e de eliminação (fase β). Também estão destacados valores de concentração máxima, de tempo máximo e a região da área sob a curva (ASC).

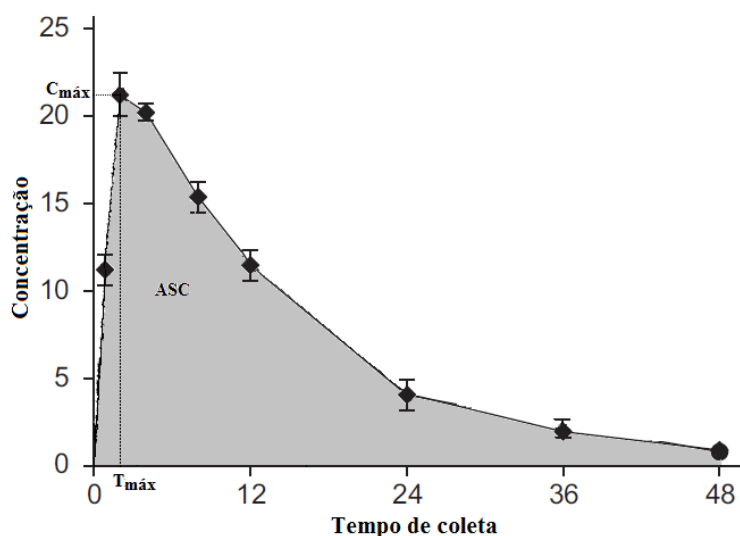


Figura 2.6 Representação do perfil farmacocinético após administração oral, dose única;

C_{\max} : concentração máxima, T_{\max} : tempo máximo e ASC: área sob a curva.

Alguns laboratórios determinam a concentração para esse limite por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o

menor nível quantificável com precisão e exatidão. Outros laboratórios analíticos determinam esse valor calculando 1% da concentração máxima do fármaco publicada em literatura. Além de demonstrar a precisão e exatidão para o LIQ, outros critérios, preconizados na Resolução RE 899 da ANVISA, de 29 de maio de 2003, que devem ser demonstrados é a razão do sinal pelo ruído da linha de base (no mínimo, 5:1), e o sinal do analito que também deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branca no mesmo tempo de retenção.

Para o cálculo de valores extremos aos limites de quantificação, inferior e superior, deve-se ter o cuidado de seguir a legislação vigente e avaliar a incerteza de medidas fora da faixa de trabalho. Visto que os resultados analíticos não são somente concentrações, mas sim estimativas de concentração propensas a erros, nas medições abaixo dos limites estas estimativas acompanhadas por suas respectivas incertezas podem levar a resultados negativos (SOUZA, 2007) e os modelos de regressão também não são necessariamente válidos para finalidades de extrapolação (MONTGOMERY, D.C, *et al.*, 2006).

2.5.6 Limite Superior de Quantificação

O Limite Superior de Quantificação (LSQ) é a maior quantidade do analito em amostra possível de ser quantificada com precisão e exatidão, determinado como limite pela faixa de trabalho. Alguns fenômenos causados por concentrações elevadas do analito podem interferir na resposta do detector, e, conseqüentemente, influenciar na linearidade da curva de calibração. Assim, as condições de saturação do detector, o efeito de supressão iônica e a contaminação de traços de analitos entre análises de amostras sequenciais (*carry over*) devem ser controlados. A saturação do detector é a

perda da sensibilidade do método de responder, na mesma proporção linear, a uma variação de unidade de concentração.

Já o efeito de supressão iônica está associado a uma diminuição da formação de íons na fonte do espectrômetro de massas. Essa diminuição, para amostras com concentrações elevadas, geralmente está associada à influência dos elementos do meio ao equilíbrio iônico da substância analisada, por exemplo, a compatibilidade do solvente utilizado no preparo da amostra com a fase móvel.

A contaminação entre amostras sequenciais está associada ao processo de lavagem do amostrador automático, o qual deve ser padronizado para limpeza eficiente após a injeção do maior padrão. O teste de possível *carry over* constitui na análise sequencial de injeções de padrão LSQ seguido de amostras brancas, todas preparadas após processo de extração em matriz biológica.

Vale ressaltar que quando os valores apresentam tendência negativa para as respostas de concentrações elevadas, a reta de regressão pode representar bem a relação entre as variáveis no intervalo da curva de calibração, mas não há garantia de que a relação mantenha esta natureza (linear) fora do intervalo considerado, como ilustrado na Figura 2.7.

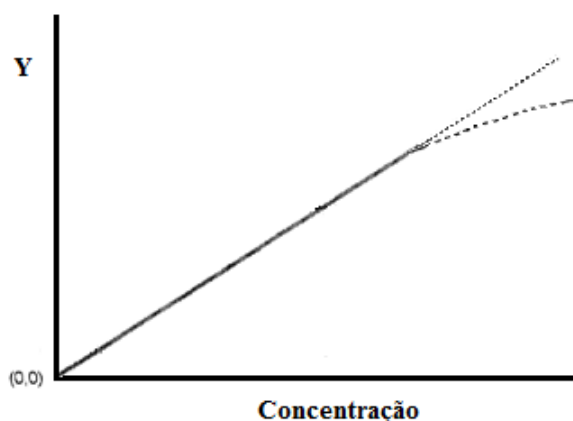


Figura 2.7 Trecho inicial apresentando linearidade (correspondendo à reta cheia) e prolongamento da reta indicando perda de linearidade (reta tracejada).

Segundo a Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003 e o guia “Esclarecimentos Sobre a Aplicação da RE N° 899/2003 – Validação de Métodos Bioanalíticos” publicado pela ANVISA em 2008 o limite superior de quantificação poderá ser de até 2,2 vezes o valor da concentração máxima do fármaco publicada na literatura.

2.5.7 Limite de Detecção

Para métodos qualitativos o Limite de Detecção (LD) é o limiar de concentração no qual o ensaio se torna pouco confiável. Para métodos quantitativos é a menor concentração do analito ou valor da propriedade que pode ser confiavelmente detectada pelo método, ou seja, ainda é possível diferenciar o sinal do analito da linha de base. Para propósito de validação é normalmente suficiente prover uma indicação do nível no qual a detecção se torna problemática (EURACHEM, 1998).

Quando métodos novos são desenvolvidos ou modificados para análise de traços, frequentemente definem LD em termos do desvio padrão de medidas de amostras brancas. Entretanto, sendo o branco constituído de todas as interferências do sinal, com exceção da interferência com a matriz da amostra e do analito, não reproduzirá as mesmas condições a que o analito estará sujeito durante a análise. O LD determinado dessa forma pode avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos. Mas não representam a realidade da análise prática, pois esses valores são extremamente baixos.

O LD para análises bioanalíticas deve ser determinado após processamento de amostras com interferência de matriz biológica, pois o ruído ou linha de base, considerando métodos cromatográficos, obterá valores mais próximos da amostra real. As amostras provenientes de material biológico possuem diferentes materiais que podem interferir direta ou indiretamente tanto na resposta do analito no equipamento

quanto no processo de extração. Têm-se como exemplo de material biológico sangue, soro, plasma, urina, fezes, saliva, e várias excretas de tecidos.

O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal-ruído, por desvio padrão da resposta e média do coeficiente angular e por processos estatísticos a partir dos Limites de Confiança da curva de calibração.

O sinal-ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base, como é o caso de análises cromatográficas. A determinação da razão sinal-ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado. A razão sinal-ruído com valor 3 é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção (ABNT, 2001).

Utilizando resultados dos coeficientes angular e linear das curvas de calibração do método bioanalítico também se pode calcular o limite de detecção. A equação de LD apresentada em (2.5) depende do desvio padrão dos coeficientes linear (s_{β_0}) e do coeficiente angular médio das curvas de calibração ($\bar{\beta}_1$) que estima a sensibilidade de detecção do equipamento.

$$LD = \frac{3 \times s_{\beta_0}}{\bar{\beta}_1} \quad (2.5)$$

O número de curvas necessárias para executar esse cálculo é de no mínimo três curvas de calibração contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

Outra maneira prática de calcular o LD é utilizando os limites de confiança das curvas de calibração. A Figura 2.8 a seguir representa um esquema para exemplificar a técnica.

A seguir está apresentado o processo para determinar o valor de LD:

1. O ponto de interseção é normalmente quando $x = 0$ (seta A, círculo); mas quando β_0 é negativo especifica-se para o valor de x o ponto do intercepto da curva com a abscissa, valor de $Y \geq 0$ (seta B, quadrado). Esta é uma maneira de determinar LD sem que o torne irreal;
2. O Limite de Confiança Superior (LC_S) é obtido a partir das expressões (2.6), intervalo de confiança de $100(1 - \alpha)\%$ em torno da resposta média, usando o sinal (“+”), e variância do estimador Y (2.7);

$$IC = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_0 \pm t_{(\alpha/2, n-2)} \sqrt{Var(\hat{\mu}_{Y|x_0})} \tag{2.6}$$

$$Var(\hat{\mu}_{Y|x_0}) = \hat{\sigma}^2 \left[\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right] \tag{2.7}$$

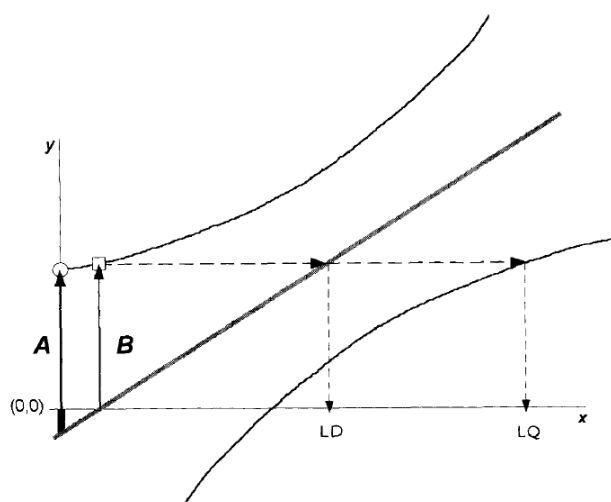


Figura 2.8 Esquema para determinação do limite de detecção (LD) e limite de

quantificação (LQ) considerando β_0 negativo, com valores em x, concentração do analito, e em y, resposta (MEIER, P. C., 2000).

3. Uma linha horizontal é traçada através do limite de confiança superior marcado com o círculo ou quadrado, conforme dados apropriados, como exemplo na figura anterior;
4. LC_S é inserido na equação (2.6) ($LC_s = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 \cdot X_{LD}$). O intercepto da linha horizontal com a linha de regressão define o limite de detecção, X_{LD} , qualquer valor abaixo pode ser reportado como “valor abaixo do limite de detecção” ou também o valor encontrado e sua incerteza;
5. O intercepto da linha horizontal com o limite de confiança inferior determina o limite de quantificação, X_{LQ} , qualquer valor acima deste pode ser quantificado como “ $X(y^*) \pm t_{s_x}$ ”;
6. Valores de X entre LD e LQ podem ser reportados como “LD < X(y*) < LQ” (MEIER, P. C., 2000).

2.5.8 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado.

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de *Youden*. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança frente a tais variações não comprometendo a precisão do método (BRASIL, 2010).

Na Resolução RE 899 da ANVISA há indicação de possíveis fatores a serem testados para métodos cromatográficos: (i) variação do pH da fase móvel, (ii) variação na composição da fase móvel, (iii) diferentes lotes ou fabricantes de colunas, (iv) temperatura, (v) fluxo da fase móvel.

Em métodos bioanalíticos esse parâmetro de desempenho deve ser considerado durante a fase de desenvolvimento do método e constatando-se sua susceptibilidade às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento operacional.

A consulta pública nº 33, de 28 de junho de 2011, publicada pela ANVISA tem por objetivo estabelecer os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos no Brasil. Neste documento não há nenhuma citação para avaliar a Robustez de métodos bioanalíticos. Mas mesmo assim, é importante que o analista responsável por desenvolver o método bioanalítico tenha conhecimento de todas as possíveis variáveis que podem influenciar nos resultados e domínio de todos os processos para que não ocorram erros na quantificação das amostras.

2.5.9 Recuperação

A recuperação também é outro parâmetro a ser avaliado a fim de apresentar a eficiência do procedimento de extração do método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperações próximas a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (BRASIL, 2003d).

As respostas obtidas das substâncias analisadas no método bioanalítico após executado o processo de extração devem ser comparadas às obtidas de preparações não

submetidas à extração. Em métodos cromatográficos são comparadas as áreas dos picos cromatográficos e os coeficientes de variação entre as replicatas, de cada nível de concentração, os quais não devem ser superior a 20%, conforme publicação da ANVISA de 2008, “Esclarecimentos para Validação de Métodos Bioanalíticos”

2.6 Estudos de Estabilidade de Métodos Bioanalíticos

Com a finalidade de quantificar fármacos em matriz biológica, deve-se determinar quais serão os possíveis valores de concentrações para os controles de qualidade a serem dosados e qual o intervalo de concentração estabelecido para essa quantificação, definidos tais valores e comprovada a reprodutibilidade do método os ensaios de estabilidade são executados.

As condições de realização dos ensaios devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras (BRASIL, 2003d). As amostras teste, preparadas em matriz biológica e a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, devem ser mantidas sob a temperatura de armazenamento das amostras a serem analisadas, submetendo-se a ciclos de congelamento e descongelamento, bem como a estudos de estabilidade de curta duração, pós-processamento e longa duração. As estabilidades do analito e padrão interno nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas, também devem ser determinadas.

2.6.1 Estabilidade após Ciclos de Congelamento e Descongelamento

A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se amostras preparadas em matriz biológica isenta de interferência, deve ser avaliada a fim de reproduzir o número de degelos possíveis de serem realizados nas amostras reais. Os

conjuntos das amostras teste são armazenados sob a temperatura indicada no protocolo de estudo, aprovado pelo comitê de ética, e são executados os ciclos de congelamento e descongelamento. Após quantificação dessas amostras teste seus resultados são comparados aos obtidos de amostras recém preparadas na mesma matriz. Se a diferença obtida nesse experimento for inferior a 15% as amostras reais poderão ser submetidas ao máximo de ciclos realizados em tal estudo de estabilidade.

2.6.2 Estabilidade Pós-Processamento

Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de injeção, deve-se realizar estudo de estabilidade do fármaco, na amostra processada para análise, incluindo o padrão interno, na temperatura sob a qual o teste será realizado e o período de tempo superior à duração da corrida analítica (BRASIL, 2003d). Assim, se após o processamento das amostras as mesmas permanecem acondicionadas aguardando análise, as condições de armazenamento devem ser avaliadas pelo período de tempo igual ou superior ao necessário para a conclusão da análise das amostras reais. No dia da análise das amostras teste, armazenadas sob as condições padronizadas no procedimento operacional, uma curva de calibração e controles de qualidade preparados a fresco são analisados na mesma corrida analítica e os seus resultados devem apresentar diferença inferior a 15%.

2.6.3 Estabilidade de Curta Duração

A estabilidade de curta duração deve ser avaliada a um período de 4 a 24 horas e as amostras teste devem ser mantidas em temperatura ambiente. Depois de transcorrido o período do teste, as amostras devem ser extraídas e analisadas juntamente com

amostras de curva de calibração e controles de qualidade recém preparadas. Semelhantemente aos testes de estabilidade, as diferenças entre as concentrações calculadas das amostras teste e recém preparadas devem ser inferiores a 15%.

2.6.4 Estabilidade de Longa Duração

Este teste avalia o intervalo de tempo que as amostras em matriz biológicas podem ser armazenadas sem comprometer sua estabilidade. Utilizando-se amostras de controles de qualidade nas concentrações definidas pelo método bioanalítico, estas devem ser armazenadas por um período superior ao período de armazenamento das amostras de voluntários analisadas no estudo sob a mesma temperatura. Este intervalo de tempo deve exceder ao período entre a coleta da primeira amostra e análise da última.

2.6.5 Estabilidade das Soluções Padrão

As estabilidades das soluções-padrão do(s) analito(s) e respectivo(s) padrão interno, mantidas à temperatura definida no procedimento operacional, devem ser avaliadas através da comparação de amostras testes diluídas a partir das soluções em teste com amostras recém preparadas. As áreas obtidas na análise cromatográfica das amostras teste e frescas devem ser comparadas para avaliar possível degradação durante o período de armazenamento.

2.7 Aspectos Gerais Sobre Modelos de Regressão

A escolha das concentrações nominais da faixa linear de trabalho, como discutido anteriormente, e a interpretação da relação linear são essenciais em métodos analíticos. De fato, a qualidade dos resultados de métodos bioanalíticos é altamente dependente da qualidade do modelo de regressão ajustado e esse modelo é tipicamente usado para estimar a resposta média em cada um dos níveis particulares de x .

Considerando que alguns procedimentos analíticos utilizam modelos de calibração não-lineares, os modelos de regressão linear simples são os mais comumente adotados (ALMEIDA, A.M., *et al.*, 2002). Após ajustar o modelo e avaliar a significância da regressão, é importante construir um histograma dos resíduos ou um gráfico de probabilidade normal dos resíduos para avaliar a normalidade. O método de fazer o gráfico da probabilidade normal é preferido, pois em muitos casos os tamanhos das amostras na regressão são muito pequenos para que um histograma tenha uma apresentação visual razoável para ser informativa.

A seguir estão apresentadas premissas do método dos mínimos quadrados ordinários para aplicação em modelos de regressão linear simples e os testes para avaliar o ajuste obtido ao analisar os dados experimentais.

2.7.1 Premissas do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO)

O caso de regressão linear simples considera um único regressor ou preditor x e uma variável dependente ou variável de resposta Y . É razoável considerar que a média da variável resposta Y esteja relacionada a x pela seguinte relação linear:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon \quad (2.8)$$

A inclinação β_1 e a interseção β_0 da linha são chamadas de coeficientes de regressão. Enquanto a média de Y é uma função linear de x , o valor real observado, y , não cai exatamente na linha reta. A maneira apropriada de generalizar isso para um modelo linear probabilístico é considerar que o valor esperado de Y seja uma função linear de x , mas que, para um valor fixo de x , o valor real de Y seja determinado pela função do valor médio acrescido de um termo de erro aleatório (ε).

Denotando (x_i, y_i) é o i -ésimo par de valores de um total de n pares, as estimativas dos coeficientes de regressão, β_1 e β_0 , para modelos de regressão linear simples são obtidos pelas seguintes equações:

$$\hat{\beta}_1 = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x^2 - (\sum x_i)^2} \quad (2.9)$$

$$\hat{\beta}_0 = \frac{\sum x_i^2 \sum y_i - \sum x_i \sum x_i y_i}{n \sum x^2 - (\sum x_i)^2} \quad (2.10)$$

Uma importante parte para o ajuste do modelo de regressão é a verificação da adequação do modelo realizando testes estatísticos de hipóteses em relação aos parâmetros do modelo e à construção de certos intervalos de confiança. Essa será discutida na seção 2.4.5 desse trabalho.

Para testar as hipóteses sobre a inclinação da reta ($H_0: \beta_1 = 0$ versus $H_1: \beta_1 \neq 0$), usamos o fato de que $\hat{\beta}_1$ é uma combinação linear de variáveis aleatórias normais independentes com $N(\beta_1, \sigma^2/S_{xx})$, e para calcular S_{xx} utiliza-se a equação 2.11.

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (2.11)$$

Falhar em rejeitar $H_0: \beta_1 = 0$ é equivalente a concluir que não há relação linear entre x e Y . Isso pode implicar que x seja de pouco valor em explicar a variação de Y ou que a relação verdadeira entre x e Y não seja linear. Mas, se H_0 for rejeitada, isso implica que x é importante para explicar a variabilidade em Y , significa que o modelo de linha reta pode ser adequado ou que embora haja um efeito linear de x , melhores resultados poderiam ser obtidos com a adição de termos polinomiais de maiores ordens em x . Na seção 2.7.5 será apresentada a estatística para testar a significância da inclinação.

Para testar as hipóteses sobre a inclinação e a interseção do modelo de regressão, temos que fazer a suposição adicional de que a componente do erro no modelo, ε , seja distribuída normalmente. Assim, a estimação dos parâmetros requer a suposição de que os erros sejam variáveis aleatórias normais não correlacionadas com média zero e variância (σ^2) constante, $N(0, \sigma^2)$ (MONTGOMERY, D.C *et al.*, 2006).

Logo, o modelo verdadeiro de regressão é uma linha de valores médios, ou seja, a altura da linha de regressão em qualquer valor de x é apenas o valor esperado de Y para aquele x . A inclinação, β_1 , pode ser interpretada como a mudança na média de Y para uma mudança unitária de x . Além disso, a variabilidade de Y , em um valor particular de x , é determinada pela variância do erro σ^2 . Isso implica que há uma distribuição de valores de Y em cada x e que a variância dessa distribuição é a mesma em cada x , propriedade conhecida como homocedasticidade (MONTGOMERY, D.C *et al.*, 2006).

Obviamente, quando a faixa ótima de trabalho para valores de x é muito extensa pode-se esperar que a variância de cada ponto ajustado seja diferente. Desvios maiores nas concentrações superiores tendem a influenciar mais a reta de regressão se compararmos com os pequenos desvios associados às concentrações mais baixas,

portanto, a precisão na extremidade inferior do intervalo fica prejudicada. Vale ressaltar que a influência da variância está diretamente relacionada à sensibilidade do instrumento de medida, pois quanto maior for o acréscimo da área com o aumento de uma unidade de concentração, maior poderá ser a influência da variância na estimação dos parâmetros da regressão.

Uma maneira simples e geralmente efetiva de contornar esta situação é usar o método dos mínimos quadrados ordinários ponderado (MMQOP), que como o nome indica, leva em conta um fator de ponderação. A ponderação é muito utilizada em laboratórios analíticos e sua aplicação é bem difundida. Ajustar um modelo linear com os *softwares* dos equipamentos analíticos é bem simples e a ponderação empírica, na maioria das vezes, é baseada na variável x (concentração) ou variável Y (resposta). Assim, ao utilizar o MMQOP pode-se garantir um procedimento simples para estabilizar a variância (ALMEIDA, A.M, *et al.*, 2002) como veremos a seguir. Outra técnica também utilizada para estabilizar a variância é a transformação de *Box-Cox*, mas não será apresentada nesse trabalho.

2.7.2 Estimação dos Parâmetros do Modelo de Regressão Ponderado

Considerando as evidências de situações de heterocedasticidade, isto é, variâncias não constantes, alguns passos podem ser adotados a fim de escolher o fator de ponderação, w_i . Como o cálculo utilizando o inverso da variância não é muito difundido na rotina dos laboratórios analíticos, pode-se estimar cada ponto da curva de calibração e linearizar o modelo, no momento que o método é utilizado, aplicando diferentes fatores de ponderação, tais como: $1/x^{1/2}$, $1/x$, $1/x^2$, $1/y^{1/2}$, $1/y$ e $1/y^2$.

Para estimar os parâmetros β_1 e β_0 assumindo w_i como fator de ponderação, ou também denominado como peso, basta estimar os parâmetros do modelo de regressão

linear simples aplicando as equações 2.12 e 2.13, considerando que (x_i, y_i) é o i -ésimo par de valores de um total de n pares e w_i é o fator de ponderação escolhido.

$$\hat{\beta}_1 = \frac{\sum w_i \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \sum w_i y_i}{\sum w_i \sum w_i x^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (2.12)$$

$$\hat{\beta}_0 = \frac{\sum w_i x_i^2 \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \sum w_i x^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (2.13)$$

O nível de dependência entre as variáveis, expressa pelo coeficiente de correlação de Pearson (r), pode ser obtido pela equação a seguir:

$$r = \frac{\sum w_i \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \sum w_i x^2 - (\sum w_i x_i)^2} \sqrt{\sum w_i \sum w_i y^2 - (\sum w_i y_i)^2}} \quad (2.14)$$

Para a escolha do melhor modelo utilizado a fim de descrever o comportamento dos dados é uma etapa crítica e na publicação “Esclarecimentos sobre a Aplicação da RE 899/2003 – Validação de Métodos Bioanalíticos” divulgada pela ANVISA deve ser adotado preferencialmente o modelo mais simples, geralmente o linear. Em caso de heterocedasticidade, a ponderação mais adequada é a que apresentar o menor valor para a soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração *versus* seus valores obtidos pela curva.

Dessa forma, Centros Analíticos de Bioequivalência devem definir os critérios para a escolha do melhor modelo a ser utilizado para obter a equação da regressão ajustada aos dados experimentais. Um diagrama genérico para descrever etapas para avaliar os resultados, apresentado na Figura 2.9, esquematiza o processo para a escolha do modelo de regressão linear. Inicialmente deve-se observar a variância dos dados,

utilizando o Teste-*F*, e se não for constante, aplicar os modelos de regressão linear ponderado. Para determinar o fator de ponderação mais adequado aos dados, é necessário avaliar o erro relativo percentual e o coeficiente de correlação de *Pearson*, conforme publicação da ANVISA, e também recomendável avaliar os desvios padronizados a fim de analisar a variabilidade dos dados ao longo da faixa linear de trabalho, como descrito no item a seguir.

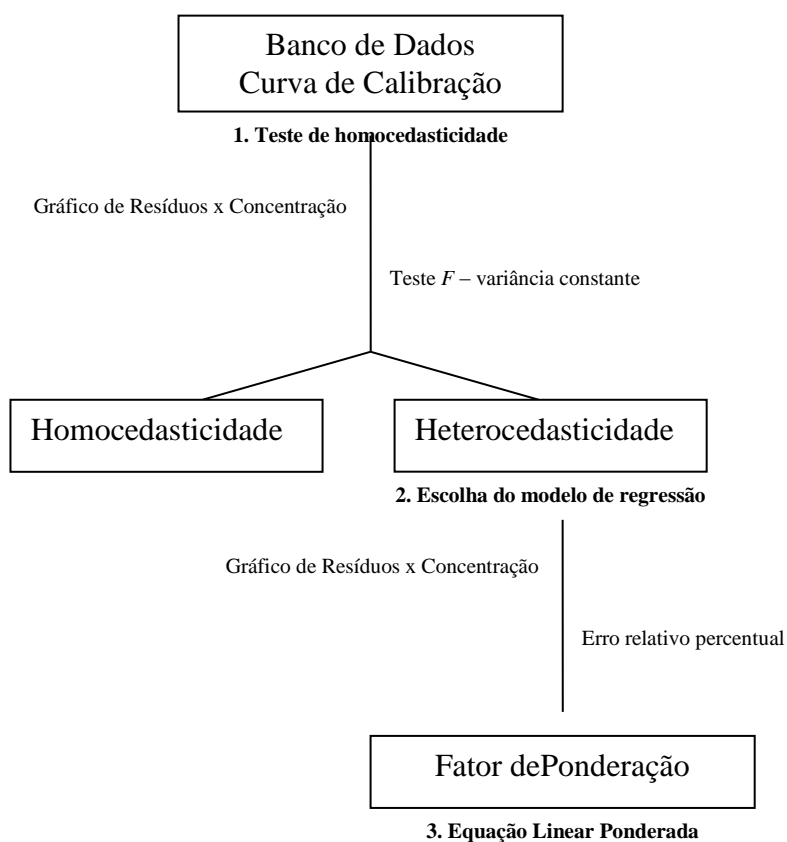


Figura 2.9 Diagrama genérico para esquematar a análise da regressão linear

Definido o melhor modelo de regressão, em um processo de validação, pode-se calcular as concentrações dos controles de qualidade da lista de validação e avaliar a precisão e exatidão do método analítico ou bioanalítico, conforme o caso.

2.7.3 Teste de Homocedasticidade

Como já dito anteriormente, a estimação dos parâmetros do modelo requer a suposição de que os erros sejam variáveis aleatórias não correlacionadas com média zero e variância constante. Assim, testes de hipóteses e estimação do intervalo requerem que os erros sejam normalmente distribuídos. A análise dos resíduos é frequentemente útil na verificação da suposição de que os erros sejam distribuídos de forma aproximadamente normal, com variância constante.

Os resíduos de um modelo de regressão são definidos por $e_i = y_i - \hat{y}_i$, $i = 1, 2, \dots, n$, sendo que y_i é uma observação real e \hat{y}_i é o valor ajustado correspondente, proveniente do modelo de regressão. É muito útil construir gráficos dos resíduos em uma sequência temporal (se conhecida), contra os valores de \hat{y}_i e contra a variável independente x , no caso dos resultados obtidos em validação de métodos analíticos o valor considerado de x é a concentração nominal de cada ponto da curva de calibração. Conforme a aparência da dispersão dos resíduos apresentada nesses gráficos pode-se indicar anomalias, principalmente o crescimento da variância com a magnitude de y_i ou x_i .

Como verificação aproximada da normalidade pode-se construir um histograma dos resíduos ou um gráfico de probabilidade normal dos resíduos. Se o tamanho das amostras obtidas para construir a regressão for muito pequeno para construir um histograma significativo, o método de construir o gráfico da probabilidade normal é preferido.

Outra técnica para avaliar se a diferença das variâncias obtidas nos extremos da curva de calibração consiste em aplicar o Teste- F . O F_{calc} é expresso com a razão entre as variâncias obtidas da concentração do limite superior de quantificação (S_2^2) e do limite inferior de quantificação (S_1^2). A regra de decisão consiste em rejeitar a hipótese

de homogeneidade de variâncias se F_{calc} for maior que F_{tab} , o percentil da distribuição F com $f_1 = f_2 = (n-1)$ graus de liberdade.

Se a variância for constante ao longo da faixa de calibração, os resíduos estarão bem distribuídos ao longo do eixo x , no gráfico de dispersão, o que acontece se F_{calc} for menor que F_{tab} .

Além do Teste- F clássico, existem os testes de Bartlett e de Levene. Esses dois testes também são utilizados para testar a homogeneidade de variâncias, entretanto o primeiro não é robusto para divergência de normalidade. Visando contornar esse problema, propõe-se o uso do teste de Levene para a comparação de variâncias de grupos de observações provenientes de distribuições contínuas e não necessariamente normais (ALMEIDA, A., *et al.*, 2008). O teste de Levene é robusto à não normalidade, pode ser usado para qualquer distribuição e a estatística desse teste usa a mediana e não a média.

2.7.4 Escolha do Fator de Ponderação

Além da análise de regressão e da avaliação do coeficiente de correlação de *Pearson*, o erro relativo percentual (ER%) é um indicador para a escolha do melhor fator de ponderação. Esse indicador é o resultado da comparação da concentração calculada (C_{calc}) obtida pelo modelo linear a partir da equação linear para cada fator de ponderação w_i , com a concentração nominal padrão (C_{nom}):

$$ER\% = \frac{C_{calc} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100 \quad (2.15)$$

A soma dos valores absolutos dos erros relativos percentuais, denotado por SER%, é um indicador capaz de avaliar qual o melhor fator de ponderação entre os

modelos ajustados aos dados. Complementando essa análise, a construção dos gráficos de dispersão de ER% *versus* a concentração também é uma importante ferramenta para avaliar os resultados obtidos.

O melhor fator de ponderação (w_i) será aquele que dá origem a uma estreita faixa horizontal dos ER%s distribuídos aleatoriamente em torno do eixo x e que apresenta a menor soma dos ER%s para todo intervalo de concentração.

Também é frequentemente útil construir o gráfico dos resíduos padronizados (2.16) em função da variável independente x para avaliar o comportamento da variabilidade dos dados. Se os resíduos representarem tendenciosidade, possivelmente a variância das observações pode estar modificando com o tempo ou com a magnitude de Y_i ou x_i , o que pode indicar uma falha no ajuste do modelo proposto.

$$d_i = \frac{e_i}{\sqrt{\hat{\sigma}_i^2}} \quad (2.16)$$

2.7.5 Teste da Significância da Regressão

A técnica estatística chamada análise de variância ANOVA pode ser usada para testar a significância da regressão. O procedimento divide a variância total da variável resposta em componentes significantes como base para o teste. Essa análise mede a quantidade da variabilidade em y_i , devida à linha de regressão, dada pela **soma de quadrados dos erros** (SQ_E), e a variação residual deixada sem explicação pela linha de regressão, denominada de **soma de quadrados da regressão** (SQ_R).

A ideia básica da análise de variância consiste na seguinte partição da soma de quadrados total (SQ_T), isto é, a soma dos desvios de cada observação (y_i) em relação à média geral (\bar{y}):

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \tag{2.17}$$

Usando a notação acima, temos que:

$$SQ_T = SQ_R + SQ_E \tag{2.18}$$

Pode-se mostrar que as somas de quadrados são independentes e sob a hipótese nula tem distribuição qui-quadrado com $n - 1$, 1 e $n - 2$ graus de liberdade, respectivamente.

A estatística para testar a hipótese $H_0: \beta_1 = 0$ é dada por:

$$F_0 = \frac{SQ_R / 1}{SQ_E / (n - 2)} = \frac{MQ_R}{MQ_E} \tag{2.19}$$

e segue a distribuição $F_{1,n-2}$ e rejeitaremos H_0 se $f_0 > f_{\alpha;1;n-2}$. As quantidades $MQ_R = SQ_R/1$ e $MQ_E = SQ_E/(n - 2)$ são chamadas de quadrados médios. Em geral, o quadrado médio é sempre calculado dividindo a soma de quadrados por seu número de graus de liberdade (MONTGOMERY e RUNGER, 2003). O procedimento do teste é geralmente organizado em uma tabela de análise de variância, como apresentado a seguir.

Tabela 2.1: Análise de Variância para Testar a Significância da Regressão

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma de quadrados*</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F₀</i>
Regressão	$SQ_R = \hat{\beta}_1 S_{xy}$	1	MQ_R	MQ_R / MQ_E
Erro	$SQ_E = SQ_T - SQ_R$	$n - 2$	MQ_E	
Total	SQ_T	$n - 1$		

Note que $MQ_E = \hat{\sigma}^2$.

*Em inglês, as estatísticas soma de quadrados e de quadrados médios são abreviados por SS e MS, respectivamente.

Saídas de alguns *softwares*, como no Minitab[®], também são apresentados resultados de p-valor, o qual indica que quanto menor o valor da probabilidade maior a probabilidade de rejeitar a hipótese nula.

Assim, é possível comparar, a partir do teste da significância da regressão e análise dos resíduos, vários modelos com diferentes fatores de ponderação.

2.7.6 Intervalo de Confiança para a Resposta Média

Um intervalo de confiança deve ser construído a partir da resposta média, em um valor especificado de x , como x_0 . Esse é um intervalo de confiança em torno de $E(T/x_0) = \mu_{Y|x_0}$, sendo frequentemente chamado de um intervalo de confiança em torno da linha de regressão. Uma vez que $E(T/x_0) = \mu_{Y|x_0} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_0$, a partir do modelo ajustado, podemos obter uma estimativa de $\mu_{Y|x_0}$ como sendo

$$\hat{\mu}_{Y|x_0} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_0 \quad (2.20)$$

Assim, $\hat{\mu}_{Y|x_0}$ é um estimador não tendencioso de $\mu_{Y|x_0}$, é normalmente distribuída, porque $\hat{\beta}_1$ e $\hat{\beta}_0$ são normalmente distribuídos, e sua variância é

$$\text{Var}(\hat{\mu}_{T|x_0}) = \sigma^2 \left[\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right] \quad (2.21)$$

Se usarmos o quadrado médio residual, $\hat{\sigma}^2$, como uma estimativa de σ^2 , é fácil mostrar que

$$\frac{\hat{\mu}_{Y|x_0} - \mu_{Y|x_0}}{\sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right]}} \tag{2.22}$$

tem distribuição t com $n-2$ graus de liberdade. Assim, o intervalo de confiança é dado por,

$$IC = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_0 \pm t_{(\alpha/2, n-2)} \sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right]} \tag{2.23}$$

É importante observar que a amplitude do intervalo de confiança é mínima para $x_0 = \bar{x}$ e alarga à medida que o módulo da diferença aumenta. A estatística S_{xx} é obtida a partir da equação (MONTGOMERY, D. C., 2006)

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right)^2 \tag{2.24}$$

O intervalo de confiança fornece um intervalo de valores plausível de se aproximar do verdadeiro valor do parâmetro, considerando uma confiança de $(1 - \alpha)100\%$.

2.8 Avaliação da Bioequivalência

Dois produtos de substâncias farmacologicamente equivalentes são considerados bioequivalentes quando a taxa e a extensão de biodisponibilidade do princípio ativo dos dois produtos não forem significativamente diferentes em condições de teste adequadas (WILKINSON, 2005). Os Estudos de Biodisponibilidade relativa/Bioequivalência são baseados na comparação entre duas formulações, sendo que uma é dita “teste” e a outra é dita “referência”, a qual é a preparação comercial existente que possui eficácia clínica comprovada.

Dessa forma, a biodisponibilidade relativa é a medida da fração (ou percentagem) de determinado fármaco que é absorvido intacto na circulação sistêmica após administração de uma formulação teste e de uma formulação referência reconhecida, em doses iguais, em mesma forma farmacêutica, pela mesma via de administração, no mesmo indivíduo e em diferentes períodos. Assim a biodisponibilidade relativa da formulação teste em função da referência pode ser calculada a partir dos valores de área sob a curva obtida nos perfis farmacocinéticos, conforme o que se segue:

$$\text{Biodisponibilidade relativa} = \frac{(ASC_{t_k})_{teste}}{(ASC_{t_k})_{referência}} \quad (2.25)$$

onde $(ASC_{t_k})_{teste}$ e $(ASC_{t_k})_{referência}$ são as áreas sob as curvas de concentração plasmática do tempo zero ao último tempo de coleta t , após a administração de dose única da forma farmacêutica teste e da forma farmacêutica referência, respectivamente (AULTON, 2005). Dentre os diversos métodos para a determinação da ASC do tempo zero até o tempo da última coleta, o mais utilizado é o método dos trapézóides (CHOW e LIU, 2009). Esse consiste na soma das áreas dos trapézios determinados pelos tempos de coleta e respectivas concentrações. Sejam $C_0, C_1, C_2, \dots, C_k$, as concentrações obtidas em um experimento para os tempos de coleta $0, t_1, t_2, \dots, t_k$, respectivamente. A ASC de zero a t_k é obtida da seguinte forma: (BRASIL, 2002a)

$$ASC_{t_k} = \sum_{i=1}^k \left(\frac{C_{i-1} + C_i}{2} \right) (t_i - t_{i-1}) \quad (2.26)$$

A área sob a curva também pode ser extrapolada e calculada do tempo zero até o tempo relativo à completa eliminação do fármaco, área sob a curva do tempo zero a infinito (ASC_{∞}), obtida conforme expressão (2.27). Ao valor de ASC_{t_k} é adicionado um valor de área calculado a partir de C_k , que é a última concentração medida, e da constante de eliminação do fármaco, K_{el} , calculada para cada voluntário, conforme expressão (2.28).

$$ASC_{\infty} = ASC_{t_k} + C_k / K_{el} \quad (2.27)$$

$$K_{el} = -1 \times Coef_{incl} \quad (2.28)$$

Outro parâmetro avaliado para comprovar estatisticamente a bioequivalência das formulações é a concentração máxima (C_{max}) do fármaco alcançada na circulação sistêmica, a qual é quantificada no sangue ou no plasma.

Selecionar um delineamento apropriado ao planejar um estudo de bioequivalência é uma questão importante. A resposta do delineamento é dependente de vários fatores, listados a seguir, os quais devem ser cuidadosamente avaliados para que o delineamento seja escolhido adequadamente.

- número de formulações a serem comparadas;
- características da droga e sua disponibilidade;
- objetivo do estudo;
- variabilidade inter e intra individuais;
- duração do estudo e número de períodos empregados;
- custo de adição de um voluntário relativo à adição de um período;
- taxa de desistência (*drop out*).

Num planejamento *crossover*, é importante remover os efeitos residuais da comparação já que o efeito da droga pode ser confundido com qualquer efeito residual. Considerando tais efeitos residuais, o seguinte modelo estatístico é normalmente utilizado. Seja Y_{ijk} a resposta (por exemplo, ASC_t e C_{max}) do i -ésimo indivíduo na k -ésima sequência no j -ésimo período:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + R_{(j-1,k)} + \varepsilon_{ijk} \quad (2.29)$$

Em que:

- μ : média geral;
- S_{ik} : efeito aleatório do i -ésimo indivíduo na k -ésima sequência, onde i (indivíduo) = 1, 2, ..., n_k e k (sequência) = 1, 2, ..., g ;
- P_j : efeito fixo do j -ésimo período, $j = 1, \dots, p$ tal que $\sum_j P_j = 0$;
- $F(j, k)$: efeito fixo da formulação administrada na k -ésima sequência e j -ésimo período tal que, $\sum F_{(j, k)} = 0$;
- $R_{(j-1, k)}$: efeito residual fixo de primeira ordem da formulação administrada na k -ésima sequência e $(j-1)$ -ésimo período, tal que $R_{(0, k)} = 0$ e $\sum R_{(j-1, k)} = 0$;
- ε_{ijk} : erro aleatório (intra-indivíduo)

A meia-vida ($t_{1/2}$) de um fármaco, também obtida a partir dos dados de concentração de cada voluntário, é o tempo gasto para que a concentração plasmática, ou para que a quantidade do mesmo no organismo, diminua em 50%, e é calculada como apresentado na expressão (2.30) a seguir.

$$t_{1/2} = \frac{\log 2}{K_{el}} \quad (2.30)$$

Embora a meia-vida seja considerada um parâmetro fraco para a determinação da eliminação de um fármaco, ela proporciona uma boa indicação sobre o tempo gasto para que um fármaco seja removido do organismo, funcionando como um meio para se calcular os intervalos entre as doses de administração de um medicamento. No caso da bioequivalência, essa medida funciona como uma ferramenta essencial para a determinação do tempo de descanso (*washout*) necessário para completa eliminação do medicamento ingerido no primeiro período do estudo (BRASIL, 2002a). A legislação brasileira prevê que o intervalo entre os períodos do estudo deve ser de no mínimo sete vezes à meia-vida do fármaco estudado (BRASIL, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Substâncias Químicas de Referência

- Substância química de referência de varfarina, USP.
- Substância química de referência de *p*-cloro varfarina, Sigma Aldrich.

3.1.2 Produtos farmacêuticos comerciais

Utilizaram-se dois produtos farmacêuticos de varfarina já comparados em relação aos parâmetros relevantes de qualidade farmacêutica, especialmente a dissolução *in vitro*, em prazos de validade e com mesmos lotes relativos a esta comparação. O produto referência foi a apresentação Marevan[®], comprimido simples de 7,5 mg, produzido pela Farmoquímica S.A, e o teste foi varfarina sódica, comprimido simples de 7,5 mg, produzido pela EMS Indústria Farmacêutica Ltda.

3.1.3 Solventes e Reagentes

Para a análise química quantitativa da varfarina foram utilizados os reagentes relacionados a seguir

- ✓ Acetonitrila, Merck;
- ✓ Acetato de Etila, Merck;
- ✓ Ácido Fórmico, Merck;
- ✓ Metanol, Merck;
- ✓ Plasma humano hemolisado, código interno: 09PLH004; doação voluntária;
- ✓ Plasma humano normal e lipêmico, códigos internos: 09PLN057, 09PLN058, 09PLN059, 09PLN060, 06PLL001; Banco de Sangue Hemoservice, MG;
- ✓ Solução de Amônio 25%, Merck;

Para os processos de extração de DNA e de PCR executados na determinação dos polimorfismos foram utilizados os seguintes reagentes.

- ✓ Acetonitrila, Merck;
- ✓ Etanol, Merck;
- ✓ Gel de agarose;
- ✓ Isopropanol, Merck;
- ✓ Solução de lise de hemácias, *Cell Lysis Solution*;
- ✓ Solução de lise de leucócitos, *Nuclei Lysis Solution*;
- ✓ Solução de precipitação celular, *Protein Precipitation Solution*;
- ✓ Solução de hidratação, *DNA Rehydration Solution*;
- ✓ TaqMan® *Genotyping Master Mix*, Applied Biosystem
- ✓ *Primer 40x C__30403261_20*, Applied Biosystem

3.1.4 Equipamentos e Acessórios

Para a análise química quantitativa da varfarina foram utilizados os equipamentos e acessórios relacionados a seguir

- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência e Auto Injetor, AllianceHT 1795;
- ✓ Espectrômetro de massas, *Quattromicro API*;
- ✓ Software MassLynx, v4.1;
- ✓ Coluna cromatográfica, NovaPak C18, 4,0 µm (3,9 x 150,0 mm);
- ✓ Agitador Vórtex, IKA;
- ✓ Balança eletrônica digital Sartorius;
- ✓ Balões volumétricos de 10 mL, Pirex;
- ✓ Banho ultrassônico Branson, 8510;
- ✓ Centrífuga refrigerada;
- ✓ Centrífuga evaporadora;
- ✓ Freezer – 20 °C;
- ✓ Freezer – 80 °C;
- ✓ Micropipetas de volume regulável.

Para o processo de determinação dos polimorfismos foram utilizados os seguintes equipamentos e acessórios.

- ✓ Capela de fluxo laminar;
- ✓ PCR em tempo real, Applied Biosystem;
- ✓ Fonte de eletroforese;
- ✓ Cuba para eletroforese;
- ✓ Termociclador;
- ✓ Dispensador eletrônico, Brand.

3.2 Métodos

3.2.1 População estudada, posologia e forma de administração

A população estudada foi constituída de 31 voluntários sadios, adultos do sexo masculino com idade de 18 a 50 anos e com índice de massa corpórea entre 18,5 e 29,9. O critério de seleção deve ser determinado previamente no Protocolo de Estudo de Bioequivalência, segundo determinação da resolução RE 895 da ANVISA, e não houve restrições quanto ao grupo étnico. Após a avaliação médica e realização dos exames laboratoriais os voluntários considerados aptos para participar do estudo foram internados por dois períodos de aproximadamente 36 horas cada, com intervalo mínimo de 21 dias entre as internações, período de *washout*. Foi necessário retornar ao local de coleta nos tempos de 48:00h, 72:00h e 96:00h após a administração do medicamento, em cada período de internação, as quais foram consideradas coletas externas à internação.

O voluntário considerado “Término Prematuro” é aquele retirado ou que retirou-se do estudo antes da administração da medicação. Aqueles que saíram do estudo após a administração da medicação foram considerados “*Drop Out*”.

Os voluntários receberam em cada um dos períodos de internação, um comprimido simples contendo 7,5 mg de varfarina sódica, por via oral em dose única, com um copo de 200 mL de água mineral, sem gás e em temperatura ambiente. A

medicação administrada seguiu a aleatorização do estudo previamente designada a uma das seguintes sequências de tratamento.

Tabela 3.2 Esquema de aleatorização para a administração dos medicamentos

<i>Sequência</i>	<i>Período I</i>	<i>Período II</i>
1	Referência	Teste
2	Teste	Referência

3.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

As condições experimentais estabelecidas para análise quantitativa da varfarina, através do método de CLAE-MS/MS, encontram-se na tabela a seguir.

Tabela 3.3 Condições analíticas determinadas para o método cromatográfico

<i>Características</i>	<i>Descrição</i>
Fase móvel	Acetonitrila:Água (80:20, v/v) com 0,073 % Ácido Fórmico e 0,045 % de Solução de Amônio 25%
Temperatura do auto-injetor	5 ± 3 °C
Fluxo	0,600 mL/min
Pressão do sistema	550 – 650 psi
Temperatura da Coluna	30 ± 5 °C
<i>Splitter</i>	5:1
Volume de injeção	10,0 µL
Tempo de aquisição	3,50 minutos

Para a otimização das condições do espectrômetro de massas, infundiram-se diretamente soluções contendo 1000 ng/mL de varfarina e *p*-cloro-varfarina e ajustaram-se os parâmetros do equipamento, conforme descrito na tabela a seguir.

Tabela 3.4 Condições analíticas definidas no espectrômetro de massas

<i>Características</i>	<i>Descrição</i>
Tipo de ionização	<i>Eletrospray</i> positivo
Modo de operação	Monitoramento de reação múltipla (MRM)
Transição monitorada	309,2 > 163,0 (varfarina) e 342,9 > 162,8 (<i>p</i> -cloro-varfarina)
Energia de colisão	13,0 eV (varfarina) e 15,0 eV (<i>p</i> -cloro-varfarina)
Gás de cone (nitrogênio)	50,0
Gás de dessolvatação (nitrogênio)	500,0
Gás de nebulização (nitrogênio)	50,0
Voltagem do capilar	3,0 V
Voltagem do cone	25,0 V (varfarina) e 22,0 V (<i>p</i> -cloro-varfarina)
Voltagem do extrator	2,0 V
Temperatura do Bloco	110,0 °C
Temperatura de dessolvatação	500,0 °C
Multiplicador de Sinal	750

3.2.2.1 Preparo da fase móvel e solução de lavagem

Com auxílio de uma proveta de 1000 mL, transferiu-se 800 mL de acetonitrila e 200 mL de água tipo I para um frasco tipo âmbar. Adicionou-se 0,727 mL de ácido fórmico e 0,448 mL de solução de amônio 25%. Homogeneizou-se a preparação.

3.2.2.2 Preparo da solução mãe e soluções de trabalho de varfarina

Foi pesada uma massa de, aproximadamente, 0,010 g de varfarina, padrão analítico. Transferiu-se quantitativamente para um balão de 10,00 mL e avolumou-se com metanol (grau HPLC). Foi calculada a concentração da solução-mãe como varfarina (308,33 g/mol) considerando a pureza do padrão. Foi armazenada em geladeira de 2 a 8 °C.

Tabela 3.5 Características da SQR de varfarina para o preparo da solução mãe

<i>SQR Varfarina</i>	
Fator de pureza (%)	100,00
Fator de massa (%)	100,00
Massa pesada (mg)	10,00
Volume Total (mL)	10,00
Conc. Alvo (mg/mL)	1,00
Diluyente	Metanol

Nota: se a substância for um sal (p.ex.: sal de sódio) ou um hidrato, calcula-se o “fator massa” em porcentagem para fins de correção de modo a se obter o título do composto de interesse.

Todas as soluções do padrão analítico varfarina preparadas durante as etapas de validação do método bioanalítico e quantificação das amostras do estudo de bioequivalência estão apresentadas a seguir

Tabela 3.6 Soluções mãe de VAR preparadas na validação do método bioanalítico

<i>Solução Mãe (Código Interno)</i>	<i>Substância</i>	<i>Massa Pesada (miligramas)</i>	<i>Concentração mg/mL</i>
09WA01U001	Varfarina	14,00	1,40
09WA01U002	Varfarina	11,70	1,17
09WA01U003	Varfarina	11,10	1,10
09WA01U004	Varfarina	11,00	1,10
09WA01U005	Varfarina	11,10	1,11
10WA01U006	Varfarina	10,50	1,05
10WA01U007	Varfarina	11,20	1,12

As concentrações das soluções de trabalho foram definidas durante o desenvolvimento do método analítico e foram diluídas a partir das correspondentes soluções mãe. O armazenamento foi realizado na mesma temperatura das soluções mãe.

As duas primeiras soluções relacionadas a seguir, nas concentrações de 100,0 e 200,0 µg/mL, são diluídas a partir de alíquotas da respectiva solução mãe relacionada na tabela anterior. As demais soluções de trabalho são preparadas por diluições sucessivas, as quais possuem preparo idêntico para os três conjuntos de soluções utilizados para o preparo das listas de validação. As concentrações destacadas na Tabela 3.7 são as soluções de trabalho relativas aos pontos da curva de calibração, sendo estas dez vezes mais concentradas que a preparação em matriz biológica. As concentrações destacadas na Tabela 3.8 são as relativas aos controles de qualidade e LIQ.

Tabela 3.7 Soluções de trabalho para obtenção de curva de calibração para a lista 09VAL0039V01LVA01

<i>Concentração Final</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Solução mãe: 09WA01U001</i>		<i>Volume de Diluente (mL)</i>	<i>Volume Final (mL)</i>	<i>Fator de Diluição</i>
	<i>Alíquota (mL)</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g/mL}$)</i>			
200,00	1,429	1400,00	8,57	10,00	7,00
100,00	0,714	1400,00	9,29	10,00	14,00
50,00	2,500	200,00	7,50	10,00	4,00
10,00	0,500	200,00	9,50	10,00	20,00
8,50	0,850	100,00	9,15	10,00	11,76
6,50	0,650	100,00	9,35	10,00	15,38
5,00	1,000	50,00	9,00	10,00	10,00
3,50	0,700	50,00	9,30	10,00	14,29
2,00	2,000	10,00	8,00	10,00	5,00
0,50	1,000	5,00	9,00	10,00	10,00
0,05	1,000	0,50	9,00	10,00	10,00

Diluyente: Metanol:Água (50:50, v/v)

Tabela 3.8 Soluções de trabalho para obtenção de controles de qualidade das listas de validação

<i>Concentração Final</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Solução mãe: 09WA01U002</i>		<i>Volume de Diluente (mL)</i>	<i>Volume Final (mL)</i>	<i>Fator de Diluição</i>
	<i>Alíquota (mL)</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g/mL}$)</i>			
200,00	1,429	1400,00	8,57	10,00	7,00
100,00	0,714	1400,00	9,29	10,00	14,00
50,00	2,500	200,00	7,50	10,00	4,00
16,00	0,800	200,00	9,20	10,00	12,50
8,00	0,800	100,00	9,20	10,00	12,50
4,00	0,800	50,00	9,20	10,00	12,50
1,00	1,250	8,00	8,75	10,00	8,00
0,15	1,500	1,00	8,50	10,00	6,67

Diluyente: Metanol:Água (50:50, v/v)

3.2.2.3 Preparo da SQR e soluções de trabalho de *p*-cloro-varfarina

Foi pesada uma massa de, aproximadamente, 0,010 g de *p*-cloro-varfarina, padrão analítico. Transferiu-se quantitativamente para um balão de 10,00 mL e avolumou-se com metanol (grau HPLC). Foi calculada a concentração da solução mãe como *p*-cloro-varfarina (342,78 g/mol) considerando a pureza do padrão. Foi armazenada em geladeira de 2 a 8 °C.

Tabela 3.9 Características da SQR de *p*-cloro-varfarina para o preparo da solução mãe

<i>SQR p-Cloro-Varfarina</i>	
Fator de pureza (%)	99,30
Fator de massa (%)	100,00
Massa pesada (mg)	10,00
Volume Total (mL)	10,00
Conc. Alvo (mg/mL)	1,00
Diluyente	Metanol

Nota: se a substância for um sal (p.ex.: sal de sódio) ou um hidrato, calcula-se o “fator massa” em porcentagem para fins de correção de modo a se obter o título do composto de interesse.

Todas as soluções de *p*-cloro-varfarina preparadas durante as etapas de validação do método bioanalítico e quantificação das amostras do estudo de bioequivalência estão apresentadas a seguir

Tabela 3.10 Soluções mãe de *p*-VAR preparadas na validação do método bioanalítico

<i>Solução Mãe (Código Interno)</i>	<i>Substância</i>	<i>Massa Pesada (miligramas)</i>	<i>Concentração mg/mL</i>
09CW01S001	<i>p</i> -Cloro-Varfarina	11,60	1,152
10CW01S002	<i>p</i> -Cloro-Varfarina	11,70	1,162
10CW01S003	<i>p</i> -Cloro-Varfarina	10,20	1,013

As concentrações das soluções de trabalho de *p*-cloro-varfarina foram definidas durante o desenvolvimento do método analítico e foram preparadas baseadas nas correspondentes soluções mãe, descritas na Tabela 3.10. O armazenamento foi realizado na mesma temperatura das soluções mãe.

Tabela 3.11 Soluções de trabalho para obtenção da solução de padrão interno

<i>Concentração Final (µg/mL)</i>	<i>Solução mãe: 09CW01S001</i>		<i>Volume de Diluyente (mL)</i>	<i>Volume Final (mL)</i>	<i>Fator de Diluição</i>
	<i>Alíquota (mL)</i>	<i>Concentração (µg/mL)</i>			
100,00	0,868	1151,88	9,13	10,00	11,52
15,000	1,500	100,00	8,50	10,00	6,67
1,500	5,000	15,00	45,00	50,00	10,00

Diluyente: Metanol:Água (50:50, v/v)

3.2.2.4 Preparo em matriz biológica dos padrões da curva de calibração e controles de qualidade

As amostras de plasma da curva de calibração e controles de qualidade foram preparadas a partir das soluções de trabalho de 0,05; 0,50; 2,00; 3,50; 5,00; 6,50; 8,50; 10,0 $\mu\text{g/mL}$, e 0,15; 4,00; 8,00; 16,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, como apresentadas na Tabela 3.12 a seguir.

O critério de escolha para as concentrações das amostras da curva de calibração foi baseado no uso de distribuição igualitária, ou seja, considerando que a C_{max} foi estimada em, aproximadamente, 500,0 ng/mL , utilizou-se, aproximadamente, 1,0% deste valor para determinar o LIQ igual a 5,0 ng/mL e o valor do LSQ igual a 1000,0 ng/mL , duas vezes o valor estimado. Os demais pontos da curva de calibração foram definidos utilizando intervalos aproximadamente iguais, sendo que os valores foram arredondados para facilitar o preparo das soluções de trabalho.

Para a escolha das concentrações dos controles de qualidade os critérios foram os seguinte:

- Controle de qualidade baixo (CQB): correspondente a três vezes a concentração do limite inferior de quantificação;
- Controle de qualidade médio (CQM): concentração intermediária entre os controles baixo e alto;
- Controle de qualidade alto (CQA): correspondente a 80% do limite superior de quantificação;
- Controle de qualidade diluído (CQD): correspondente a duas vezes a concentração do controle de qualidade alto.

Tabela 3.12 Preparo de pontos da curva de calibração e controles de qualidade em plasma humano utilizando as soluções de trabalho

<i>Padrão</i>	<i>Plasma Concentração (ng/mL)</i>	<i>Solução de Trabalho de varfarina</i>		<i>Volume de Plasma (μL)</i>	<i>Volume Total (μL)</i>	<i>Fator de Diluição</i>
		<i>Volume Adicionado (μL)</i>	<i>Concentração (ng/mL)</i>			
Branco	-	-	-	200,0	200,0	-
Zero	-	-	-	200,0	200,0	-
1	5,0	100,0	50,0	900,0	1000,0	10,0
2	50,0	100,0	500,0	900,0	1000,0	10,0
3	200,0	100,0	2.000,0	900,0	1000,0	10,0
4	350,0	100,0	3.500,0	900,0	1000,0	10,0
5	500,0	100,0	5.000,0	900,0	1000,0	10,0
6	650,0	100,0	6.500,0	900,0	1000,0	10,0
7	850,0	100,0	8.500,0	900,0	1000,0	10,0
8	1000,0	100,0	10.000,0	900,0	1000,0	10,0
LIQ	5,0	200,0	50,0	1800,0	2000,0	10,0
CQB	15,0	200,0	150,0	1800,0	2000,0	10,0
CQM	400,0	200,0	4000,0	1800,0	2000,0	10,0
CQA	800,0	200,0	8000,0	1800,0	2000,0	10,0
CQD	1600,0	200,0	16000,0	1800,0	2000,0	10,0

É importante destacar que a curva de calibração consiste de duas amostras brancas (amostra de uma matriz biológica na qual nenhum analito, nem padrão interno são adicionados), dois zeros (amostra de uma matriz biológica na qual foi adicionado somente o padrão interno), oito amostras não-zero, em duplicata, garantindo a faixa ótima de trabalho. Os controles de qualidade e LIQ foram preparados a fresco e o volume a ser preparado deve ser suficiente para a extração de número de alíquotas determinadas para o devido teste a ser realizado. Todas as amostras preparadas em plasma foram extraídas a partir de uma alíquota de 200,0 μ L, exceto para CQD, e quantificadas junto com as amostras da curva de calibração seguindo-se o método de extração como descrito no procedimento operacional padrão do método bioanalítico.

A extração da alíquota de controle de qualidade diluído foi realizada a partir da diluição em duas vezes da amostra conforme descrição na Tabela 3.12, a seguir foi transferida uma alíquota de 100,0 μ L dessa amostra de controle em plasma para microtubo descartável contendo 100,0 μ L de plasma normal branco. A preparação foi agitada em vórtex por 10 segundos e extraída conforme descrito no item 3.2.3. As amostras desconhecidas com concentrações superiores ao limite superior de

quantificação também foram diluídas de duas vezes com plasma normal isento do analito.

3.2.3 Método de extração de amostras em matriz biológica

O processo descrito abaixo foi aplicado não somente para as amostras desconhecidas, como também para as amostras da curva, branco, zero e controles de qualidade.

O procedimento de extração foi executado na ordem que se segue:

- ✓ Separou-se um número apropriado de ponteiros descartáveis em rack e microtubos de 2,0 mL;
- ✓ Em um microtubo de 2,0 mL foi adicionado 200 µL de plasma branco, padrões em plasma, controles (LIQ, CQB, CQM e CQA) em plasma e amostras a serem quantificadas, de acordo com o objetivo da lista. Para o preparo do controle CQD seguiu-se o procedimento de diluição descrito no item 3.2.2.4;
- ✓ Adicionou-se 50 µL de solução de *p*-cloro-varfarina 1,5 µg/mL;
- ✓ Agitou-se por 5 segundos em agitador vórtex;
- ✓ Adicionou-se 50 µL de uma solução de ácido fórmico 1%;
- ✓ Agitou-se por 5 segundos em agitador vórtex;
- ✓ Adicionou-se 1,00 mL de Acetato de Etila;
- ✓ Agitou-se por 30 segundos em agitador vórtex;
- ✓ Centrifugou-se a 14000 rpm, por 5 minutos e sob refrigeração (4°C);
- ✓ Congelou-se por 15 minutos a -70 °C;
- ✓ Verteu a fase orgânica para tubo de ensaio limpo e seco;
- ✓ Secou-se completamente em centrífuga evaporadora a 40°C;

- ✓ Ressuspendeu-se com 200 μ L de solução de Acetonitril:Água (80:20, v/v) com 0,20% de ácido fórmico;
- ✓ Agitou-se em vórtex por 20 segundos;
- ✓ Transferiu-se 150 μ L para plates e injetou-se conforme condições cromatográficas estabelecidas.

As condições experimentais estabelecidas para extração líquido-líquido de varfarina e *p*-cloro-varfarina nas amostras de plasma encontram-se na tabela a seguir.

Tabela 3.13 Condições determinadas para o procedimento de extração

Característica	Descrição
Matriz biológica	Plasma
Volume de amostra	200 μ L
Padrão Interno	<i>p</i> -cloro-varfarina
Solvente de extração	Acetato de etila
pH ácido	50 μ L de solução de ácido fórmico 1%
Volume de solvente	1 mL
Tempo de agitação	30 segundos em agitador vórtex
Secagem	Centrífuga evaporadora
Reconstituição	200 μ L de solução de Acetonitril:Água (80:20, v/v) com 0,2% de ácido fórmico

3.2.4 Validação do Método Bioanalítico

A validação foi conduzida usando extração líquido-líquido e procedimentos preconizados pelo órgão regulatório. Os parâmetros avaliados foram: efeitos de matriz, especificidade, recuperação, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e estudo de estabilidade em matriz biológica e em solução.

3.2.4.1 Efeito de Matriz

A avaliação do efeito de matriz foi conduzida após a análise de cinco replicatas para a concentração de CQM em três tipos de plasmas, normal, lipêmico e hemolisado. As médias dos resultados de cada controle foram comparadas com as de amostras brancas dos mesmos plasmas normal, lipêmico e hemolisado submetidas ao processo de extração e dopadas de soluções de varfarina e padrão interno no momento da secagem das amostras brancas, denominados de Branco Contaminado.

Complementando este teste também foi realizado o Teste de Interferência Iônica, o qual é um teste específico para a detecção por espectrometria de massas e este possibilita verificar se existe alguma interferência de matriz na fonte de ionização. Na maioria dos casos ocorre uma supressão do sinal no momento que grande quantidade de matriz chega ao detector o que justifica a importância de analisar o pico cromatográfico em tempo de retenção superior ao volume morto da coluna cromatográfica.

3.2.4.2 Especificidade

Para avaliar a interferência de componentes endógenos, foram analisadas seis amostras em plasma branco, sendo uma de plasma lipêmico, uma de plasma hemolisado e quatro de plasma normal, isentas de varfarina e padrão interno. As amostras utilizadas nesse teste estão relacionadas no item 3.1.3. Podem ser aceitos interferentes com mesmo tempo de retenção e resposta correspondente a no máximo 20% da área do pico do limite inferior de quantificação do padrão e 5% da área do pico do padrão interno.

Foram extraídas amostras em duplicatas desses seis tipos de plasmas, e se caso fossem observados picos cromatográficos com áreas superiores aos critérios estabelecidos, no mesmo tempo de retenção, deveria proceder a substituição da matriz ou modificar as condições cromatográficas. É importante destacar que o método deve ser validado nas mesmas condições experimentais ajustadas em todas as análises das etapas de validação e quantificação dos voluntários.

3.2.4.3 Recuperação

A recuperação de varfarina e *p*-cloro-varfarina foi determinada comparando-se os resultados das análises de amostras de plasma adicionadas do analito e padrão interno, submetidas ao processo de extração, com aqueles obtidos de análises de amostras de varfarina e padrão interno, não extraídas, mas adicionadas de plasma branco submetido ao processo de extração. Outra comparação também foi feita com amostras de controles de qualidade contendo o analito e o padrão interno preparadas em solução de ressuspensão.

Foram avaliadas três diferentes concentrações para varfarina (CQB: 15 ng/mL, CQM: 400 ng/mL e CQA: 800 ng/mL) e uma concentração de padrão interno (1,5 µg/mL) em seis repetições.

As amostras preparadas a partir de uma extração do plasma “branco” e, ao final do processo, contaminado com o controle de qualidade em solução são denominadas amostras sob Efeito de Matriz. Ou seja, há uma possível variação na extração e detecção do analito e padrão interno que é dependente da matriz que se trabalha. Essa variação foi avaliada no Teste de Recuperação para diferentes matrizes (plasma normal, lipêmico e hemolisado). A comparação entre a resposta obtida de amostras submetidas à extração com aquela obtida da adição do analito ao substrato da mesma matriz biológica que foi submetida à extração pode ser denominada Recuperação Real.

Considera-se como Recuperação Absoluta aquela que avalia ambos os efeitos em conjunto (eficiência de extração e efeito da matriz na resposta com o detector), a qual compara-se a resposta obtida após a extração com aquela obtida pela análise da mesma quantidade de analito preparada com a solução de ressuspensão.

➤ Preparo das amostras submetidas ao processo de extração

Os procedimentos de preparo em plasma dos controles de qualidade estão descritos no item 3.2.2.4 e a extração foi executada conforme descrição presente no item 3.2.3, desse documento.

➤ Amostras não submetidas ao processo de extração, mas adicionadas de plasma branco extraído

Em tubos de ensaio de vidro pipetaram-se alíquotas de soluções padrão de varfarina correspondentes ao CQB, CQM e CQA, e adicionaram-se 50 µL de solução de PI (1,5 µg/mL). Amostras de plasmas brancos foram extraídas seguindo a mesma metodologia, conforme descrito do item 3.2.3. Porém, a camada orgânica foi vertida diretamente para os tubos de ensaio de vidro nos quais haviam sido pipetadas as soluções padrão de varfarina e PI. Agitou-se e evaporou-se toda a preparação em centrífuga evaporadora e reconstituiu-se o resíduo com 200 µL de solução de ressuspensão. Estas amostras representam as áreas de referência do padrão e PI.

3.2.4.4 Linearidade

As curvas de calibração foram construídas a partir de oito concentrações de varfarina, incluindo os limites inferior e superior de quantificação, na faixa de 5,0 a 1000,0 ng/mL. Calculou-se a correlação linear entre as amostras analisadas em duplicatas, variáveis independentes (x) e as razões entre as áreas dos picos cromatográficos da varfarina e do padrão interno, consideradas variáveis dependentes (y). Os parâmetros da correlação foram estimados através do método dos mínimos quadrados ordinários ponderados, utilizando o fator de ponderação $1/x^2$. A linearidade foi avaliada pelo valor do coeficiente de correlação linear de Person (r^2), que deve ser superior a 0,98. Conforme documentos internos do centro analítico, alíquotas com valor calculado de exatidão fora do intervalo entre $\pm 15\%$ da concentração nominal devem ser excluídos da estimativa da correlação, porém, para o LIQ, admitem-se valores entre $\pm 20\%$ da concentração nominal.

3.2.4.5 Precisão

A precisão foi determinada pela análise de amostras de controle de qualidade em três níveis de concentração (CQB, CQM e CQA) extraídas em plasma humano. Foi avaliada a precisão intra-dia (análise realizada no mesmo dia, com duas listas de validação, ambas em nove replicatas para cada nível de concentração) e inter-dias (análises realizadas em dias diferentes, com duas listas de validação, ambas em nove replicatas para cada nível de concentração). O valor do coeficiente de variação das análises das diferentes concentrações não deve ser superior a 15%.

3.2.4.6 Exatidão

A exatidão foi determinada pela análise de amostras de controle de qualidade em três níveis de concentração (CQB, CQM e CQA) extraídas em plasma humano. Foi avaliada a exatidão intra-dia (análise realizada no mesmo dia, com duas listas de validação, ambas em nove replicatas para cada nível de concentração) e inter-dias (análises realizadas em dias diferentes, com duas listas de validação, ambas em nove replicatas para cada nível de concentração). A exatidão das amostras deve estar entre 85% a 115% do valor nominal da concentração.

3.2.5 Estudo de Estabilidade

Para a determinação da estabilidade de amostras de varfarina foram preparadas amostras teste, conforme procedimento de preparo dos controles de qualidade descrito no item 3.2.2.4, e executados os ensaios de ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento, curta duração e longa duração, conforme descritos a seguir. Avaliou-se também a estabilidade das soluções-padrão de varfarina e PI.

As médias das respostas das amostras teste foram comparadas com aquelas obtidas para as amostras recém-preparadas e verificou-se o grau de degradação.

3.2.5.1 Estabilidade Após Ciclos de Congelamento e Descongelamento

A estabilidade do processo de congelamento e descongelamento das amostras biológicas foi determinada após 3 ciclos de congelamento e descongelamento e o teste foi realizado a uma temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Preparou-se volume suficiente de controles de qualidade, nos três níveis de concentração, para seis repetições. Todas as amostras foram congeladas e executou-se os ciclos de congelamento e descongelamento, considerando que para o conjunto 1 procedeu-se um ciclo, para o conjunto 2 procedeu-se dois ciclos e para o conjunto 3 procedeu-se três ciclos. O período da primeira etapa de congelamento foi de 24 horas, as demais foram de 12 a 24 horas. No último degelo, após chegarem à temperatura ambiente, seis repetições foram analisadas juntamente com as amostras de curva de calibração e controles de qualidade recém preparadas.

3.2.5.2 Estabilidade Pós-Processamento

A estabilidade do princípio ativo e do padrão interno foi avaliada na temperatura de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, mesma temperatura do injetor automático, utilizando-se as amostras de controle de qualidade em seis repetições. As amostras teste preparadas em plasma foram descongeladas, extraídas e mantidas sob a temperatura definida para o ensaio por um período de 24 e 48 horas. Estas amostras foram armazenadas em refrigerador até o momento da análise.

Decorridos esses períodos as amostras recém preparadas e as teste foram analisadas e os resultados médios foram comparados.

3.2.5.3 Estabilidade de Curta Duração

Determinou-se a estabilidade de varfarina em matriz biológica durante o tempo e nas condições de análise, utilizando-se as amostras de controle de qualidade em seis replicatas. Inicialmente as amostras de controle de qualidade testes foram preparadas e fracionadas em dois conjuntos. Um conjunto foi extraído após seu preparo juntamente com uma curva de calibração a fresco e ao término dessa extração procedeu-se a análise

instrumental. Os resultados dessas amostras foram comparados com os obtidos das amostras de controles de qualidade teste mantidas em temperatura ambiente durante um período de 4 a 24 horas. O período total do teste foi definido entre o término do preparo dos controles testes em plasma e o início de sua extração depois de transcorrido um período do teste, sendo estas amostras mantidas em temperatura ambiente.

3.2.5.4 Estabilidade de Longa Duração

Amostras em plasma de voluntários podem ser armazenadas no mesmo período de execução do ensaio sem comprometer sua estabilidade. Determinou-se a estabilidade de longa duração utilizando-se amostras de controle de qualidade em seis replicatas, nos três níveis de concentração e mantidas a -70°C . Após o período de armazenamento estas amostras foram analisadas juntamente com amostras de curva de calibração e controles de qualidade recém preparados.

3.2.5.5 Estabilidade das Soluções-Padrão

Foram avaliadas as estabilidades da solução mãe e das soluções de trabalho tanto para varfarina quanto para o padrão interno. Para avaliar se a solução mãe não apresenta degradação significativa a mesma foi armazenada em refrigerador e transcorrido um período de teste as áreas de controles de qualidade originadas de diluições partindo dessa solução mãe foram comparadas com áreas obtidas de soluções recém preparadas. A avaliação da estabilidade das soluções de trabalho foi realizada em temperatura ambiente, assim as soluções aquosas dos controles de qualidades foram mantidas na bancada por um período de 6 a 24 horas e as áreas obtidas dessas soluções teste foram comparadas com áreas de soluções recém-preparadas.

O preparo de todas as soluções, teste e recém-preparadas para varfarina, foi semelhante para todas as preparações e cada qual originadas das soluções a serem avaliadas. Assim, todas as soluções foram diluídas em dez vezes a fim de se obter as amostras para proceder a análise cromatográfica. É importante destacar também que estas preparações também possuíam o padrão interno. A seguir estão descritos os volumes adicionados para cada solução.

Tabela 3.14 Preparação de amostras de curva de calibração e controles de qualidade a serem analisadas em listas de estabilidade em solução

<i>Concentração Final (ng/mL)</i>	<i>Solução de trabalho</i>		<i>Volume de Fase Móvel (µL)</i>	<i>Volume de PI (µL)</i>	<i>Fator de Diluição</i>
	<i>Alíquota (µL)</i>	<i>Concentração (ng/mL)</i>			
1.000,0	40,0	10.000,00	260,0	100,0	10,00
850,0	40,0	8.500,00	260,0	100,0	10,00
650,0	40,0	6.500,00	260,0	100,0	10,00
500,0	40,0	5.000,00	260,0	100,0	10,00
350,0	40,0	3.500,00	260,0	100,0	10,00
200,0	40,0	2.000,00	260,0	100,0	10,00
50,0	40,0	500,00	260,0	100,0	10,00
5,0	40,0	50,00	260,0	100,0	10,00
800,0	40,0	8.000,00	260,0	100,0	10,00
400,0	40,0	4.000,00	260,0	100,0	10,00
15,0	40,0	150,00	260,0	100,0	10,00

Diluyente: Acetonitrila:Água (80:20, v/v) com 0,0

Ao término desse procedimento realizou-se a análise instrumental. A média da resposta das amostras teste foi comparada com aquela obtida para as amostras recém-preparadas e foi verificando o grau de degradação.

3.2.6 Genotipagem

3.2.6.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído usando KIT *Promega Wizard Genomic DNA Purification* a partir de sangue total colhido em EDTA. Após extração, o DNA foi suspenso em solução de hidratação DNA *Reydration Solution* e armazenado a temperatura de 2 a 8 °C.

O procedimento de extração de DNA foi executado na ordem que se segue:

- ✓ Separou-se um número apropriado de ponteiras descartáveis em rack e tubos eppendorf de 2,0 mL para proceder a extração;
- ✓ Pipetou-se 300 µL da amostra em sangue total no tubo *eppendorf*;

- ✓ Adicionou-se 900 µL de solução de lise de células vermelhas (*Cell Lysis Solution*) Homogeneizou-se por inversão por 10 minutos à temperatura ambiente;
- ✓ Centrifugou-se a 16000 g por 1 minuto e o sobrenadante foi desprezado, restando somente o pellet ao fundo do tubo *ependorf*;
- ✓ Adicionou-se ao *ependorf* solução de lise de leucócitos (*Nuclei Lysis Solution*) e solução de precipitação de proteínas. Agitou-se em vórtex por 5 segundos;
- ✓ Centrifugou-se a 16000 g por 1 minuto e transferiu-se o sobrenadante contendo o DNA para um tubo *ependorf* identificado e contendo 300 µL de isopropanol concentrado. Homogeneizou-se a amostra por inversão 10 vezes;
- ✓ Centrifugou-se a 16000 g por 1 minuto e desprezou-se o sobrenadante deixando o *pellet* no fundo do tubo. Adicionou-se 300 µL de etanol 70% gelado e homogeneizou-se por inversão 10 vezes;
- ✓ Centrifugou-se a 16000 g por 1 minuto e cuidadosamente desprezou-se o etanol lentamente. Os tubos foram mantidos invertidos para baixo com a tampa aberta sob um papel absorvente limpo por 20 minutos para a completa evaporação do etanol;
- ✓ O DNA foi reidratado com solução de hidratação e armazenado a – 20 °C.

3.2.6.2 Genotipagem dos Polimorfismos *1, *2 e *3 do Gene CYP2C9

A investigação dos polimorfismos CYP2C9 *1, *2 e *3 foi feita pelo método de Reação em Cadeia Polimerase Multiplex, seguida de restrição enzimática simultânea com AvaII e NsiI. A identificação dos polimorfismos foi baseada nos fragmentos de PCR que no gel de agarose os resultados do polimorfismo CYP2C9*2 gera um produto

de PCR de 253 pb que ao ser digerido pela enzima *AvaII* resulta em três fragmentos de 171 pb, 60 pb e 20 pb para o alelo selvagem, *1, enquanto dois fragmentos de 253 pb e 22 pb são obtidos para o alelo mutante, *2. No estudo do polimorfismo do *CYP2C9**3 o produto de PCR gera um fragmento de 124 pb que, ao ser digerido pela enzima *NsiI* resulta em fragmentos de 104 pb e 20 pb para o alelo selvagem, *1, e o alelo mutante, *3, não é digerido, permanecendo com um fragmento de 124 pb.

Na figura a seguir está apresentado um esquema de resultados para os possíveis polimorfismos no gel de agarose.

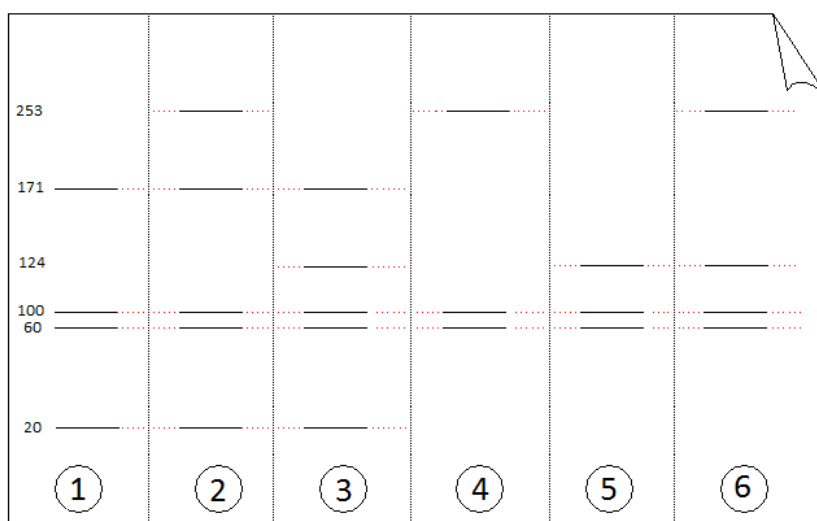


Figura 3.10 Representação dos resultados para os diferentes alelos do gene *CYP2C9* no gel de agarose, 1) *CYP2C9**1*1, 2) *CYP2C9**1*2, 3) *CYP2C9**1*3, 4) *CYP2C9**2*2, 5) *CYP2C9**3*3 e 6) *CYP2C9**2*3.

A enzima de restrição *Ava II* reconhece e cliva a sequência 5'- G|GTCC – 3' e a *Nsi I* a sequência 5'- ATGCA|T – 3'.

O alelo selvagem *CYP2C9**1 do gene *CYP2C9*, situado no cromossomo 10 (WADELIUS, M., 2007), tem 100% de atividade enzimática, sendo denominado de amplo metabolizador. O alelo *CYP2C9**2 consiste na transição C416T no exon 3,

levando a substituição Arg144Cys. A transversão A1061C no exon 7 gera a variação Ile359Leu, característica do alelo CYP2C9*3 (Taube J, 2000; Tassies D, 2002). Estes alelos CYP2C9*2 e *3 são considerados metabolizadores lentos, por apresentarem, respectivamente, cerca de 12% e 5% da atividade enzimática sobre a varfarina. Consequentemente, estão associados ao risco de hemorragia em situações de alterações de medicação e intercorrência de doenças, particularmente se houver metabolismo competitivo no complexo CYP2C9 (TAUBE, J., 2000).

3.2.6.3 Genotipagem dos Polimorfismos 1639GG e 1639GA do Gene VKORC1

A genotipagem do polimorfismo 1639GG e 1639GA foi realizada pelo método da Reação em Cadeia Polimerase em tempo real. O preparo da amostra, depois de realizada a extração, é baseado na diluição em 10 vezes em água em presença de soluções provenientes de kits contendo *primer* iniciador do sequenciamento e sondas com grupo fluoróforo. Assim, a preparação é transferida para *plate* e analisada no sistema de PCR em tempo real.

O ensaio realizado é do tipo *TaqMan*, utilizando duas sondas contendo grupamentos fluoróforos ligados às bases nitrogenadas de G (guanina) ou A (adenina), respectivamente. Quando a base G ou A liga-se a fita simples, ao realizar os ciclos da PCR para a amplificação dos fragmentos de DNA, são liberados os grupos que emitem fluorescência, os quais estão associados ao pareamento das bases. Pode ser observado na Figura 3.11 a seguir a composição inicial do sistema com a fita de DNA a ser investigada, as duas sondas com os grupos fluoróforos e os *primers*. Após a desnaturação da fita de DNA o primer e a DNA polimerase iniciam o pareamento das bases nitrogenadas à fita simples. Conforme este exemplo, quando a base guanina, G,

presente na sonda é pareada a base citosina, C, da fita de DNA o grupo fluoróforo, identificado como V, é liberado, este emite fluorescência e o sinal é detectado.

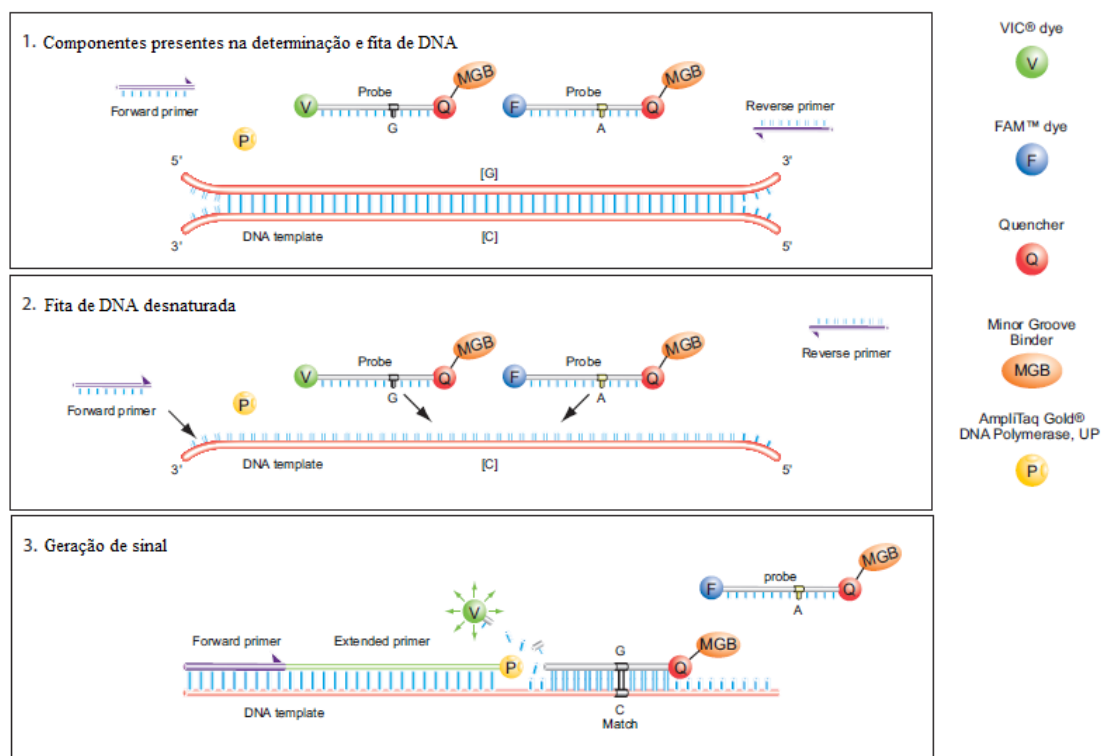


Figura 3.11 Reação da PCR-TR e liberação do grupo fluoróforo.

Os resultados obtidos são apresentados na forma de gráficos, os quais são construídos por intensidade de fluorescência em função do tempo de análise. Os gráficos típicos para os três polimorfismos para VKORC1, 1639AA, 1639GG e 1639GA, determinados pela técnica de PCR em tempo real especificada anteriormente, estão apresentados na Figura 3.12 a seguir.

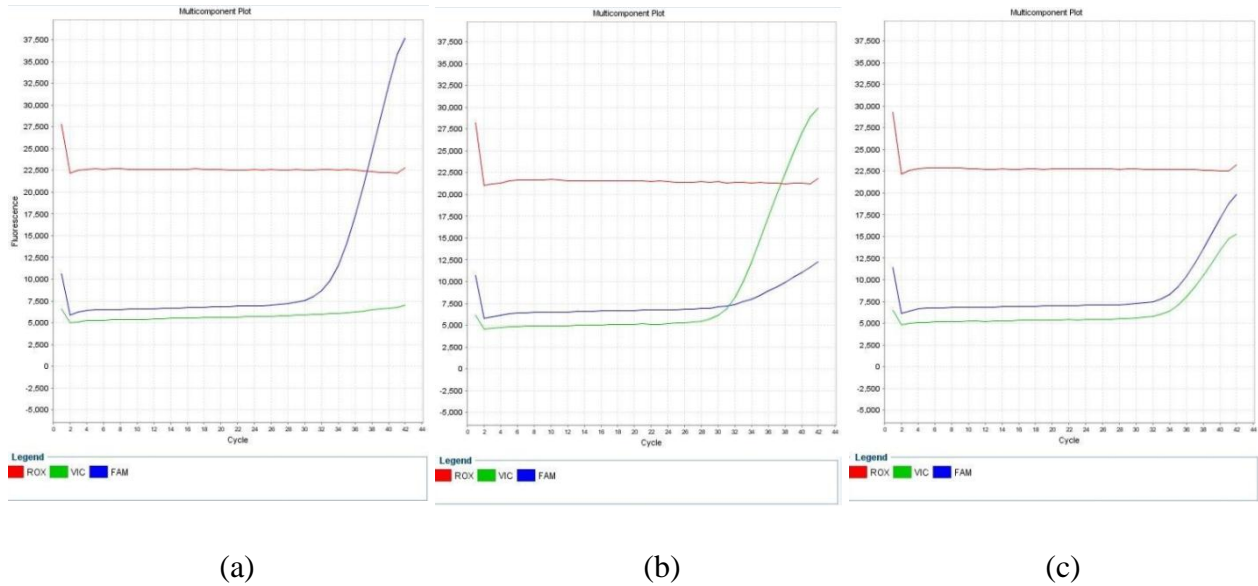


Figura 3.12 Resultados gráficos dos possíveis polimorfismos do gene VKORC1 por PCR em tempo real, a) 1639AA, b) 1639GG e c) 1639GA.

Os gráficos em vermelho é um controle o qual confirma o correto funcionamento do equipamento para detectar a emissão dos grupos fluoróforos. O sinal em azul é para o grupo relativo à base nitrogenada A e o verde relativo à base G.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo de Bioequivalência foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com código “SPH 28/09” e teve seu início nas dependências do Centro Clínico, Synchrophar. Neste Centro, localizado na cidade de Americana, São Paulo, foi realizada a administração dos medicamentos teste e referência. O estudo foi conduzido com 31 voluntários do sexo masculino e foram feitas verificações da pressão arterial, temperatura e frequência cardíaca em horários pré estabelecidos. Foram relatados eventos adversos observados e/ou obtidos mediante perguntas gerais ou declarados espontaneamente. Os intervalos de coleta das amostras foram pré determinados com base em publicações e no perfil farmacocinético da varfarina. O doseamento das amostras foi realizado nas dependências do Departamento de Bioequivalência do Instituto Hermes Pardini com equipe composta por técnicos em química e especialistas experientes e qualificados. A avaliação da genotipagem foi feita no setor de Genética Humana do Instituto Hermes Pardini e o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa possui o código “SPH 050/09”.

4.1 Doseamento de Varfarina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

No Departamento de Bioequivalência do Instituto Hermes Pardini, centro analítico habilitado pela ANVISA, foi realizada a quantificação do fármaco varfarina em plasma humano. Essa etapa compreendeu o desenvolvimento, a validação da metodologia bioanalítica e a quantificação das amostras de voluntários participantes do estudo de Biodisponibilidade relativa / Bioequivalência. As duas substâncias analisadas, varfarina e o padrão interno, *p*-cloro-varfarina, foram extraídas de plasma humano em

meio ácido, analisadas por CLAE-MS/MS e o método dos mínimos quadrados ponderado foi utilizado para estimar os coeficientes linear e angular das curvas de calibração.

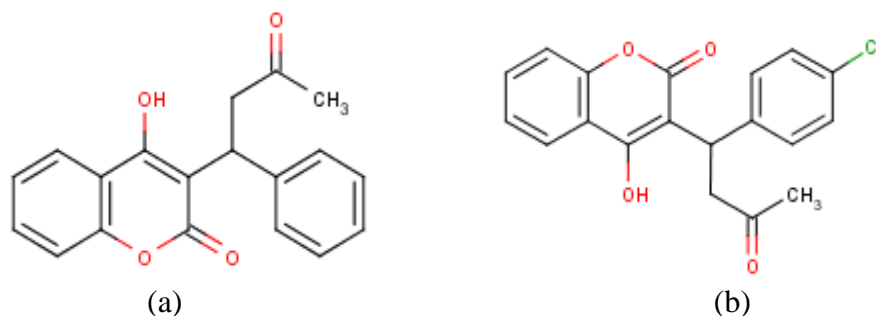


Figura 4.13: Estruturas químicas do analito, (a) varfarina, e do padrão interno, (b) *p*-cloro-varfarina.

É importante que os métodos bioanalíticos validados sejam precisos e exatos para aplicar os mesmos procedimentos padronizados na quantificação das amostras desconhecidas dos estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Dessa forma, é imprescindível que não haja interferências que possam comprometer os resultados de análise. Para isso são realizados testes para comprovar a seletividade e especificidade. Além disso, o método de extração deve apresentar uma recuperação com coeficiente de variação inferior a 20% para alíquotas de mesma concentração, conforme preconizado pelo órgão regulador.

4.2 Método Bioanalítico

4.2.1 Seletividade e Especificidade

Após a otimização e seleção dos parâmetros de análise em MRM no equipamento, a partir da infusão direta de soluções padrão no espectrômetro de massas, foram obtidos espectros de massas para varfarina e *p*-cloro-varfarina. Os espectros apresentados a seguir são os que apresentaram maiores intensidades dos íons filho após fragmentação dos íons precursores, com $[M+1]$ relativo a cada uma das substâncias moleculares analisadas. As transições utilizadas na quantificação das amostras no modo

de reações múltiplas foram de $309,27 > 163,0$ e $342,9 > 162,8$ para varfarina e *p*-cloro-varfarina, respectivamente. As figuras 4.14 e 4.15 apresentam os espectros de fragmentação obtidos para ambas as substâncias.

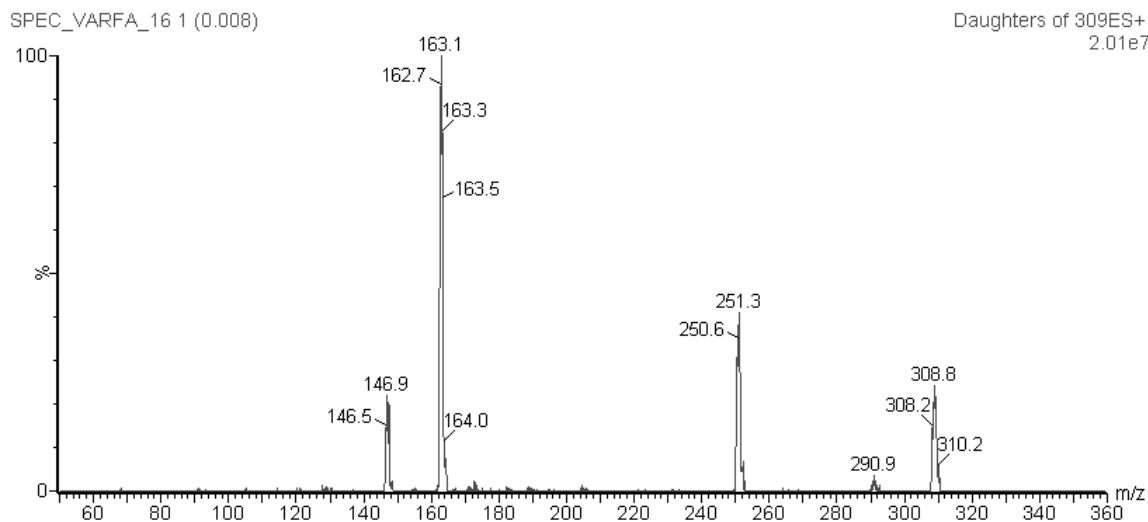


Figura 4.14 Padrão de fragmentação de varfarina e estrutura sugerida do fragmento principal

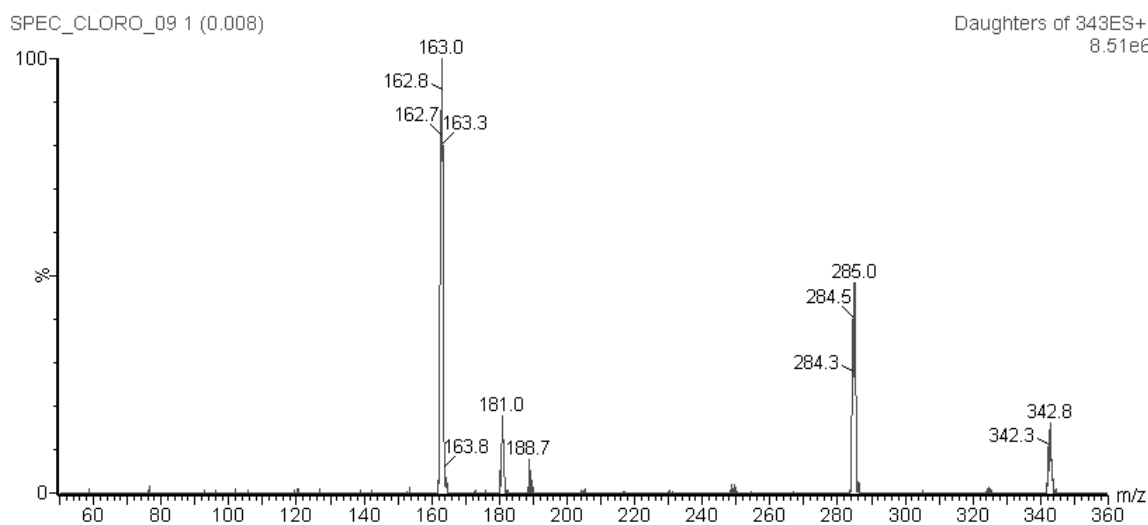


Figura 4.15 Padrão de fragmentação de *p*-cloro-varfarina e estrutura sugerida do fragmento principal

A análise cromatográfica para cada amostra extraída em plasma obtém dois resultados de área no cromatograma, um para o analito varfarina e outro para o padrão interno, *p*-cloro-varfarina, como apresentado na figura a seguir. E considerando a proporcionalidade entre área cromatográfica e concentração, os menores valores de área

obtidos nas análises para o analito foram nas amostras de LIQ com concentração de 5,0 ng/mL, desconsiderando falhas no processo de extração e análise.

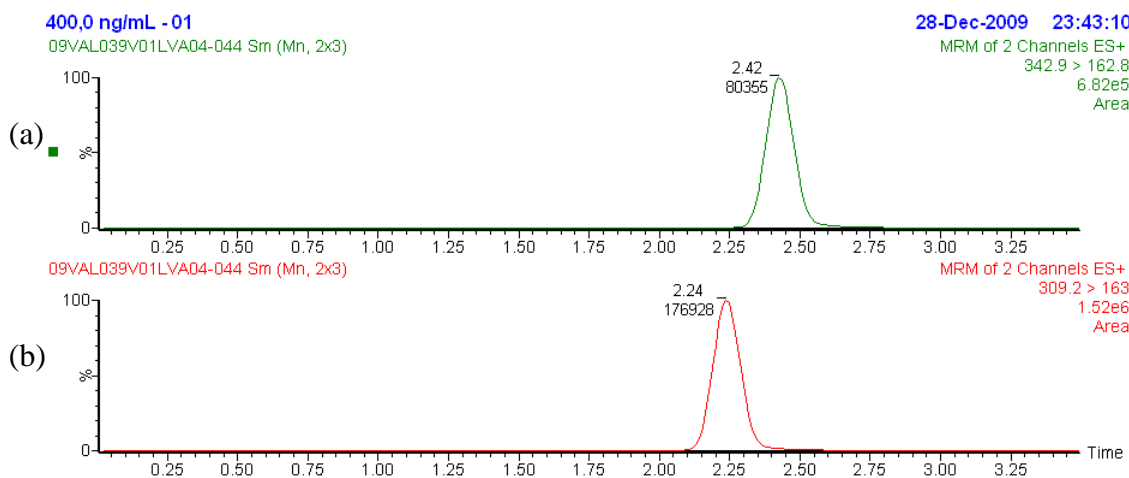


Figura 4.16 Cromatogramas obtidos por CLAE-EM/EM para padrão interno, (a) *p*-cloro-varfarina 342,9 > 162,8; e analito, (b) varfarina 309,27 > 163,0.

Antes de executar qualquer ensaio bioanalítico, é importante verificar se as bolsas de plasma selecionadas para o desenvolvimento e validação do método bioanalítico são isentas de interferências no mesmo tempo de retenção do analito e padrão interno, tempos de 2,24 e 2,42 minutos, respectivamente. É importante ressaltar que na resolução publicada pela ANVISA é aceito valor de interferência inferior a 20% da área do pico cromatográfico relativo ao LIQ, para o analito, e de 5% da área do padrão interno. Assim, amostras de quatro bolsas de plasma normal, uma lipêmica e uma hemolisada foram extraídas e analisadas. Seus cromatogramas estão apresentados a seguir e não foi possível verificar presença de interferentes nos tempos de retenção das substâncias analisadas em nenhuma das bolsas de plasmas selecionadas para realizar o estudo.

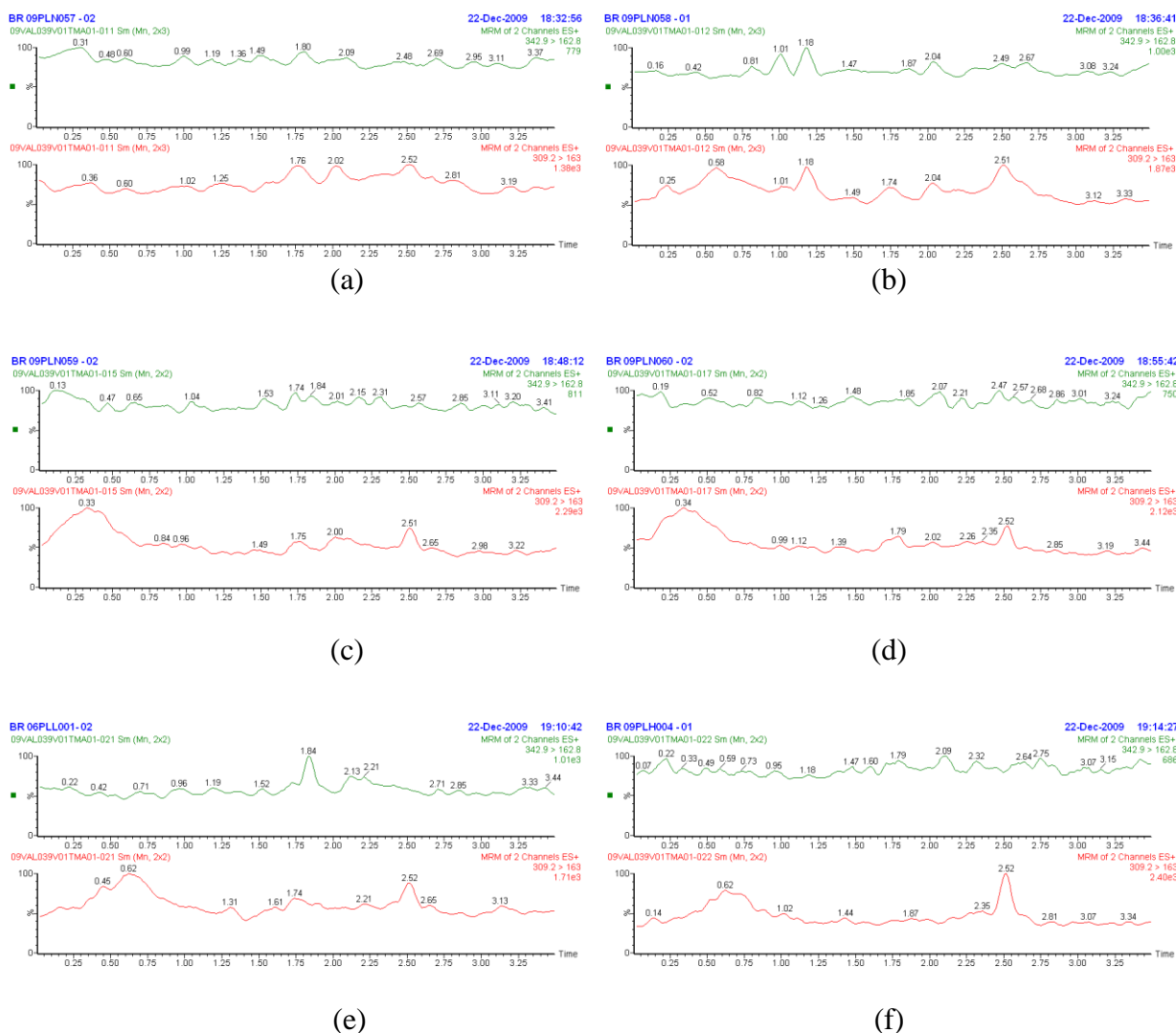


Figura 4.17 Cromatogramas obtidos por CLAE-EM/EM para amostras brancas de bolsas de plasma normal, (“a”, “b”, “c” e “d”), amostras brancas de bolsa de plasma lipêmico (e) e bolsa de plasma hemolisado (f).

Também foi realizado um teste específico para avaliar possíveis interferências no espectrômetro de massas, denominado de Teste de Interferência Iônica. O referido ensaio é obtido a partir da injeção de uma amostra extraída de plasma branco e infusão constante e direta no detector de uma preparação aquosa contendo concentrações conhecidas de varfarina e padrão interno. Na figura a seguir há o esquema de uma montagem do sistema com uma conexão em “T” unindo o fluxo do cromatógrafo líquido e o fluxo da bomba infusora ao *probe* do Espectrômetro de Massas.

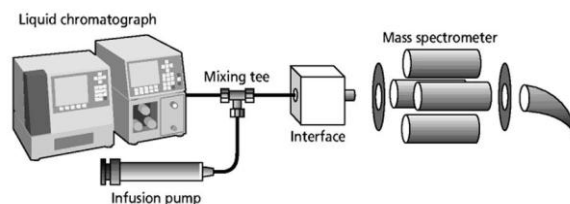
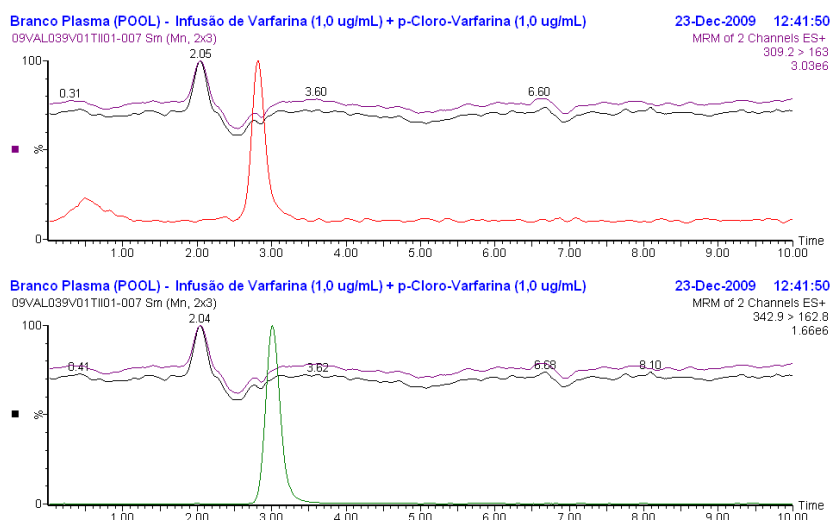


Figura 4.18 Modelo do Teste de Interferência Iônica

O sinal de supressão no espectrômetro de massas (supressão do íon) pode ser causado por contaminantes, por exemplo, sais, proteínas, aminoácidos, por interferentes na cromatografia líquida que eluem ao mesmo tempo em que o analito/padrão interno de interesse, uso de extração não específica, variabilidade na ionização dos compostos, entre outras possibilidades.

Para investigar se há efeito da supressão iônica no espectrômetro de massas no sinal do analito, varfarina, ou no padrão interno, *p*-cloro-varfarina, foram avaliados os cromatogramas provenientes das injeções de brancos de plasmas normal, lipêmico e hemolisado com infusão de uma solução contendo ambas as substâncias. Pode-se perceber que nos cromatogramas a seguir, Figura 4.19, estão apresentadas as injeções sobrepostas das amostras de brancos de plasmas com a injeção de uma amostra de Limite Inferior de Quantificação, esta para indicar o tempo de retenção do analito e do padrão interno.



(a)

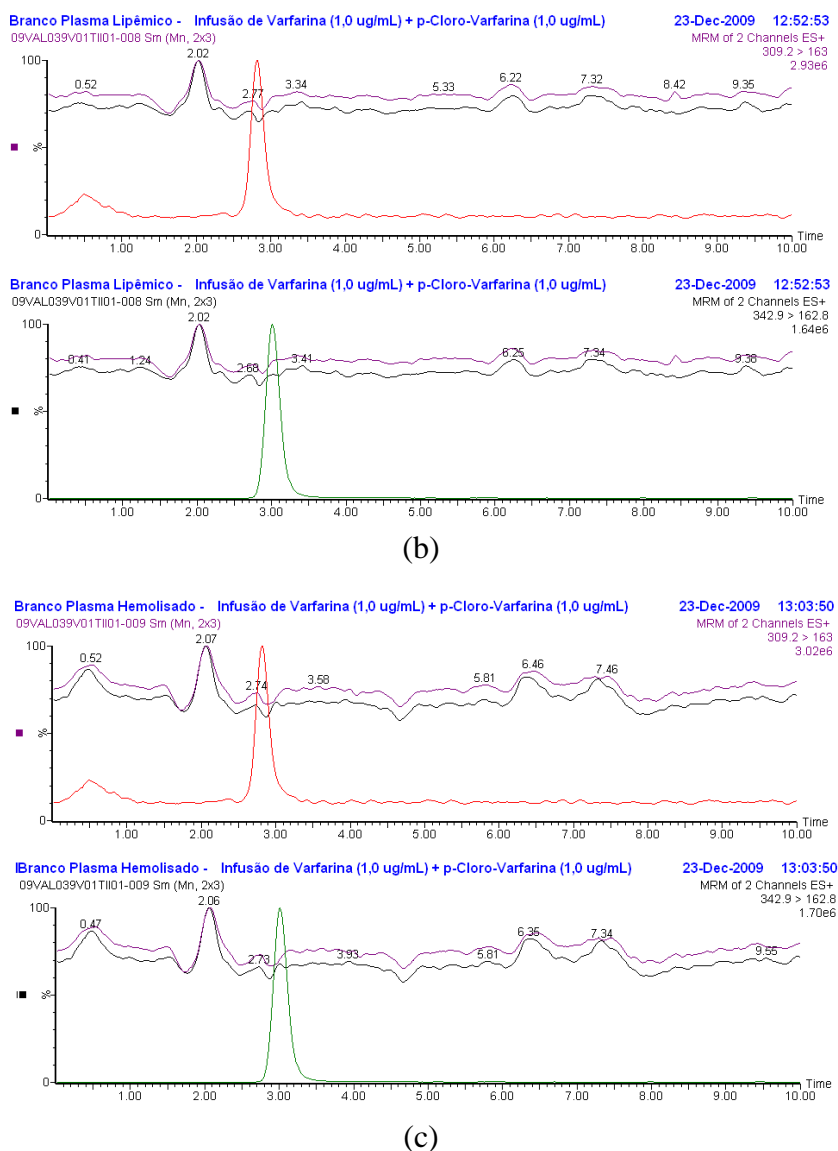


Figura 4.19 Cromatogramas do Teste de Interferência Iônica com sobreposição de cromatogramas de LIQ e (a) branco de pool de plasma normal (b) branco de plasma lipêmico e (c) branco de plasma hemolisado, todos analisados sob infusão de solução de varfarina (309,2 > 163) e *p*-cloro-varfarina (342,9 > 162,8) ambas na concentração de 1 µg/mL.

Os cromatogramas em vermelho e em verde nas Figuras 4.20 (a) (b) e (c) correspondem ao analito e padrão interno, respectivamente, da injeção de LIQ com infusão de solução diluente. Sobrepostos a estes cromatogramas estão apresentados também os cromatogramas obtidos de amostras extraídas de plasmas brancos (normal,

lipêmico e hemolisado) com infusão de uma solução contendo varfarina e *p*-cloro-varfarina, cromatogramas em roxo e em cinza, respectivamente. Analisando estes cromatogramas, pode-se perceber uma supressão positiva em um tempo de retenção inferior aos dos compostos para ambos canais de transição, aproximadamente em 2,04 minutos. Entretanto, estas interferências identificadas não comprometem os resultados por estarem em tempos distintos das substâncias de interesse.

4.2.2 Recuperação

A recuperação do analito foi calculada levando-se em conta as medidas de área para cada um dos níveis de concentração e a recuperação do padrão interno, também considerando as medidas de áreas, foi avaliada nas mesmas amostras analisadas na lista de recuperação. Assim, o método de extração líquido-líquido, desenvolvido utilizando acetato de etila como solvente de extração, proporcionou significativa percentagem de recuperação real média para varfarina (90,6%) e para o padrão interno (88,7%) com valores de precisão e exatidão nos três níveis de concentração estudados dentro dos critérios preconizados.

Tabela 4.15 Determinação da recuperação real do procedimento de extração líquido-líquido das amostras de plasma para varfarina e *p*-cloro-varfarina

Concentração de varfarina (ng/mL)	Recuperação (%)	
	Varfarina (CV) %	<i>p</i> -Cloro-Varfarina (CV) %
15	93,0 (1,5*)	89,9 (2,3*)
400	87,1 (6,6*)	84,2 (7,4*)
800	91,6 (4,9*)	91,9 (6,0*)
Média	90,6 (3,4)	88,7 (4,5)

*: coeficiente de variação referente às amostras extraídas.

A recuperação absoluta para o analito e padrão interno também foi avaliada, é importante ressaltar que essa comparação é feita entre a média das mesmas amostras extraídas, relativas à comparação anterior, e a média das amostras em solução.

Tabela 4.16 Determinação da recuperação absoluta do procedimento de extração líquido-líquido das amostras de plasma para varfarina e *p*-cloro-varfarina

Concentração de varfarina (ng/mL)	Recuperação (%)	
	Varfarina (CV) %	<i>p</i> -Cloro-Varfarina (CV) %
15	89,3 (1,5*)	90,2 (2,3*)
400	85,0 (6,6*)	81,8 (7,4*)
800	97,8 (4,9*)	93,9 (6,0*)
Média	90,7 (7,2)	88,6 (7,0)

*: coeficiente de variação referente às amostras extraídas.

Os resultados médios obtidos para as duas avaliações foram muito próximos, para varfarina foram de 90,6% e 90,7%, e para *p*-cloro-varfarina foram de 88,7% e 88,6%, para a recuperação real e absoluta, respectivamente.

4.2.3 Método dos Mínimos Quadrados Ponderado

Durante a etapa de validação do método bioanalítico, conforme definido em documentos no Departamento de Bioequivalência do HP, foram extraídas seis curvas de calibração e, com os resultados obtidos, determinou-se o melhor modelo para o conjunto de dados. Todas essas amostras compõem uma corrida analítica denominada Curva em Plasma (CPL). Considerando tal definição, o modelo de regressão foi padronizado para todas as outras curvas de calibração analisadas, tanto para as da validação quanto para as dos estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.

Assim, estão apresentados nesse trabalho os resultados obtidos na corrida analítica denominada de “Curva em Plasma”, composta por seis curvas de calibração

com concentrações extraídas em duplicata totalizando um número de 96 amostras, a discussão para a escolha dos melhores modelos de regressão linear e os parâmetros de desempenho analítico. É importante salientar que a variável resposta, y , é a razão entre a área obtida do cromatograma do analito de interesse pela do cromatograma do padrão interno, e a variável explicativa, x , é a concentração nominal do analito. Então, para obter o valor da variável resposta, y_i , conforme cromatograma presente na Figura 4.16, basta calcular a razão da área do analito, 176.928, pela área do padrão interno, 80.355.

Na Tabela 4.17 estão apresentados os resultados da razão entre as duas áreas para seis curvas de calibração, sendo que para cada valor de concentração as amostras foram extraídas em duplicata. Esses resultados foram utilizados para escolher o melhor modelo de regressão.

Tabela 4.17 Variável resposta da razão entre área de VAR pela área de p -VAR para determinação do modelo de regressão

Concentração ng/mL	Curva de calibração					
	1	2	3	4	5	6
5,0	0,0242	0,0243	0,0238	0,0223	0,0239	0,0230
	0,0244	0,0244	0,0225	0,0217	0,0226	0,0232
50,0	0,2568	0,2666	0,2522	0,2421	0,2424	0,2384
	0,2678	0,2577	0,2485	0,2510	0,2336	0,2355
200,0	0,9860	0,9947	0,9848	0,9660	0,8276	0,8388
	1,0038	1,0111	0,9933	0,9671	0,8091	0,8309
350,0	1,7027	1,7479	1,6865	1,6746	1,6001	1,6172
	1,7427	1,7228	1,7728	1,6652	1,6475	1,5995
500,0	2,5333	2,4214	2,4012	2,2862	2,2925	2,2603
	2,5450	2,4466	2,3399	2,2712	2,3364	2,2824
650,0	3,0785	3,1521	3,0064	3,0060	2,9542	2,9802
	3,0377	3,2848	3,0695	2,9380	3,1397	2,9029
850,0	3,8431	4,1037	3,7283	3,6300	3,8873	3,7272
	3,8952	3,9647	3,8666	3,7041	3,8605	3,7868
1000,0	4,3951	4,7042	4,4850	4,4115	4,5280	4,3958
	4,3794	4,7253	4,3524	4,3801	4,5207	4,4626

4.2.3.1 Ajuste de Modelos de Regressão

Executando os cálculos desses valores utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários MMQO, resultados apresentados a seguir, foi possível perceber que não é um modelo indicado para linearizar estes dados por obter desvios relativos,

em relação às concentrações nominais, muito superiores aos critérios determinados pela resolução RE 899. Os resultados mais críticos foram os valores de concentrações calculados e respectivos desvios relativos muito superiores ao intervalo de $\pm 20\%$ para o LIQ, impossibilitando a utilização desse modelo.

Análise de Regressão – Modelo Não-Ponderado

A equação da regressão é:

$$y = 0,0529315 + 0,00449117x$$

Preditor	Coeficientes	Desvio Padrão	T	P
Constante	0,05293150	0,01720766	3,076	0,003
x	0,00449117	0,00003042	147,64	0,000

S = 0,101921	R ² = 99,6%	R ² (ajustado) = 99,6%
--------------	------------------------	-----------------------------------

Análise de Variância

Fonte	DF	SQ	MQ	F	P
Regressão	1	226,4405	226,4406	21798,65	0,000
Erro	94	0,976455	0,010388		
Total	95	227,4170			

Também é importante destacar que no gráfico dos resíduos padronizados *versus* a variável x (Figura 4.20) fica claro que a variância das observações está crescendo com a concentração, caso de heterocedasticidade na forma de funil. Também é importante destacar que no teste F, o qual foi aplicado para avaliar a diferença entre as variâncias do LIQ com a do LSQ, o valor calculado para esses dados de 17597,58 foi um resultado muito maior que o F_{tab} , com valor de 2,82, indicando diferença significativa entre as variâncias dos valores extremos da faixa linear.

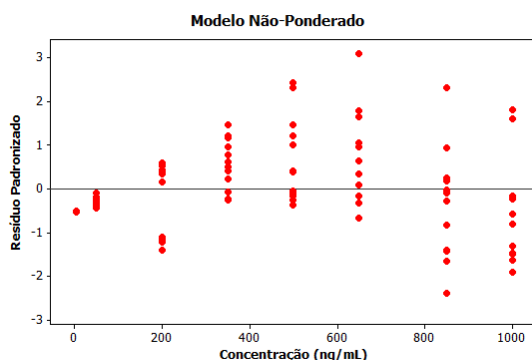


Figura 4.20 Dispersão de resíduos padronizados obtida no modelo não padronizado

Dessa forma, é indicado utilizar a análise de regressão ponderada para estabilizar a variância desse modelo. Executando os cálculos em planilha elaborada no *software*

Excel para os dados presentes na Tabela 4.17 foram obtidos os seguintes resultados para os diferentes fatores de ponderação.

Tabela 4.18 Resultados do ajuste dos modelos de regressão linear ponderado para os dados da Tabela 4.17

Fator de Ponderação	$\hat{\beta}_0$	$\hat{\beta}_1$	r^a	SER% ^b
$1/x$	0,0031435963	0,004601657	0,998832	540,63
$1/x^2$	0,0000493642	0,004691998	0,998179	433,73
$1/\sqrt{x}$	0,0142639254	0,004561519	0,998722	1082,67
$1/y$	0,0029840842	0,004592252	0,998852	534,77
$1/y^2$	0,0001162031	0,004661467	0,998164	437,16
$1/\sqrt{y}$	0,0139619438	0,004557893	0,998734	1068,46

a: Coeficiente de correlação de Pearson

b: SER%: Soma dos erros relativos percentuais

Supondo que o menor valor da soma dos erros percentuais, SER%, obtida pela expressão (2.13), seja um bom indicador do melhor modelo de regressão, nessa análise preliminar o melhor modelo é o ponderado por $1/x^2$. Entretanto, o valor obtido para o fator $1/y^2$ é bem próximo a esse e se compararmos os resultados obtidos nas ponderações construídas a partir da variável x também não identificamos valores tão diferentes. É importante também avaliar os gráficos de dispersão dos erros percentuais em função da concentração. Entretanto, conforme gráficos apresentados a seguir, a mesma distinção entre os resultados não foi obtida, pois as dispersões dos erros relativos percentuais, ER%, são semelhantes.

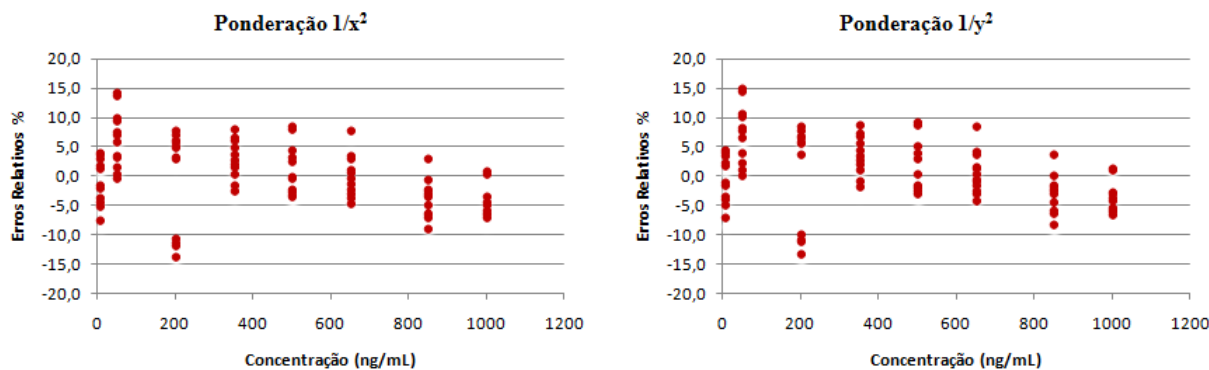


Figura 4.21 Dispersão dos erros relativos percentuais *versus* concentração para os dados de varfarina

Outra análise para a avaliação da homocedasticidade foi feita com os resíduos padronizados obtidos ao linearizar os mesmos dados com modelos ponderados pelos fatores: $1/x$, $1/x^2$, $1/y$ e $1/y^2$. Os fatores $1/\sqrt{x}$ e $1/\sqrt{y}$ não foram utilizados, pois estes apresentaram valores de SER% muito superiores aos demais. Na figura a seguir estão apresentados os gráficos dos resíduos padronizados *versus* concentração de varfarina para os fatores de ponderação selecionados.

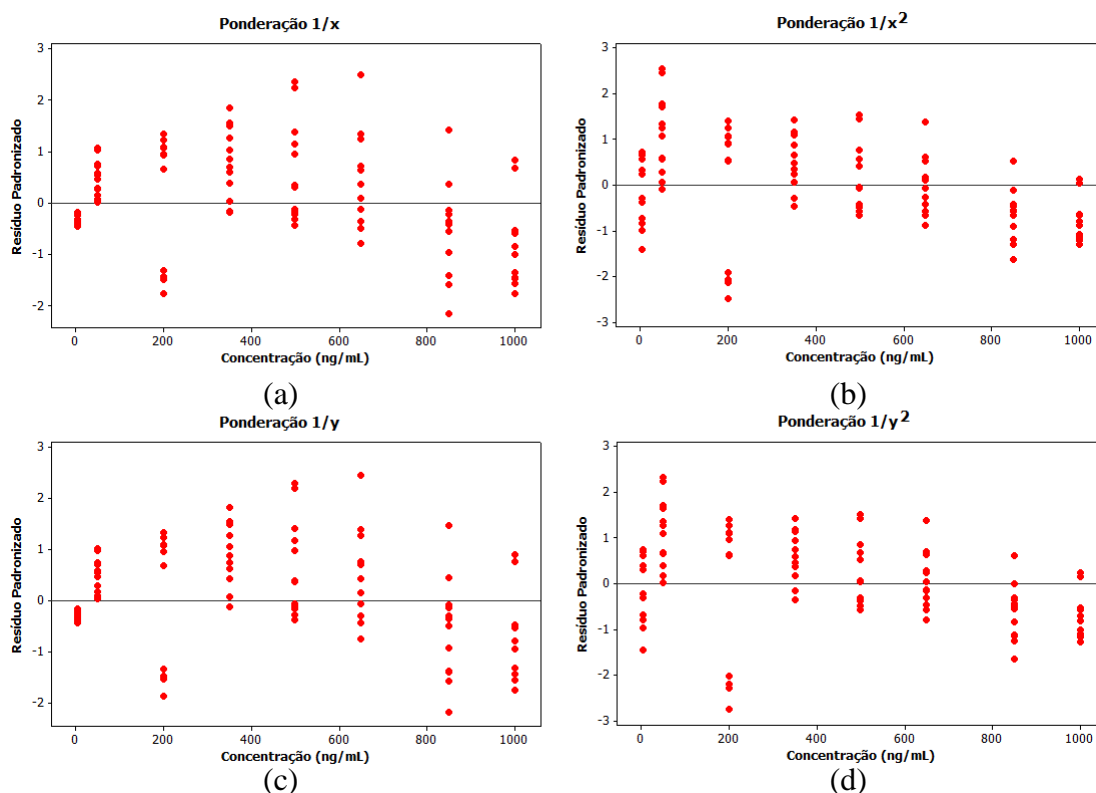


Figura 4.22 Dispersão dos resíduos padronizados *versus* concentração de varfarina em ng/mL, x , para modelos de regressão linear ponderados

As dispersões dos resíduos padronizados para os modelos ponderados por $1/x^2$ e $1/y^2$, Figura 4.22b e Figura 4.22d, respectivamente, são os que a homocedasticidade parece ser mais razoável por apresentar uma dispersão melhor distribuída em torno de zero.

E a estes dois grupos de resultados foi aplicado o teste de *Anderson Darling* (AD) para avaliar se os resíduos indicaram desvio de normalidade, considerando os níveis de significância usuais e valor crítico de 0,05. Vale ressaltar que os dados que mais se aproximam da distribuição normal no teste AD são aqueles que assumem

valores menores. Avaliando o teste AD para os resíduos com ponderação $1/x^2$ e $1/y^2$, 0,267 e 0,304, respectivamente, conclui-se que os resíduos com a ponderação $1/x^2$ são mais próximos da distribuição normal. Também observando os resultados para o p-valor, 0,681 e 0,565, respectivamente, conclui-se semelhantemente ao teste anterior.

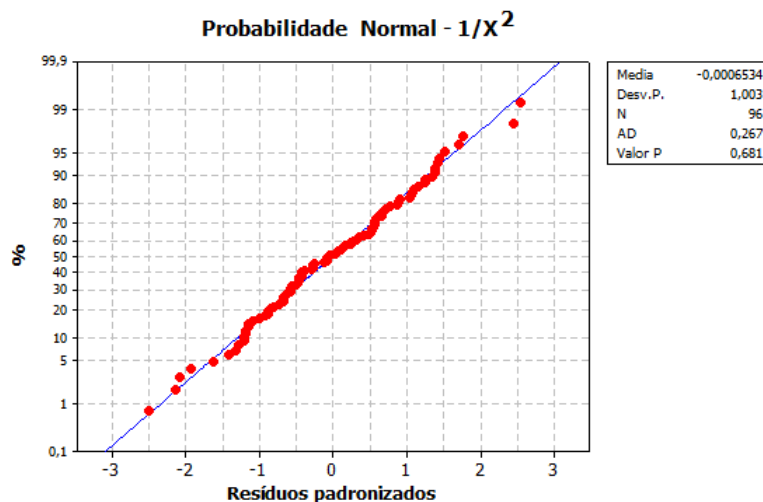


Figura 4.23 Gráfico de probabilidade normal e resultados do teste de normalidade de AD dos resíduos para o modelo de regressão linear ponderado pelo fator $1/x^2$

Assim, após avaliação dos resultados da Análise de Regressão desses modelos e comparação da soma dos erros relativos percentuais (ver Tabela 4.18) o fator de ponderação $1/x^2$ é o mais indicado para a quantificação dos dados na validação do método bioanalítico de varfarina e também para a quantificação das amostras desconhecidas nos estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.

A seguir, está apresentada a análise de variância para o modelo escolhido, ponderação por $1/x^2$.

Análise de Regressão – Modelo ponderado por $1/x^2$

A equação da regressão é:

$$y = 0,0000493642 + 0,004691998x$$

Preditor	Coefficientes	Desvio Padrão	T	P
Constante	0,0000494	0,0004114	0,12	0,905
x	0,0046920	0,00002925	160,42	0,000

S = 0,000261299

R² = 99,6%

R² (ajustado) = 99,6%

Análise de Variância

Fonte	DF	SQ	MQ	F	P
Regressão	1	0,0017570	0,0017570	25734,08	0,000
Erro	94	0,0000064	0,0000001		
Total	95	0,0017635			

O teste de hipótese nula para avaliar o coeficiente linear indica que a reta da regressão passa pela origem, $H_0 : \beta_0 = 0$, estatística p-valor de 0,905. No entanto, na prática é interessante estimar a variância amostral de valores próximos a zero uma vez que o valor de amostras brancas não é exatamente conhecido, mas apenas estimado. Além disso, é sabido que pontos próximos às extremidades do intervalo estarão sujeitos a oscilações maiores do que aqueles perto do centro da faixa de trabalho (SOUZA, SVC; 2005), assim é interessante que a equação seja estimada a partir dos valores sem fixar a origem em zero.

Então, a partir do modelo ajustado ($y = 0,0000493642 + 0,004691998x$), pode-se calcular as concentrações das amostras pela equação $x = (y - 0,0000493642)/0,004691998$. Os resultados de concentração, em ng/mL, para as respostas da Tabela 4.17 estão apresentados na Tabela 4.19. Estes resultados obtidos são os valores estimados, considerando o modelo ponderado pelo fator $1/x^2$.

Tabela 4.19 Concentrações de varfarina para as amostras da lista CPL, em ng/mL, obtidas a partir do modelo de regressão com fator de ponderação $1/x^2$.

Concentração ng/mL	Curva de calibração					
	1	2	3	4	5	6
5,0	5,15	5,18	5,07	4,74	5,09	4,90
	5,19	5,19	4,78	4,62	4,81	4,92
50,0	54,73	56,81	53,74	51,58	51,66	50,79
	57,06	54,92	52,95	53,49	49,77	50,19
200,0	210,14	212,00	209,88	205,87	176,37	178,76
	213,93	215,49	211,68	206,11	172,43	177,08
350,0	362,89	372,52	359,44	356,89	341,01	344,66
	371,40	367,16	377,81	354,89	351,12	340,88
500,0	539,91	516,07	511,75	487,25	488,58	481,73
	542,41	521,43	498,68	484,04	497,96	486,43
650,0	656,10	671,79	640,75	640,65	629,63	635,16
	647,41	700,07	654,19	626,15	669,15	618,69
850,0	819,07	874,60	794,59	773,64	828,47	794,36
	830,15	844,98	824,08	789,44	822,77	807,07
1000,0	936,72	1002,60	955,87	940,20	965,03	936,87
	933,36	1007,08	927,60	933,52	963,47	951,10

4.2.4 Precisão e Exatidão em Listas de Validação

O modelo de regressão linear ponderado por $1/x^2$ para quantificar as três listas de validação foi utilizado para determinar a exatidão e a precisão do método bioanalítico. Cada lista é composta por uma curva de calibração com oito concentrações preparadas em duplicatas e nove alíquotas de controles de qualidade em três níveis de concentração. As amostras padrão utilizadas para construir a curva de calibração estão apresentadas na Tabela 4.20, a seguir, juntamente com a exatidão e precisão para cada concentração. O coeficiente de correlação de *Pearson* para as três curvas também estão presentes nessa mesma tabela.

Tabela 4.20 Concentrações calculadas para as alíquotas das curvas de calibração nas Listas de Validação

Conc. Nominal (ng/mL)	Modelo de Regressão			$y = mx + b (1/x^2)$		
	Concentração obtida (ng /mL)			Média (ng /mL)	Exatidão (%)	Precisão (%)
	Nome da lista					
	LVA01	LVA02	LVA03			
5,0	4,83	4,90	5,05	4,98	99,6	2,7
	5,16	5,07	4,86			
50,0	51,59	51,28	53,43	51,76	103,5	3,7
	49,18	50,62	54,47			
200,0	191,25	208,37	216,59	208,71	104,4	4,5
	208,47	210,37	217,19			
350,0	361,40	358,76	355,32	357,28	102,1	0,7
	357,47	355,67	355,07			
500,0	504,10	492,13	504,12	500,89	100,2	1,0
	505,03	498,12	501,86			
650,0	633,44	647,15	635,04	640,21	98,5	2,4
	662,28	646,18	617,19			
850,0	832,16	833,01	802,27	822,44	96,8	2,7
	853,27	822,85	791,05			
1000,0	976,22	945,95	916,72	950,52	95,1	2,4
	963,34	968,64	932,23			
r =	0,999541	0,999535	0,998092	-	-	-

Uma representação gráfica está apresentada na figura a seguir e pode ser observado que a linearidade é adequada para a faixa de concentração proposta.

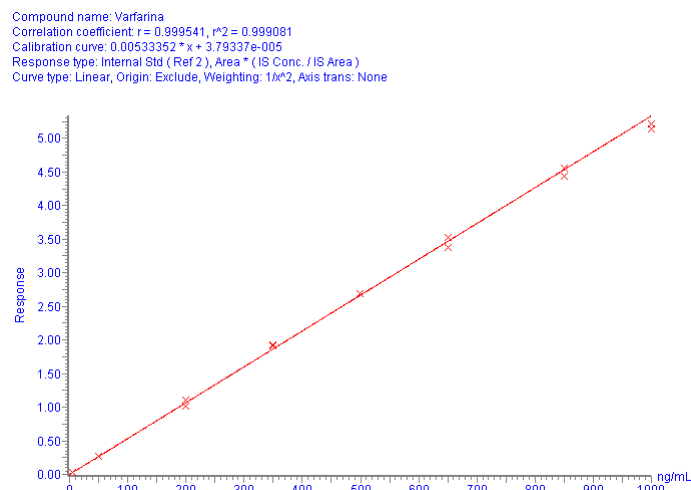


Figura 4.24: Curva de calibração de varfarina por CLAE-EM/EM e obtida pelo programa *MassLynx*, na faixa de 5,0 a 1000,0 ng/mL

Os resultados das alíquotas dos controles de qualidade, nas três concentrações, baixa, média e alta, estão apresentados na Tabela 4.21 e na tabela seguinte estão apresentados os resultados de exatidão e precisão nas mesmas listas de validação.

Tabela 4.21 Concentrações calculadas para as alíquotas dos três níveis de controles de qualidade em Lista de Validação do método bioanalítico de varfarina

Concentrações								
15,0 ng/mL			400,0 ng/mL			800,0 ng/mL		
<i>Listas</i>			<i>Listas</i>			<i>Listas</i>		
1	2	3	1	2	3	1	2	3
16,90	16,26	16,18	445,50	420,10	400,95	821,33	787,65	808,49
17,30*	16,08	16,33	468,33*	426,39	408,69	806,90	770,21	801,82
16,50	15,79	16,39	448,24	411,54	415,89	804,34	790,47	801,68
16,39	16,14	16,76	451,45	409,14	406,94	834,68	790,11	763,53
16,53	15,80	16,78	468,66*	418,45	441,70	798,92	800,85	762,87
14,51	16,12	15,98	412,33	409,60	413,10	807,24	805,17	823,09
16,88	15,87	20,00*	445,72	407,79	409,85	832,55	802,69	803,45
16,60	15,96	16,60	448,82	409,18	410,90	780,54	810,87	823,91
16,64	16,41	16,43	449,14	412,45	421,21	772,68	825,35	794,53

*: valor com desvio superior a $\pm 15\%$ em relação a concentração nominal

Tabela 4.22 Determinação de concentração, precisão e exatidão em Listas de Validação do método bioanalítico de varfarina

Concentração nominal (ng/mL)	Listas de Validação	Concentração calculada (ng/mL) ^a	Precisão (%)	Exatidão (%)
15,00	1	16,37	4,7	109,1
	2	16,05	1,3	107,0
	3	16,43	1,7	109,5
400,00	1	443,03	3,1	110,8
	2	413,85	1,5	103,5
	3	414,36	2,8	103,6
800,00	1	806,58	2,6	100,8
	2	798,15	2,0	99,8
	3	798,15	2,8	99,8

a: Média de nove alíquotas, considerando somente os valores dentro do desvio relativo menor que $\pm 15\%$

Conforme as normas preconizadas pelo órgão regulamentador os valores obtidos para a precisão do método não podem ser superiores a 15%, considerando os controles de qualidade de concentração baixa, média e alta, e um número mínimo de cinco replicatas devem estar dentro desse desvio. Os valores obtidos para a exatidão devem estar entre 85 a 115%, para os mesmos níveis de concentração avaliados. Assim, foi constatado que o método atende aos critérios de aceitação preconizadas na Resolução RE 899 da ANVISA, de 29 de maio de 2003.

Executando o mesmo cálculo de precisão e exatidão para todos os valores obtidos, avaliação inter-corridas, foi constatado que para cada nível de concentração, baixo, médio e alto, o método também atende às normas preconizadas. Os valores obtidos de precisão para os três níveis foram de 3,0; 4,0 e 2,4%, e de exatidão, 108,5; 105,6 e 100,1%, respectivamente.

Também foram avaliadas a precisão e a exatidão do limite inferior de concentração (LIQ) e do controle de qualidade diluído (CQD), nos valores de 5,00 ng/mL e 1600,00 ng/mL, respectivamente. Considerando estas concentrações de controles os resultados obtidos também atendem aos critérios de aceitação preconizados pela ANVISA.

Tabela 4.23 Determinação de precisão e exatidão das concentrações do LIQ e CQD em Listas de Validação do método bioanalítico de varfarina

Concentração nominal (ng/mL)	Listas de Validação	Concentração calculada (ng/mL) ^a	Precisão (%)	Exatidão (%)
5,00	1	5,52	2,2	110,3
	2	5,68	1,2	113,6
	3	5,53	3,3	110,6
1600,00	1	1517,18	2,9	94,8
	2	1637,81	1,3	102,4
	3	1526,38	1,4	95,4

a: Média de nove alíquotas, considerando somente os valores dentro do intervalo do desvio relativo de $\pm 15\%$

Os valores médios de precisão na avaliação inter-corridas para o LIQ e para o CQD foram de 2,7 e 4,0%, e exatidão de 111,3 e 97,5%, respectivamente.

4.2.5 Limite de Detecção

Conforme Resolução RE 899 da ANVISA, de 29 de maio de 2003, o limite de detecção é a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo. Esse parâmetro de validação pode ser determinado a partir do cálculo com os coeficientes de curvas de calibração, dos limites de confiança da curva de calibração ou até por uma análise de amostras de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável, levando em consideração a relação do sinal detectado da amostra com o ruído da linha de base.

Com os dados da lista Curva em Plasma e aplicando a expressão (2.5) foi possível determinar o limite de detecção com os valores dos coeficientes angular e linear das seis curvas em duplicatas, conforme cálculo apresentado a seguir.

Tabela 4.24 Estimativas dos parâmetros dos modelos de regressão linear ponderado

Curvas de Calibração	$\hat{\beta}_0$	$\hat{\beta}_1$	r*
1	0,00005443	0,00483939	0,998432
2	-0,00001668	0,00492158	0,999407
3	-0,00008513	0,00473052	0,998840
4	-0,00027334	0,00460506	0,998860
5	0,00025692	0,00456033	0,998867
6	0,00076859	0,00448316	0,999295
Média	0,00011747	0,00469001	
Desvio Padrão	0,00036308	0,00016994	

*: Coeficiente de correlação de Pearson

$$LD = \frac{3,6308 \times 10^{-4} \times 3}{0,00469001} = 0,2322 \text{ ng / mL}$$

Assim, o limite de detecção calculado a partir das curvas de calibração é de 0,2322 ng/mL.

Além dessa forma de determinar o limite de detecção, esse parâmetro também pode ser estimado a partir do limite de confiança superior obtido após quantificação dos mesmos dados amostrais. Ao aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários ponderado com o fator $1/x^2$ a equação linear obtida, considerando todas as casas decimais disponíveis no *software* Minitab, foi de:

$$y = 0,0000493642 + 0,004691998x$$

Assim, para calcular os limites inferior e superior do intervalo de confiança para o valor de x igual a 0,00, utilizado o mesmo *software*, os valores obtidos foram de, respectivamente, -0,0007674205 e 0,0008661489.

Conforme gráfico ilustrativo, Figura 2.8, o valor do limite de detecção é o valor em x quando y for igual ao limite de confiança superior, como indicado por um círculo. Dessa forma, o valor do limite de detecção é obtido a partir da equação da curva de calibração e é igual a 0,1741 ng/mL.

Para avaliar criteriosamente estes dois resultados seria interessante realizar a análise do pico cromatográfico para amostras extraídas em matriz biológica nessas duas concentrações. Em técnicas cromatográficas a análise da significância do pico

cromatográfico é feita pela comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz com a linha de base. A relação sinal-ruído pode ser de 2 ou 3 vezes superior ao ruído da linha de base, valores geralmente aceitos como estimativas do limite de detecção.

Entretanto, foi seguido o procedimento operacional que padronizou a primeira maneira como a oficial para a determinação dessa figura de mérito. É importante ressaltar que quando definida uma metodologia de execução, esta deve ser seguida para todos os métodos desenvolvidos, e não é recomendável aplicar outras metodologias sem antes definir como procedimento padrão.

4.3 Estudo de Estabilidade em Matriz Biológica e em Solução

A estabilidade de um fármaco em matriz biológica depende de suas propriedades químicas, do material de acondicionamento, do tempo e da temperatura de estocagem. Assim, os ensaios foram planejados e executados com a finalidade de simular as condições de manuseio e análise das amostras. Os resultados obtidos em cada teste do estudo de estabilidade foram comparados com os de amostras recém-preparadas, aceitando-se desvio de, no máximo, $\pm 15\%$.

4.3.1 Estabilidade após Ciclos de Congelamento/Descongelamento

Amostras de controles de qualidade baixo, médio e alto, em plasma foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento e analisadas ao final do terceiro ciclo. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.25. Ao comparar os valores médios obtidos das amostras teste com os das amostras fresco foi verificado que os processos de congelamento e descongelamento não causaram degradação dos fármacos no plasma, conforme indicado pelas taxas de variação obtidas.

Tabela 4.25 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento

Concentração nominal (ng/mL)	Amostra	Concentração calculada (ng/mL) ^a	CV (%)	Desvio (%)
15,00	Fresco	16,33	2,5	-6,6
	Teste	15,25	1,6	
400,00	Fresco	425,56	1,9	-4,6
	Teste	406,09	1,7	
800,00	Fresco	815,43	1,3	-4,3
	Teste	780,51	2,8	

a: Média de seis alíquotas

4.3.2 Estabilidade Pós-Processamento

A avaliação da estabilidade pós-processamento foi realizada mantendo-se amostras extraídas sob temperatura entre 2 °C e 8 °C, a qual é a mesma faixa de temperatura definida para o injetor automático. Assim, as amostras teste foram armazenadas por um período de 47 horas e 21 minutos, período que se inicia após o término da etapa de extração das amostras teste ao início da análise cromatográfica. De acordo com o indicado pelas taxas de variação é possível observar que não foram identificadas diferenças para nenhum dos três níveis de concentração.

Tabela 4.26 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade após período de pós-processamento de 47 horas e 21 minutos.

Concentração nominal (ng/mL)	Amostra	Concentração calculada (ng/mL) ^a	CV (%)	Desvio (%)
15,00	Fresco	16,33	2,5	1,9
	Teste	16,64	2,6	
400,00	Fresco	425,56	1,9	-2,8
	Teste	413,51	1,6	
800,00	Fresco	815,43	1,3	-3,4
	Teste	788,08	2,1	

a: Média de seis alíquotas

4.3.3 Estabilidade Curta Duração

As amostras de plasma contendo o fármaco permaneceram à temperatura ambiente, sendo em seguida submetidas ao processo de extração. A estabilidade de curta duração foi avaliada pelo período de 20 horas e 17 minutos. As concentrações foram comparadas com aquelas obtidas de amostras plasmáticas recém-preparadas, conforme demonstrado na Tabela 4.27, e verificou-se que não houve diferença entre as amostras “Teste” e “Fresco”, uma vez que os valores de desvio relativo foram inferiores a 15%.

Tabela 4.27 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de curta duração, com período de 20 horas e 17 minutos.

Concentração nominal (ng/mL)	Amostra	Concentração calculada (ng/mL) ^a	CV (%)	Desvio (%)
15,00	Fresco	17,03	2,4	0,9
	Teste	17,18	1,7	
400,00	Fresco	422,49	3,9	4,8
	Teste	442,71	2,5	
800,00	Fresco	795,54	3,4	4,4
	Teste	830,35	3,5	

a: Média de seis alíquotas

4.3.4 Estabilidade Longa Duração

O estudo de estabilidade de longa duração foi conduzido em amostras plasmáticas armazenadas em *freezer* a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, as quais foram congeladas e analisadas após período de 128 dias e 11 horas. A comparação entre as amostras “Teste” e “Fresco” para cada um dos três níveis de concentração está apresentada na Tabela 4.28. Assim, pode-se inferir que o fármaco se manteve estável no plasma durante este período e sob esta temperatura de armazenamento.

Tabela 4.28 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de longa duração, com período de 128 dias e 11 horas.

Concentração nominal (ng/mL)		Amostra	Concentração calculada (ng/mL) ^a	CV (%)	Desvio (%)
15,00	Fresco		15,94	2,2	-0,8
	Teste		15,81	1,6	
400,00	Fresco		386,49	5,8	4,6
	Teste		404,18	2,3	
800,00	Fresco		748,03	5,5	2,7
	Teste		767,86	0,7	

a: Média de seis alíquotas

4.3.5 Estabilidade em Solução Mãe

A estabilidade em solução mãe para varfarina foi avaliada entre duas preparações distintas diluídas em metanol, uma solução armazenada sob refrigeração, faixa de temperatura de 2 °C a 8 °C, e a outra solução preparada no dia da análise do estudo. Assim, para avaliar possível degradação da solução mãe no período de 128 dias foram diluídas as soluções de trabalho nos três níveis de concentração, em metanol:água (50:50, v/v), tanto provenientes da solução mãe armazenada sob refrigeração quanto da solução mãe recém-preparada. Levando-se em consideração a faixa de medição do detector, estas soluções de trabalho foram diluídas na mesma solução de ressuspensão utilizada no processo de extração, acetonitrila:água (80:20, v/v) com 0,20% de ácido fórmico, e em seguida analisadas no sistema cromatográfico. Os resultados obtidos entre as médias das áreas apresentados na Tabela 4.29 indicam que não houve diferença entre as preparações “Fresco” e “Teste”.

Tabela 4.29 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de solução mãe para varfarina preparada em metanol, com período de 128 dias.

Concentração nominal (ng/mL)	Amostra	Média em área ^a	CV (%)	Desvio (%)
15,00	Fresco	6995,67	2,8	-10,2
	Teste	6284,67	2,8	
400,00	Fresco	168910,67	4,4	-8,8
	Teste	153975,17	2,2	
800,00	Fresco	313617,33	1,3	-8,8
	Teste	286003,83	2,3	

a: Média de seis alíquotas

O estudo de estabilidade da solução mãe de *p*-cloro-varfarina foi avaliado de maneira semelhante e nas mesmas condições de armazenamento das soluções de varfarina, durante 44 dias. Os resultados apresentados na Tabela 4.30 indicam que não houve diferença significativa entre as amostras por apresentar desvio relativo inferior a 15%

Tabela 4.30 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de solução mãe de *p*-cloro-varfarina preparada em metanol, com período de 44 dias.

Concentração nominal (ng/mL)	Amostra	Média em área ^a	CV (%)	Desvio (%)
100,00	Fresco	42030,50	2,6	-13,7
	Teste	36291,17	3,2	

a: Média de seis alíquotas

No momento da aprovação do teste durante a etapa de validação do método bioanalítico o critério de aceitação era de 15%, considerando a comparação entre as amostras “Fresco” e “Teste”. Entretanto, no Art. 43 da consulta pública nº 33, de 28 de

junho de 2011, publicado pela ANVISA, “as soluções serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 10% (dez por cento) do valor obtido das soluções recém preparadas.” Dessa forma, se o método bioanalítico estivesse sendo avaliado atualmente, por cautela, os períodos dos estudos de estabilidade para ambas soluções mãe deveriam ser menores para atender ao critério de aceitação de 10% de variação.

4.3.6 Estabilidade em Solução de Trabalho

Para avaliação da estabilidade de soluções de trabalho foram preparadas soluções do fármaco em metanol:água (50:50, v/v) de concentração dez vezes maior que as preparações em matriz biológica. Essas soluções permaneceram em temperatura ambiente por um período de 22 horas e 5 minutos, diluídas por 10 vezes em acetonitrila:água (80:20, v/v) com 0,20% de ácido fórmico e em seguida analisadas no sistema cromatográfico. Os resultados médios das áreas para cada um dos níveis de concentração foram comparados com resultados provenientes das soluções recém-preparadas e foi possível inferir que não houve degradação das soluções de trabalho nas condições do estudo de estabilidade.

Tabela 4.31 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade das soluções de trabalho de varfarina por período de 22 horas e 5 minutos.

Concentração nominal (ng/mL)	Amostra	Média em área ^a	CV (%)	Desvio (%)
15,00	Fresco	6995,67	2,8	-7,3
	Teste	6481,83	6,0	
400,00	Fresco	168910,67	4,4	-7,8
	Teste	155759,33	1,4	
800,00	Fresco	313617,33	1,3	-5,3
	Teste	296887,00	1,8	

a: Média de seis alíquotas

A avaliação do estudo de estabilidade das soluções de trabalho de *p*-cloro-varfarina foi executada de maneira semelhante e nas mesmas condições de armazenamento das soluções de varfarina, pelo período de 18 horas e 55 minutos. Os resultados apresentados na Tabela 4.32 indicam que não houve diferença significativa entre as amostras por apresentar desvio relativo inferior a 15%

Tabela 4.32 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade das soluções de trabalho de *p*-cloro-varfarina por período de 18 horas e 55 minutos.

Concentração nominal (ng/mL)	Amostra	Média em área ^a	CV (%)	Desvio (%)
100,00	Fresco	42030,50	2,6	
	Teste	39626,33	8,6	-5,7

a: Média de seis alíquotas

4.4 Análise descritiva das medidas farmacocinéticas

Os resultados das concentrações plasmáticas relativos à quantificação das amostras dos 31 voluntários para os medicamentos referência (Marevan[®]) e teste (Varfarina Sódica) utilizando o método bioanalítico validado, conforme condições de extração e cromatográficas apresentadas nesse trabalho.

Com o objetivo de comparar as curvas de concentração para os dois medicamentos em cada voluntário, foram apresentados os perfis farmacocinéticos na Figura 4.25. Para diversos voluntários, as duas curvas são bastante parecidas (por exemplo, voluntários 23), mas há algumas diferenças (algumas discretas e outras mais acentuadas), em relação ao valor de C_{max}. Destaca-se o voluntário 1, cuja curva do medicamento teste apresenta valor de concentração máxima de 778,47 ng/mL e para o medicamento referência valor de 1206,11 ng/mL.

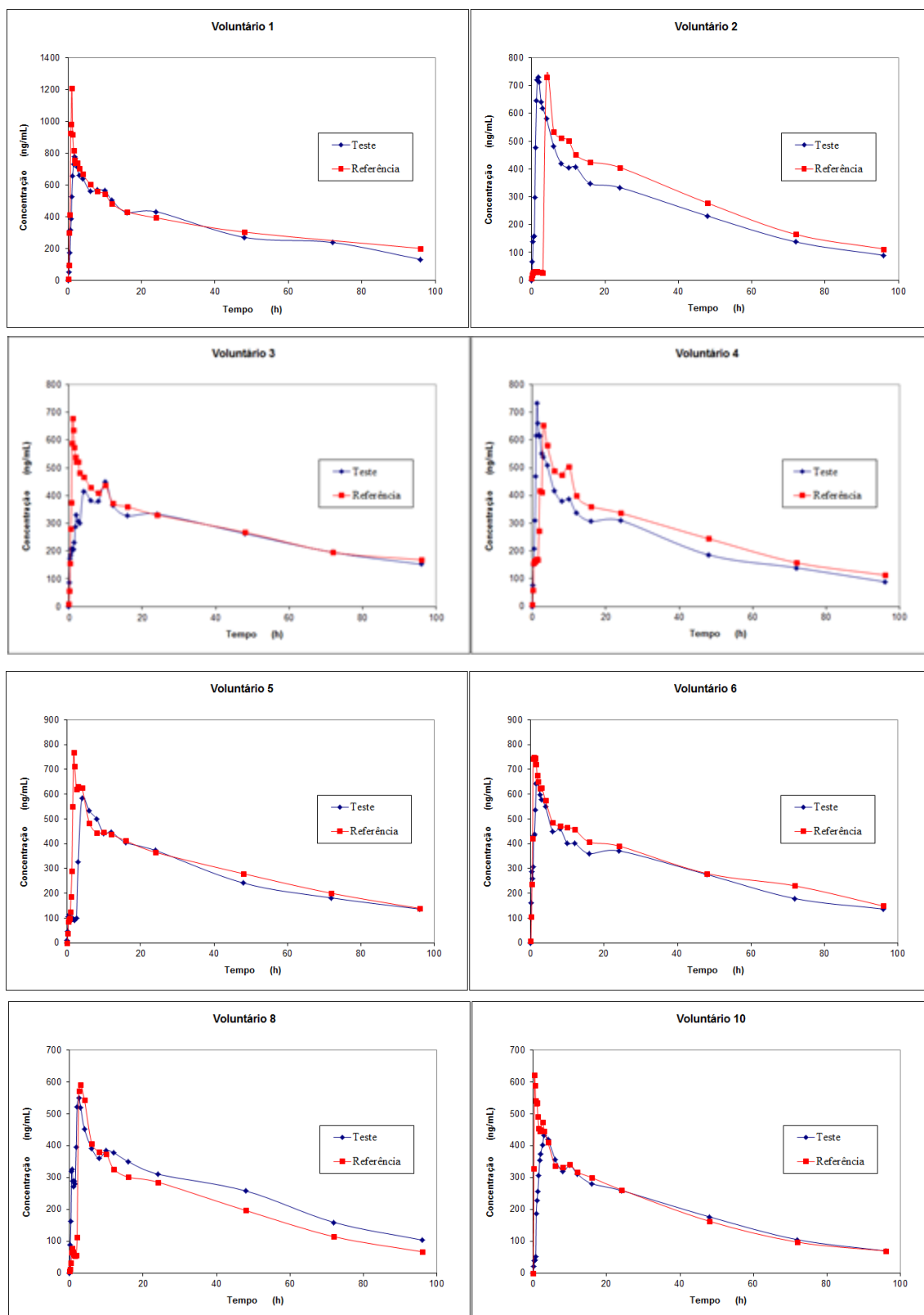


Figura 4.25 Curva de concentração plasmática dos medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®), para cada um dos 31 indivíduos

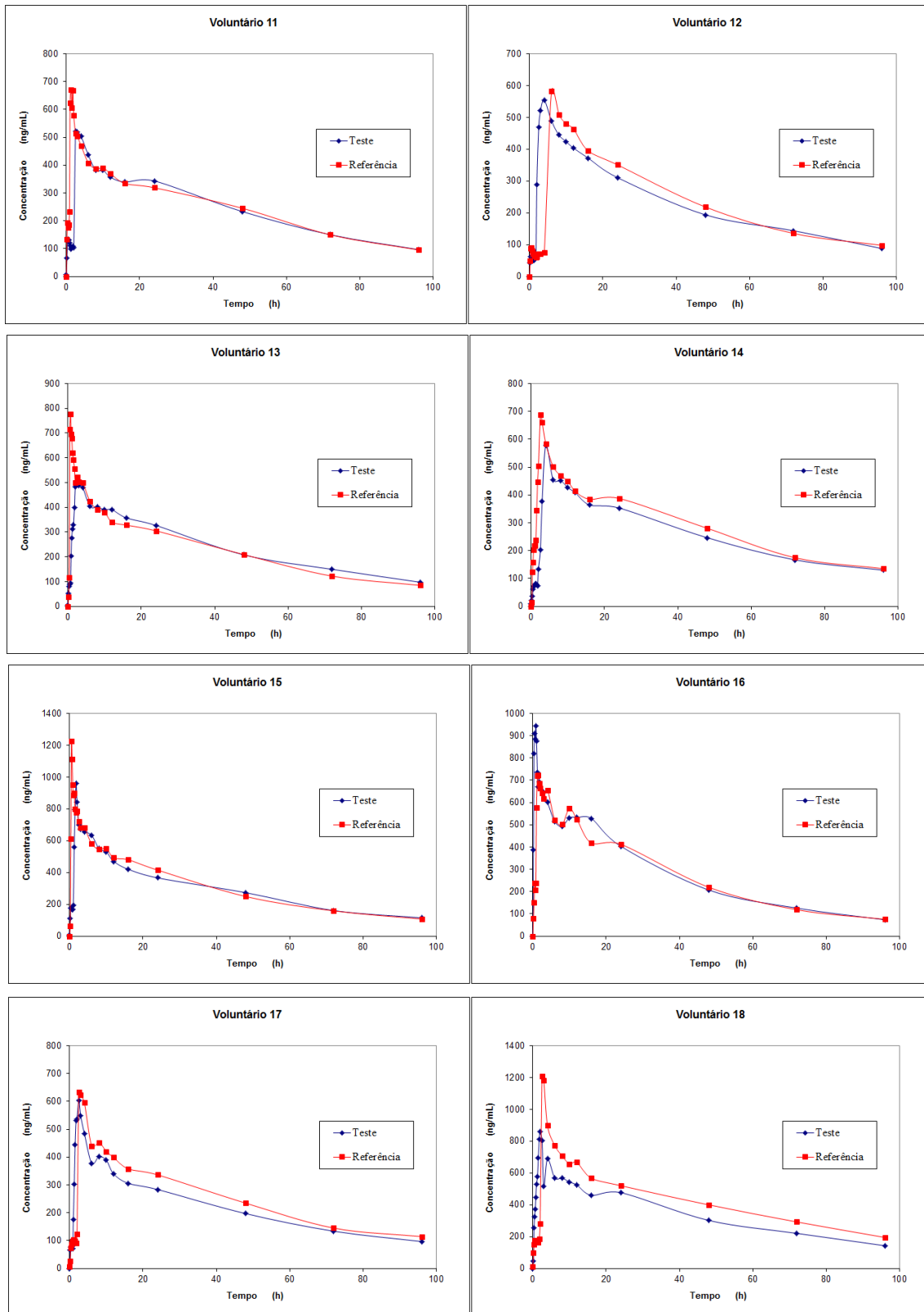


Figura 4.25 Curva de concentração plasmática dos medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan[®]), para cada um dos 31 indivíduos (continuação)

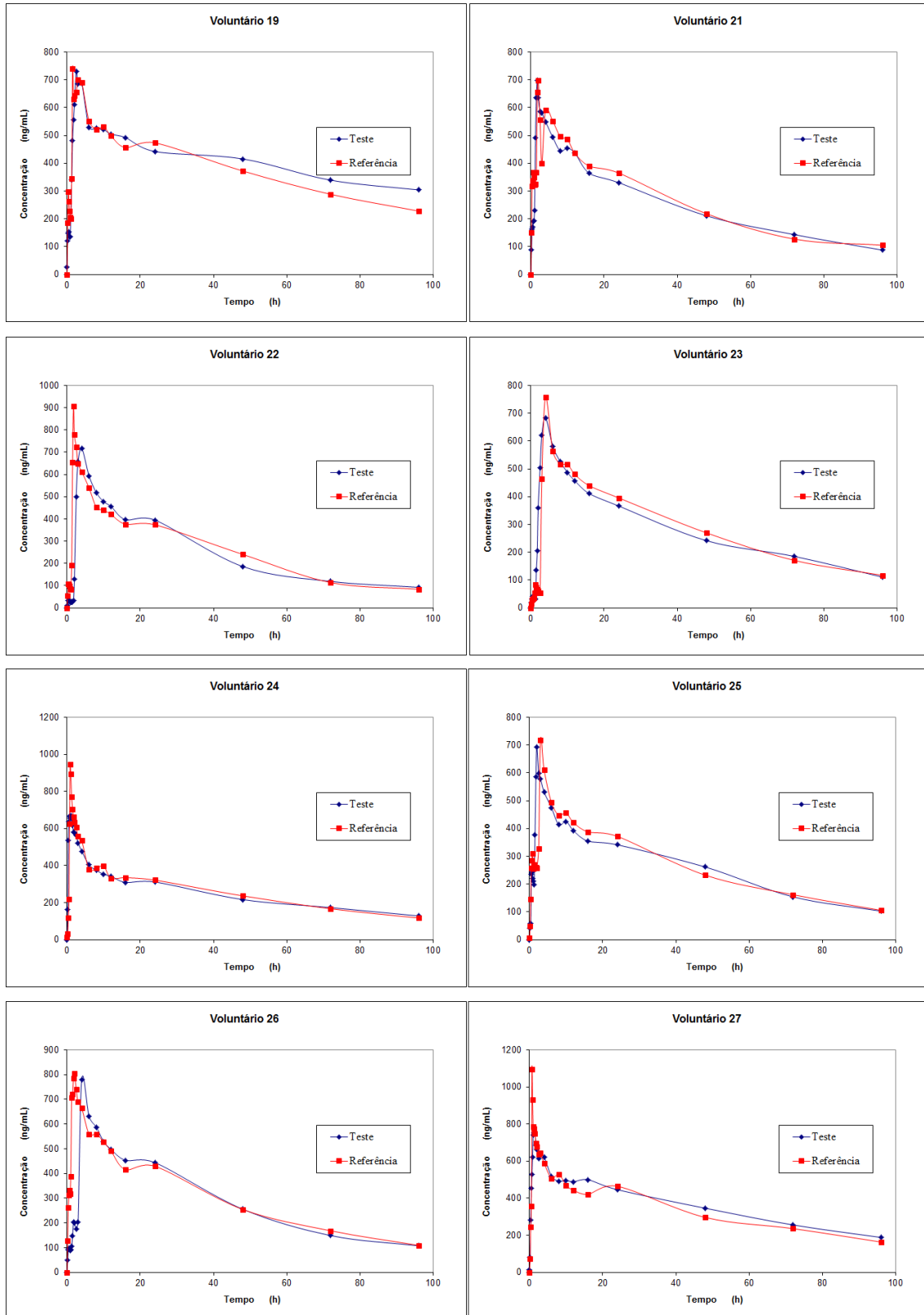


Figura 4.25 Curva de concentração plasmática dos medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan[®]), para cada um dos 31 indivíduos (continuação)

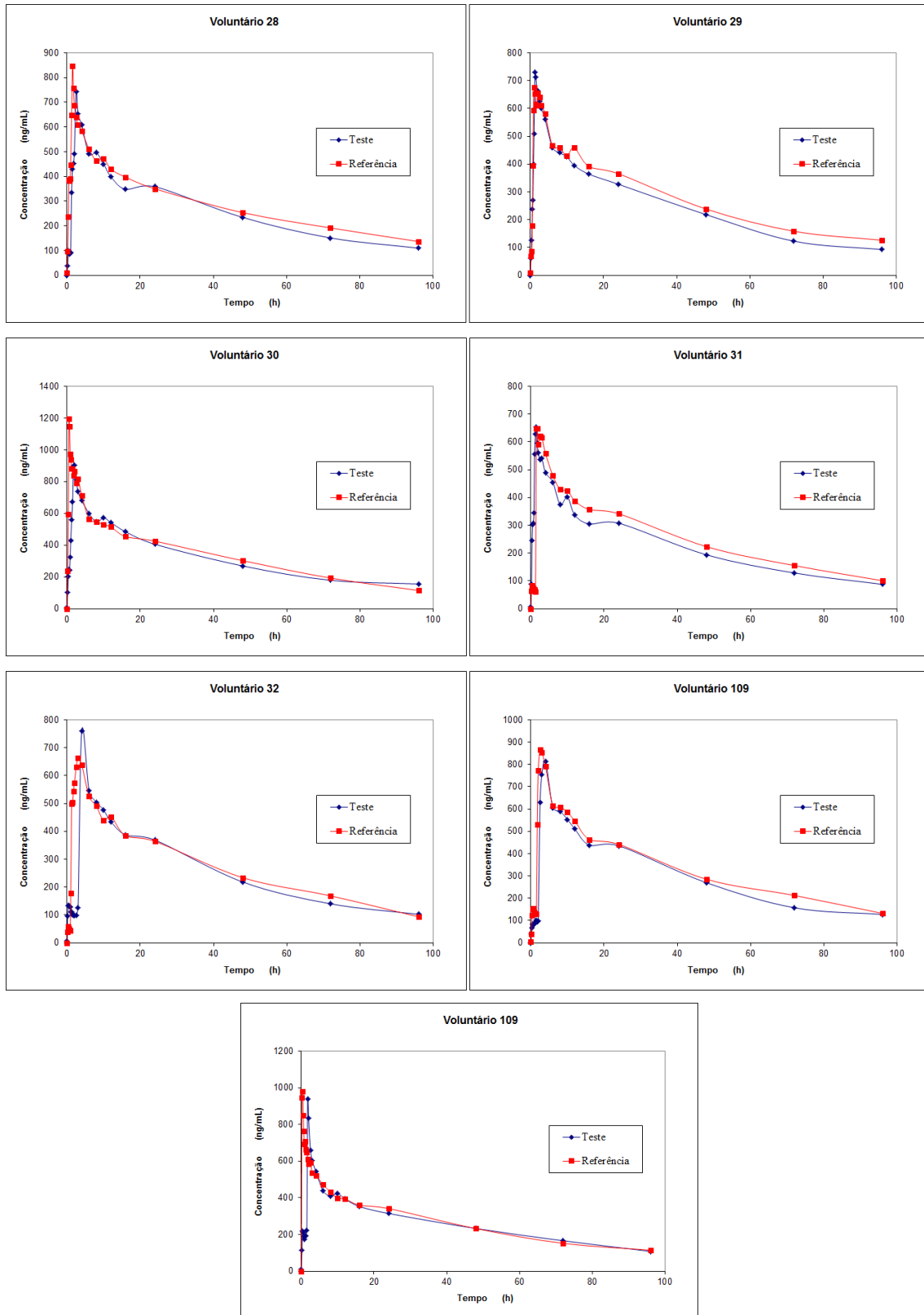


Figura 4.25 Curva de concentração plasmática dos medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan[®]), para cada um dos 31 indivíduos (continuação)

Nas Tabelas 1 e 2 apresentadas no ANEXO estão as principais medidas farmacocinéticas dos medicamentos referência (Marevan®) e teste (Varfarina Sódica), respectivamente, calculadas para as concentrações plasmáticas das amostras na escala normal para cada voluntário. Para esses valores, foram obtidas as estatísticas descritivas das medidas farmacocinéticas para cada uma das formulações testadas, conforme pode ser observado na tabela a seguir.

Tabela 4.33 Estatística descritiva das medidas farmacocinéticas dos medicamentos referência e teste

	MA	MG	MD	s	EP	CV	MIN	MAX
Marevan®	Cmax	807,82	787,79	741,28	179,76	32,29	582,91	1224,97
	Tmax	1,89	1,49	1,75	1,22	0,22	64,2	6,00
	T _{1/2}	20,1162	19,6634	18,8842	4,2161	0,7572	21,0	13,0760
	Kel	0,015629	0,015309	0,015941	0,002921	0,000525	18,7	0,009187
	ASC _t	26899,2560	26540,7958	26035,0758	4444,4196	798,2413	16,5	18249,0246
	ASC _∞	35530,9917	34600,2940	33479,1667	8158,0336	1465,2261	23,0	21952,5390
Varfarina Sódica	Cmax	699,58	685,54	717,39	138,92	24,95	431,86	960,89
	Tmax	2,70	2,34	2,50	1,70	0,30	62,9	10,00
	T _{1/2}	20,3805	19,7078	19,1337	6,5035	1,1681	31,9	12,4265
	Kel	0,015660	0,015275	0,015733	0,003196	0,000574	20,4	0,005968
	ASC _t	25892,5564	25551,3212	24611,5817	4329,0204	777,5150	16,7	17989,1654
	ASC _∞	34821,6172	33551,1258	31908,3628	11797,1445	2118,8297	33,9	21885,6371

MA: média aritmética; MG: média geométrica; MD: mediana; s: desvio padrão; EP: erro padrão; CV: coeficiente de variação; MIN: mínimo; MAX: máximo.

É importante observar que os valores que são mais distintos entre as formulações são os valores máximos para a concentração máxima, a constante de eliminação e a área sob a curva do tempo zero ao infinito. Somente a Cmax para o medicamento referência possuiu valor maior, obtido para o voluntário 15, e para os outros dois parâmetros farmacocinéticos o medicamento teste possuiu valores mais elevados, os quais foram obtidos para o voluntário 19.

Apesar das diferenças encontradas nos perfis e nas medidas farmacocinéticas para alguns voluntários, observa-se que, em média, os medicamentos são bem parecidos em relação às medidas farmacocinéticas, como apresentado na Tabela 4.34 e Figura 4.26.

Tabela 4.34 Medidas farmacocinéticas das médias das concentrações plasmáticas dos medicamentos referência e teste

	C_{max}	T_{max}	K_{el}	T_{1/2}	ASC_t	ASC_∞
T	587,03	4,00	65,7859	0,010534	25364,3144	25366,1050
R	597,48	3,00	65,4739	0,010584	26871,9043	26873,7618

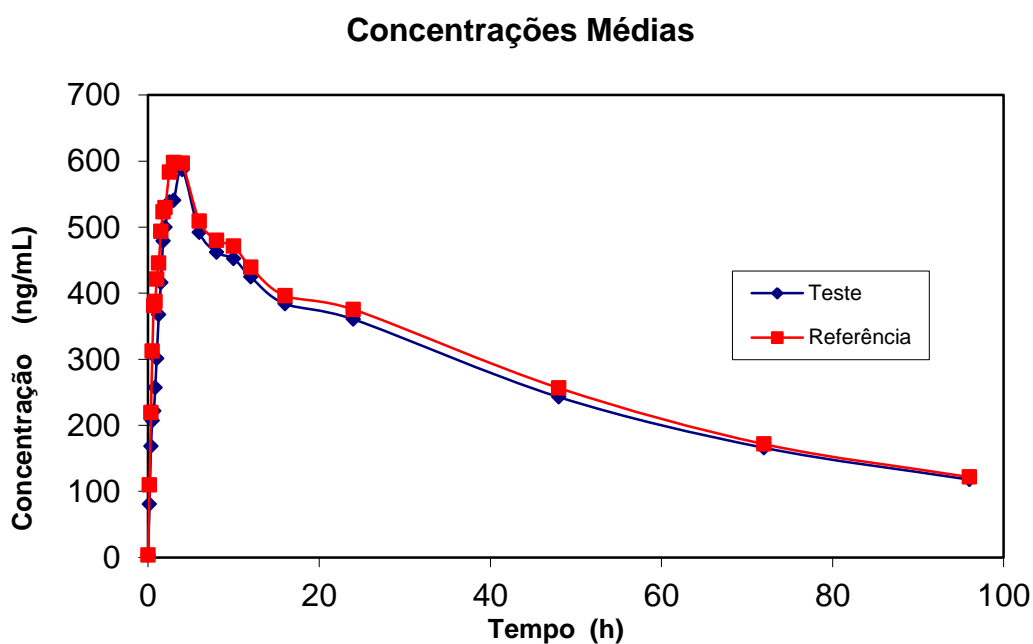


Figura 4.26 Curva de concentração plasmática dos medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®), com concentrações médias dos voluntários

4.4.1 Análise Descritiva de Concentração Máxima

As estatísticas descritivas de C_{max} estão apresentadas nas tabelas 4.33 e 4.34. Na Figura 4.27 está apresentada a tendência dos valores de C_{max} dos 31 voluntários para os dois medicamentos. Tais valores foram apresentados nas tabelas 1 e 2 do ANEXO. É possível perceber que as concentrações obtidas após administração do medicamento referência para os voluntários 1, 15, 18, 27 e 30 foram os que alcançaram maiores valores. Também é possível perceber que os valores obtidos para o medicamento referência possui maior variabilidade, afirmativa confirmada pelo maior valor de CV para este conjunto de dados, presente na Tabela 4.33.

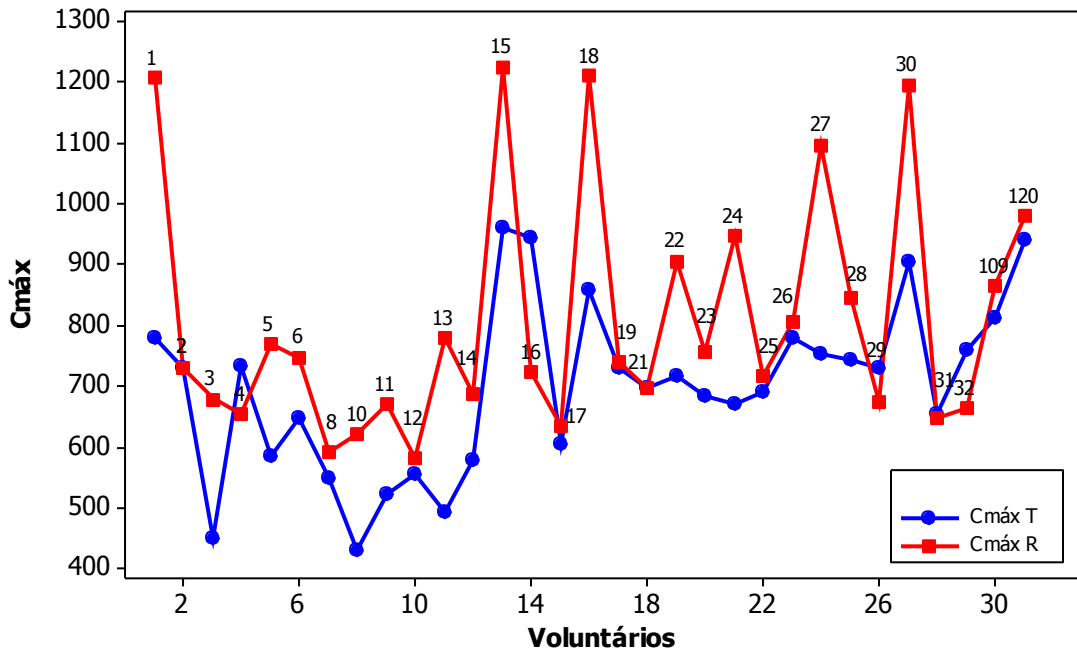


Figura 4.27 Cmax por voluntários para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®)

Pode-se perceber que, ao analisar a presença de *outliers* através dos gráficos *boxplots*, não foram identificados valores atípicos para os respectivos dados, Figura 4.28 de ambas as formulações. E também somente os valores de Cmax para o medicamento referência, nas duas escalas, não apresentam ajuste de normalidade como apresentado na Figura 4.29.

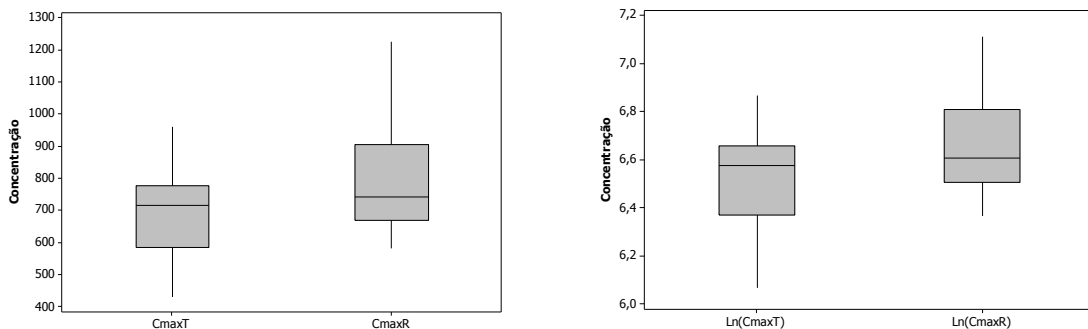


Figura 4.28 *Boxplots* de Cmax para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®), nas escalas original e logarítmica

Somente os valores de Cmax para o medicamento teste, nas duas escalas, apresentam ajuste de normalidade, como apresentado na Figura 4.29. Pode-se perceber que os resultados do p-valor para o Cmax relativo ao medicamento referência é inferior a 0,05, assim, a suposição de normalidade não é satisfeita para ambas as escalas (normal: p-valor = <0,010 e logarítmica: p-valor = 0,014).

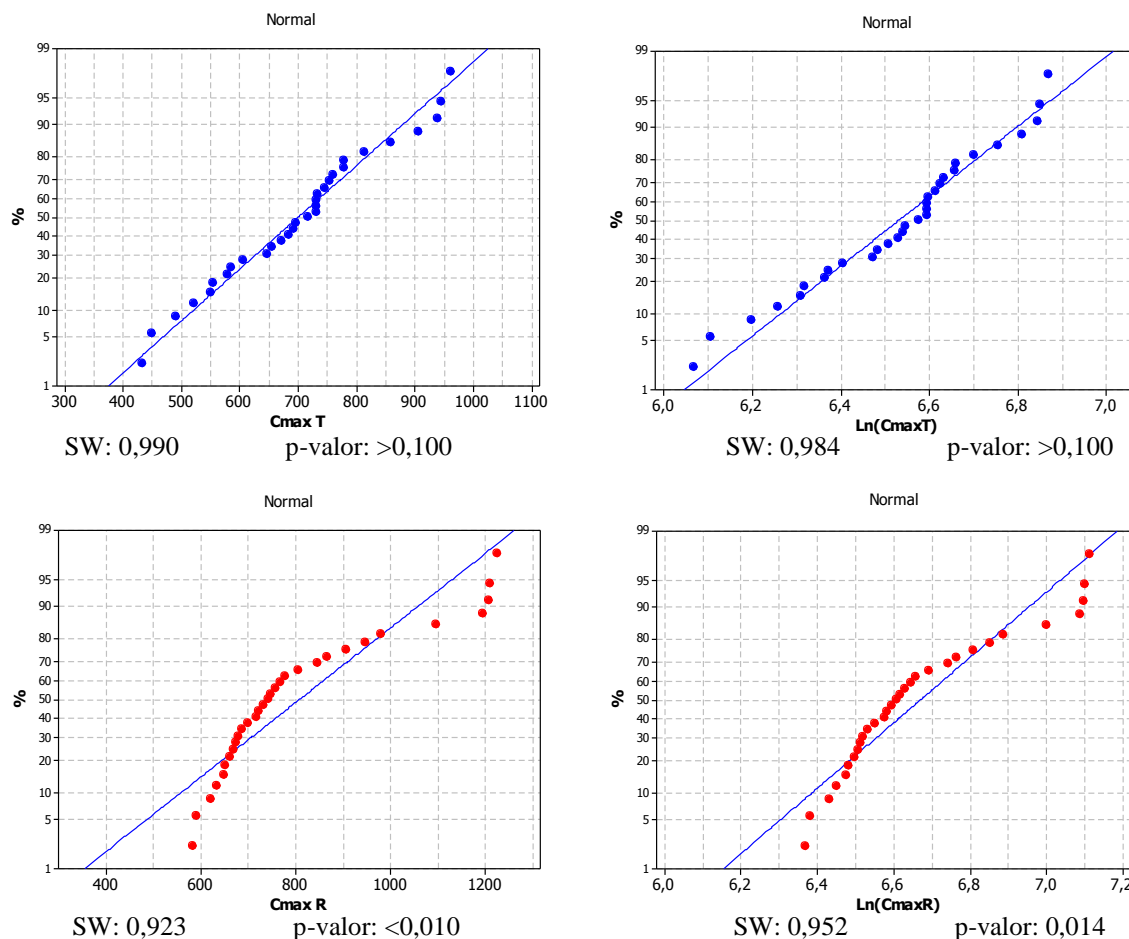


Figura 4.29 Gráficos de probabilidade normal para Cmax para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan[®]), nas escalas original e logarítmica, respectivamente.

4.4.2 Análise Descritiva de Área Sob a Curva

A estatística descritiva de ASCt está apresentada nas tabelas 4.33 e 4.34. Na Figura 4.30 está apresentada a tendência dos valores de ASCt dos 31 voluntários para os dois medicamentos. Tais valores foram apresentados nas tabelas 1 e 2 do ANEXO. É

possível perceber que os maiores valores obtidos após administração das formulações foram para os voluntários 18 e 19.

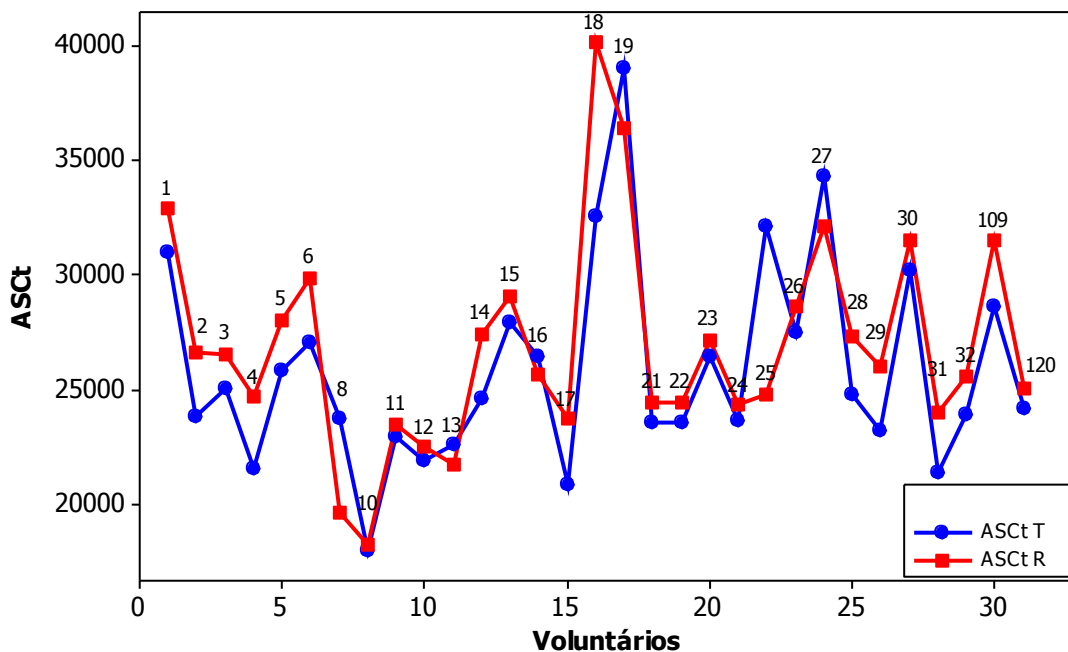


Figura 4.30 ASC_t por voluntários para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan[®])

As figuras 4.31 e 4.32 apresentam os gráficos de *boxplots* e de probabilidade normal para ASC_t, na escala original e logarítmica, respectivamente.

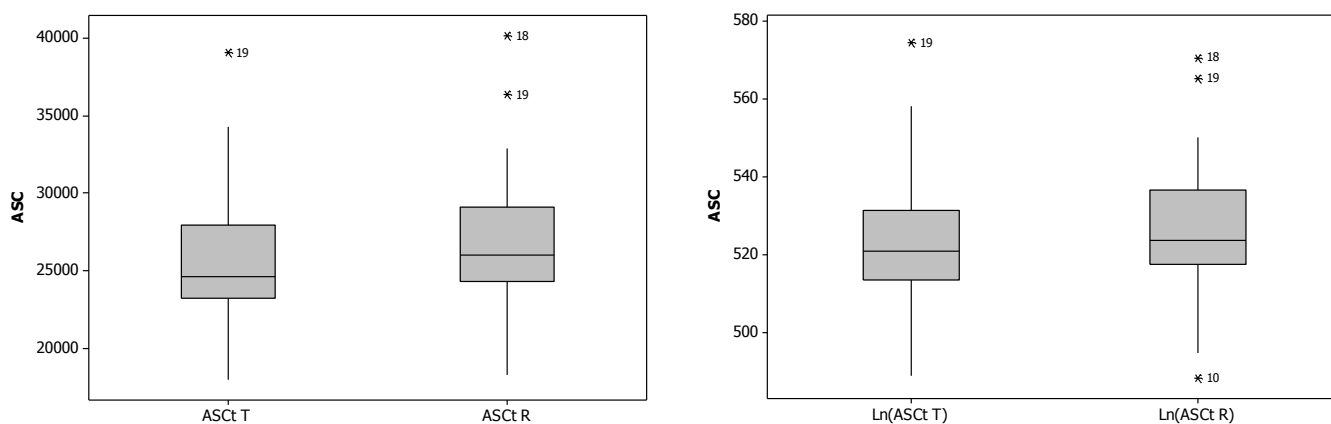


Figura 4.31 *Boxplots* de ASC_t para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan[®]), nas escalas original e logarítmica

Semelhante ao observado no gráfico de dispersão dos dados da ASC_t foi possível identificar nos gráficos *boxplots* valores discrepantes para os voluntários 18 e 19, *outliers* superiores. Para os dados transformados para a escala logarítmica foram identificados os mesmos valores atípicos e adicionalmente um *outlier* inferior, valor de ASC_t para o voluntário 10 após administração do medicamento referência.

Somente os valores de ASC_t para o medicamento referência, nas duas escalas, apresentam ajuste de normalidade, como apresentado na Figura 4.32. Entretanto, se forem retirados os valores atípicos para os dados relativos ao medicamento teste a suposição de normalidade é satisfeita para ambas as escalas (normal: SW = 0,975; p-valor = >0,100 e logarítmica: SW = 0,980; p-valor = >0,100).

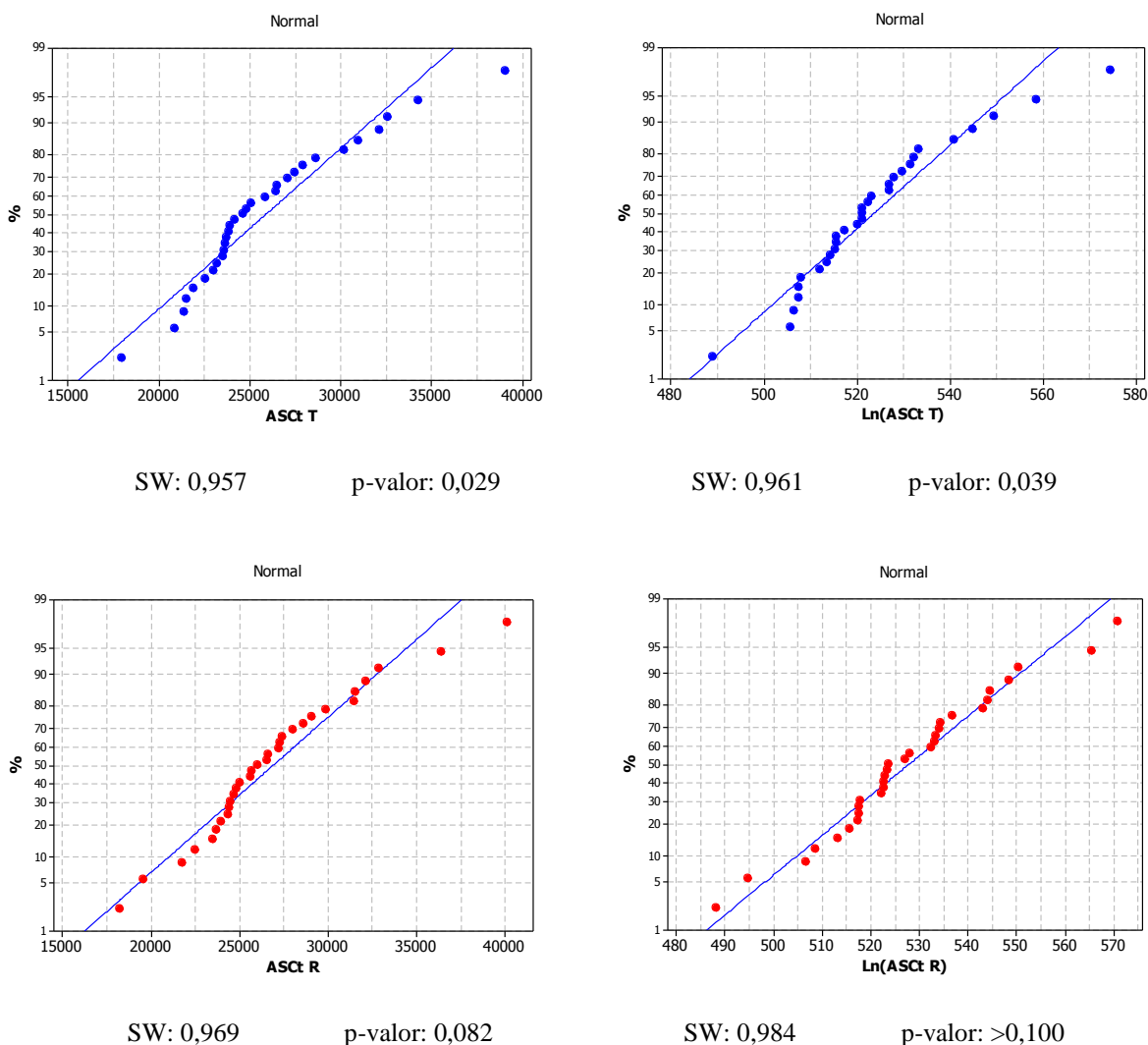


Figura 4.32 Gráficos de probabilidade normal para ASC_t para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®), nas escalas original e logarítmica

Assim, pode-se considerar que os testes de normalidade foram não significativos em todos os casos ($p > 0,05$).

Conforme preconiza a resolução RE nº 397 de 2004, publicada pela ANVISA, foi calculada a razão de ASC_t por ASC_∞ e foram obtidos valores menores que 80% para vários voluntários. Entretanto, o estudo foi planejado com cronograma de coleta truncado em 96 horas, condição que exclui a possibilidade de obter valores de tal razão superiores a 80%. Os valores obtidos para o voluntário 19, referente à administração dos medicamentos referência e teste, foram os menores entre os voluntários, como pode ser observado na figura a seguir. Tal resultado indica que, para este voluntário, a eliminação do fármaco é a mais lenta, seguida dos voluntários 1 e 3, pois são identificados valores da razão muito próximos a 60%.

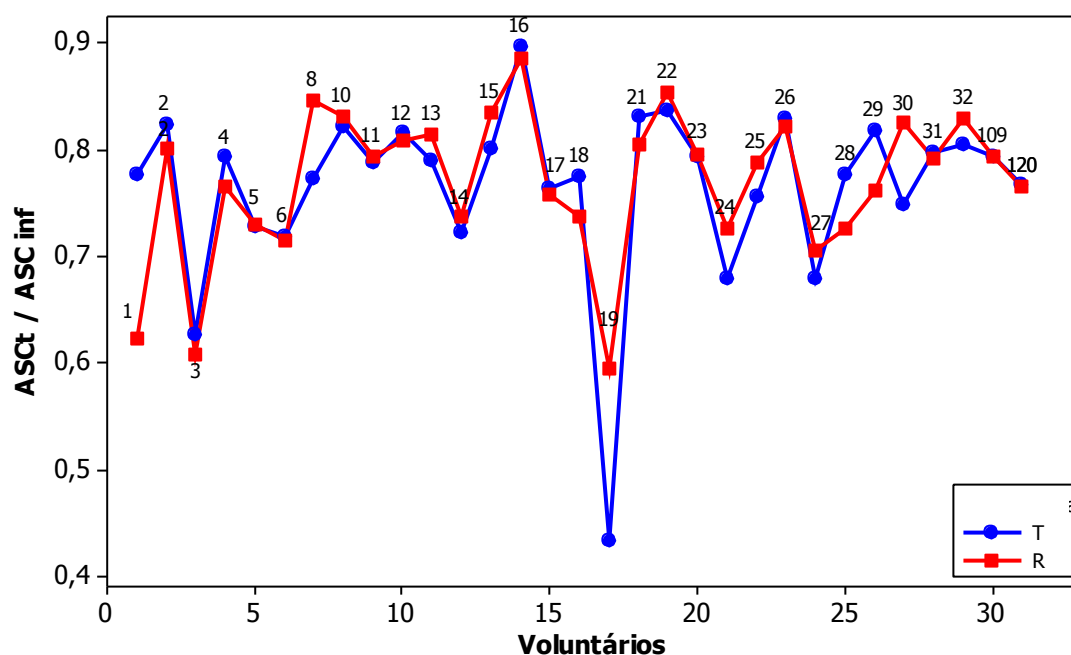


Figura 4.33 Dispersão da razão de ASC_t por ASC_∞ , para os medicamentos referência e teste, dos voluntários participantes do estudo

Para verificação de possíveis *outliers* foram construídos *boxplots*, Figura 4.34, e foram identificados dois *outliers* inferiores para o medicamento teste, referentes aos valores de razão para os voluntários 3 e 19.

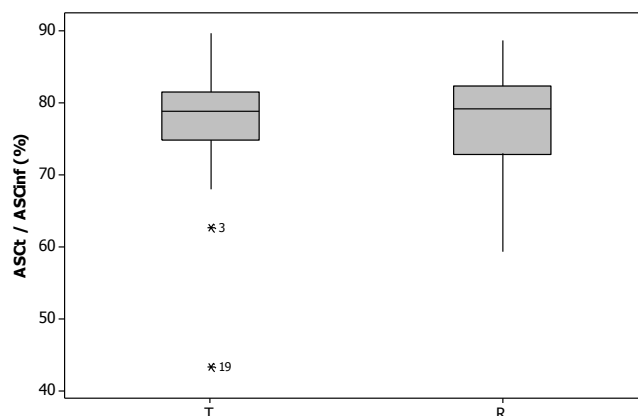


Figura 4.34 *Boxplots* da razão de ASC_t por ASC_∞, na escala normal, para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®)

4.4.3 Análise dos Efeitos Aleatórios e dos Efeitos Fixos

O objetivo da análise de variância é estudar a variabilidade nos dados observados particionando a soma de quadrados total (SQ_{total}) das observações em componentes dos efeitos fixos e dos erros aleatórios (BRASIL, 2002a).

Tabela 4.35 ANOVA para C_{max} na escala logarítmica

Fonte	GL	SQ	QM	F	p-valor
Inter-individual					
Residual (seq)	1	0,000104	0,000104	0,058321	0,81087
Resíduos (inter)	29	0,051505	0,001776	4,425525	6,99E-05
Intra-individual					
Formulação	1	0,00686	0,00686	17,09411	0,000277
Período	1	2,35E-06	2,35E-06	0,005858	0,939518
Resíduos (intra)	29	0,011638	0,000401		
Total	61	0,070109			

Os resultados indicam que o efeito residual não é significativo (p-valor = 0,81087) e o efeito inter-individual é significativo (p-valor = 0,0000699), o que indica a presença de variabilidade inter-individual, resultado já esperado devido às diferenças entre os voluntários. Para a análise dos efeitos intra-individuais pode-se perceber que

existe efeito de formulação (p-valor = 0,000277) e não há efeito de período (p-valor = 0,939518), ao nível de significância de 5%.

A mesma conclusão é obtida ao analisar o quadro de ANOVA para os dados de ASC_t na escala logarítmica, Tabela 4.36. Deve-se ressaltar que a significância do efeito de formulação não implica na rejeição da bioequivalência entre os medicamentos testados. E a avaliação da bioequivalência deve se basear na obtenção dos limites de confiança para a razão das médias geométricas entre os produtos teste e referência.

Tabela 4.36 ANOVA para ASC_t na escala logarítmica

Fonte	GL	SQ	QM	F	p-valor
Inter-individual					
Residual (seq)	1	0,000337	0,000337	0,161736	0,690512
Resíduos (inter)	29	0,060467	0,002085	15,36103	4,48E-11
Intra-individual					
Formulação	1	0,000933	0,000933	6,874871	0,013781
Período	1	0,000341	0,000341	2,51282	0,123769
Resíduos (intra)	29	0,003936	0,000136		
Total	61	0,066014			

É importante destacar que o teste de igualdade de médias das duas formulações é mais exigente do que o teste usado na avaliação da bioequivalência, o qual permite que a diferença das médias esteja dentro do intervalo de bioequivalência (CHELLINI, 2007). Os estudos de bioequivalência têm como finalidade de avaliar a equivalência terapêutica em eficácia e segurança entre as formulações, as quais são alternativas farmacêuticas destinadas a serem utilizadas indiferentemente para o mesmo efeito (CHOW & LIU, 2009). Assim, os estudos de bioequivalência são substitutos dos ensaios clínicos (CHOW & LIU, 2009).

Dessa forma, para realizar uma avaliação da bioequivalência média entre as formulações, referente aos dados de C_{max} e ASC_t na escala logarítmica, deve-se calcular os intervalos da bioequivalência para estes dados, os quais estão apresentados a seguir.

4.4.4 Avaliação da Bioequivalência Média

O objetivo dos estudos de biodisponibilidade é verificar se a taxa e a extensão da absorção do fármaco no sistema circulatório referentes às duas formulações (teste e referência) são equivalentes. Sabe-se que os perfis de biodisponibilidade de duas formulações podem variar para um mesmo indivíduo e por isso trabalha-se com uma avaliação em termos médios. Usualmente, essa avaliação é realizada com os dados na escala logarítmica, assim, os resultados apresentados foram obtidos com as medidas farmacocinéticas transformadas.

Tabela 4.37 Intervalo de confiança paramétrico para C_{max} e ASC_t na escala logarítmica

	Intervalo de 90% de confiança	Conclusão
$\text{Ln}(C_{max})$	(97,073 ; 98,768)	bioequivalentes
$\text{Ln}(ASC_t)$	(98,744 ; 99,743)	bioequivalentes

Como o intervalo calculado está dentro dos limites aceitáveis recomendados pela agência reguladora, isto é, intervalo de 80% a 125% para as médias farmacocinéticas com transformação, então conclui-se pela existência de bioequivalência.

4.5 Polimorfismos gênicos obtidos para os voluntários

Os polimorfismos para cada um dos voluntários participantes do estudo estão apresentados na Tabela 4.38. É importante observar que os alelos *2 e *3 são considerados mutantes para o gene CYP2C9 e o polimorfismo AA para o gene VKORC1. Também estão apresentados os dados individuais, os quais são idade, peso, altura e índice de massa corpórea (IMC).

Tabela 4.38 Polimorfismos relativos aos genes CYP2C9 e VKORC1 dos voluntários participantes do estudo

Vol	CYP2C9	VKORC1	Idade	Peso	Altura	IMC
1	*1 *2	A A	44	60	1,64	22,31
2	*1 *1	G G	32	88	1,74	29,07
3	*2 *2	G A	26	93	1,80	28,70
4	*1 *1	G G	27	80	1,78	25,25
5	*1 *1	A A	25	78	1,89	21,84
6	*2 *2	G A	39	77,5	1,72	26,20
8	*1 *1	G G	29	80	1,75	26,12
10	*1 *1	G G	37	72	1,75	23,51
11	*1 *1	G A	27	70	1,74	23,12
12	*1 *1	G A	33	75	1,71	25,65
13	*1 *1	G A	35	83	1,75	27,10
14	*1 *1	G A	23	77	1,86	22,26
15	*1 *1	G A	27	70	1,71	23,94
16	*1 *1	G G	22	69	1,74	22,79
17	*1 *1	G G	21	110	1,98	28,06
18	*1 *1	A A	42	69	1,69	24,16
19	*1 *3	G A	47	72	1,89	20,16
21	*1 *1	G G	32	75	1,75	24,49
22	*1 *1	G G	22	71	1,75	23,18
23	*1 *1	A A	26	58	1,65	21,30
24	*1 *1	G A	39	83	1,75	27,10
25	*1 *2	G G	28	73	1,78	23,04
26	*1 *1	G A	19	57	1,61	21,99
27	*1 *2	G G	24	89	1,78	28,09
28	*1 *2	G A	40	73	1,65	26,81
29	*1 *1	G A	33	69	1,71	23,60
30	*1 *1	G A	19	65	1,66	23,59
31	*1 *1	G A	50	87	1,72	29,41
32	*1 *1	G G	24	75	1,69	26,26
109	*1 *1	G A	24	64	1,75	20,90
120	*1 *1	G A	26	96	1,80	29,63

Na Tabela 4.39 a seguir estão apresentadas as frequências dos polimorfismos observadas nesse presente estudo.

Tabela 4.39 Frequência dos polimorfismos identificadas para os genes CYP2C9 e VKORC1 para os voluntários

CYP2C9	*1 *1	*1 *2	*1 *3	*2 *2	Total
VKORC1					
A A	3 (9,68)*	1 (3,23)	-	-	4 (12,90)
A G	12 (38,71)	1 (3,23)	1 (3,23)	2 (6,45)	16 (51,61)
G G	9 (29,03)	2 (6,45)	-	-	11 (35,48)
Total	24 (77,42)	4 (12,90)	1 (3,23)	2 (6,45)	31 (100,00)

(%)*.: frequência em porcentagem dos polimorfismos em relação à população do presente estudo.

Em comparação com outras populações, inclusive com trabalho de Vianna-Jorger, *et al.* (2004), a proporção dos polimorfismos dos voluntários neste trabalho, principalmente com a presença do alelo *2 em homozigose, pode-se supor que a população brasileira possui ascendência europeia. Podem-se comparar os resultados de frequência na tabela a seguir.

Tabela 4.40 Frequência dos polimorfismos para CYP2C9 em brasileiros e em outras populações

População	No.	*1*1	*1*2	*1*3	*2*2	*2*3	*3*3
Presente estudo							
População estudada (No. e %)	31	24 (77,4)	4 (12,9)	1 (3,2)	2 (6,5)	-	-
Outros estudos							
Brasileiros (% e IC _{95%}) ¹	331	72,2 (65,3-78,2)	14,5 (10,1-20,3)	10,9 (7,1-16,2)	0,9 (0,2-3,6)	0,9 (0,2-3,6)	0,6 (0,1-3,1)
Caucasianos(%) ²	1485	64,8	20,3	11,8	1,0	1,7	0,4
Afro-americanos(%) ³	100	97,0	2,0	1,0	-	-	-
Africanos(%) ⁴	150	87,0	8,7	4,3	-	-	-

Fonte:1:VIANNA-JORGER, *et al.* 2004; 2: LEE, *et al.*, 2002; 3: SULLIVAN-KLOSE, *et al.* 1996; 4: DORADO, *et al.* 2003.

A população brasileira apresenta significativa sensibilidade à varfarina e isso pode ser explicado pela presença mais comum das variantes de VKORC1 e CYP2C9 associadas com o aumento desta sensibilidade. E as variantes mais frequentes são encontradas entre os caucasianos e africanos, como pode ser visualizado na Tabela 4.40, os dois grupos raciais que compõem a população brasileira (ORSI, *et al.*, 2010).

Na população geral brasileira as frequências alélicas estimadas para CYP2C9*2 e *3 são em cerca de 0,09 e 0,07, respectivamente, e três vezes maior em caucasianos do que em pacientes brasileiros de outras origens étnicas (LIMA, MV, *et al.*, 2008 e VIANNA-JORGER, *et al.*, 2004). Avaliando os resultados presentes na Tabela 4.39, obtidos neste trabalho, a frequência alélica foi de 0,129 e 0,016, respectivamente. Considerando que o número de voluntários participantes é muito pequeno para estimar a frequência alélica populacional, o resultado apresentou boa aproximação. O mesmo pode ser observado para a frequência alélica para o gene VKORC1, em que pode-se perceber que os resultados obtidos para os alelos A e G neste estudo são mais aproximados ao obtido por Stuart, *et al.*. (2010), para o grupo de Caucasianos.

Tabela 4.41 Frequência dos alelos para VKORC1 em brasileiros e em outras populações

População	No.	A	G
Presente estudo			
População estudada (No. e %)	62	24 (38,7)	38 (61,3)
Outros estudos			
Caucasianos (%) ¹	202	40,6	59,4
Afro-americanos (%) ¹	600	10,8	89,2
Hispânicos (%) ¹	202	43,6	56,4
Asiáticos (%) ¹	204	66,7	33,3

Fonte 1: STUART, *et al.* 2010.

4.6 Avaliação da Bioequivalência Considerando os Polimorfismos dos Voluntários

Foram construídos os intervalos de bioequivalência considerando todos os voluntários, considerando os selvagens para o gene CYP2C9 e considerando os voluntários com presença do alelo G do VKORC1. Ou seja, todos os voluntários que possuem o alelo *2 e *3 para CYP2C9 não foram considerados para construir o intervalo de 90% de confiança, comparação identificada como CYP2C9, e os voluntários com polimorfismo AA para VKORC1 também não foram considerados para a comparação VKORC1 G, resultados apresentados na Tabela 4.42 a seguir.

Tabela 4.42 Intervalo de confiança paramétrico para C_{max} e ASC_t na escala logarítmica para todos os voluntários, com polimorfismos CYP2C9*1*1 e VKORC1 com presença do alelo G

		IC de 90%	Conclusão
BE média	$Ln(C_{max})$	(97,073 ; 98,768)	bioequivalentes
	$Ln(ASC_t)$	(98,744 ; 99,743)	bioequivalentes
CYP2C9 *1*1	$Ln(C_{max})$	(97,335 ; 99,267)	bioequivalentes
	$Ln(ASC_t)$	(98,496 ; 99,718)	bioequivalentes
VKORC1 G	$Ln(C_{max})$	(97,336 ; 99,154)	bioequivalentes
	$Ln(ASC_t)$	(98,789 ; 99,872)	bioequivalentes

Os resultados dos intervalos de bioequivalência estão apresentados graficamente na Figura 4.35 para facilitar a comparação entre os diferentes grupos, tanto para $Ln(C_{max})$ quanto para $Ln(ASC)$.

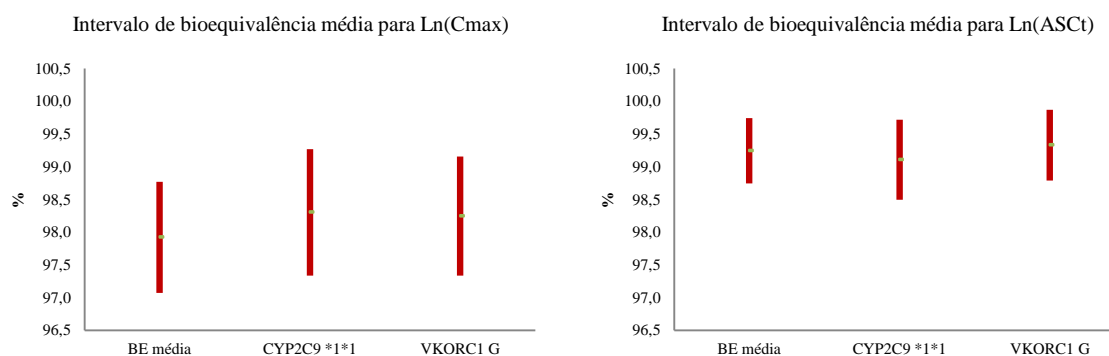


Figura 4.35 Intervalos de bioequivalência para C_{max} e ASC na escala logarítmica para todos os dados, para voluntários com polimorfismo *1*1 do CYP2C9 e com alelo G do VKORC1

Para todos os resultados obtidos, tanto para $Ln(C_{max})$ quanto para $Ln(ASC)$, a conclusão foi pela bioequivalência entre as formulações. É possível perceber que o intervalo para $Ln(C_{max})$ dos grupos somente com voluntários com polimorfismo selvagem possuem valores mais próximos de 100%. O mesmo não pode ser observado para $Ln(ASC)$.

4.7 Avaliação da Relação Normalizada Internacional dos Voluntários

Durante o Estudo

Nas Tabelas 5 e 6 apresentadas no ANEXO estão os valores de RNI obtidos durante a condução do estudo, na primeira e segunda fase de internação, respectivamente. Para esses valores foram obtidos valores de média, desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo e máximo para cada um dos voluntários, conforme pode ser observado nas tabelas a seguir.

Tabela 4.43 Estatística descritiva dos valores de RNI dos voluntários na fase 1

Vol.	Média	s	CV	Mín	Máx	n
1	1,13	0,084	7,4	1,00	1,23	10
2	1,04	0,044	4,2	1,00	1,11	10
3	1,13	0,095	8,4	1,00	1,28	10
4	1,22	0,145	11,9	1,00	1,53	10
5	1,20	0,071	5,9	1,12	1,31	10
6	1,02	0,029	2,9	1,00	1,07	10
8	1,14	0,091	8,0	1,00	1,28	10
10	1,15	0,130	11,3	1,01	1,42	10
11	1,28	0,098	7,7	1,09	1,40	10
12	1,14	0,089	7,8	1,00	1,27	10
13	1,07	0,102	9,5	1,00	1,34	10
14	1,17	0,092	7,9	1,03	1,28	10
15	1,07	0,096	9,0	1,00	1,27	10
16	1,24	0,113	9,1	1,06	1,46	10
17	1,03	0,033	3,2	1,00	1,08	10
18	1,27	0,151	11,9	1,00	1,46	10
19	1,18	0,092	7,8	1,00	1,28	10
21	1,19	0,170	14,4	1,00	1,56	10
22	1,00	0,006	0,6	1,00	1,02	10
23	1,25	0,109	8,7	1,05	1,42	10
24	1,18	0,175	14,8	1,00	1,60	10
25	1,03	0,031	3,0	1,00	1,09	10
26	1,22	0,110	9,0	1,03	1,42	10
27	1,10	0,089	8,0	1,00	1,26	10
28	1,14	0,099	8,8	1,00	1,27	10
29	1,13	0,090	8,0	1,00	1,29	10
30	1,26	0,114	9,1	1,03	1,42	10
31	1,03	0,044	4,3	1,00	1,11	10
30	1,09	0,062	5,7	1,00	1,17	10
109	1,28	0,112	8,8	1,10	1,42	10
120	1,11	0,139	12,5	1,00	1,46	10

Tabela 4.44 Estatística descritiva dos valores de RNI dos voluntários na fase 2

Vol.	Média	s	CV	Mín	Máx	n
1	1,16	0,110	9,5	1,00	1,30	9*
2	1,10	0,114	10,3	1,00	1,28	10
3	1,15	0,105	9,1	1,00	1,30	10
4	1,25	0,108	8,7	1,09	1,41	10
5	1,20	0,083	6,9	1,05	1,33	10
6	1,05	0,096	9,1	1,00	1,29	10
8	1,16	0,122	10,5	1,00	1,30	10
10	1,15	0,138	12,0	1,00	1,38	10
11	1,22	0,091	7,5	1,08	1,31	10
12	1,16	0,095	8,2	1,00	1,26	10
13	1,22	0,208	17,0	1,00	1,69	10
14	1,25	0,156	12,5	1,01	1,47	10
15	1,06	0,063	6,0	1,00	1,17	10
16	1,30	0,102	7,8	1,11	1,41	10
17	1,06	0,060	5,6	1,00	1,14	10
18	1,27	0,181	14,2	1,00	1,50	10
19	1,22	0,143	11,8	1,01	1,49	10
21	1,21	0,135	11,1	1,00	1,41	10
22	1,04	0,039	3,8	1,00	1,09	10
23	1,25	0,109	8,7	1,03	1,40	10
24	1,17	0,116	9,9	1,00	1,30	10
25	1,11	0,088	8,0	1,00	1,23	10
26	1,34	0,137	10,2	1,10	1,51	10
27	1,19	0,134	11,2	1,00	1,30	10
28	1,19	0,108	9,1	1,00	1,30	10
29	1,19	0,100	8,4	1,00	1,33	10
30	1,25	0,136	10,9	1,06	1,40	10
31	1,01	0,023	2,2	1,00	1,07	10
30	1,09	0,075	6,9	1,00	1,17	10
109	1,23	0,095	7,7	1,06	1,35	10
120	1,13	0,106	9,3	1,00	1,26	10

*: O tempo de 72 horas não foi coletado.

A partir dos mesmos dados brutos, foram construídos *boxplots* para cada tempo de coleta, nas diferentes fases e formulações, os quais foram apresentados na Figura 4.36. Para todos os gráficos, é possível perceber que nos tempos de coleta de 48, 72 e 96 horas os valores de RNI apresentaram valores médios inferiores aos demais tempos. Avaliando os valores médios nos gráficos *boxplots* para as duas fases distintas, pode-se perceber que os valores para a fase 2 são maiores para os tempos de coleta de 1 hora a 12 horas. Também pode ser visualizada na Figura 4.37, em que as linhas cheias são para as médias obtidas dos valores da fase 1 e as tracejadas da fase 2.

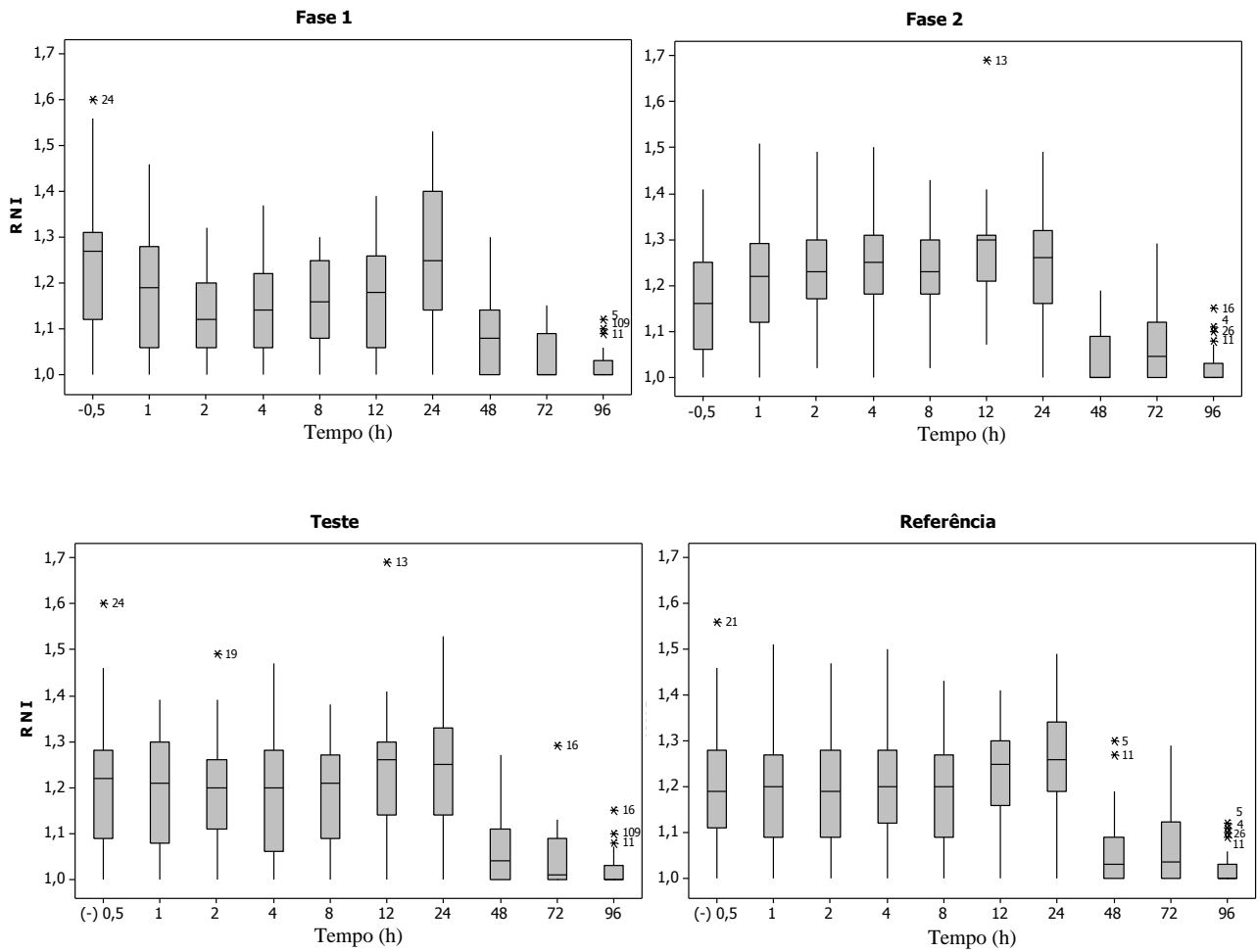


Figura 4.36 Boxplots dos valores de RNI para os diferentes tempos de coleta nas duas fases do estudo e para os medicamentos teste (Varfarina Sódica) e referência (Marevan®)

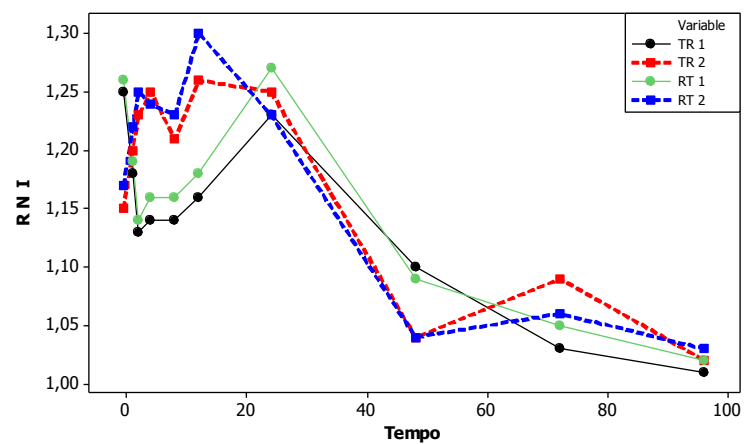


Figura 4.37 Valores de RNI em função dos diferentes tempos de coleta para as fases 1 (linhas cheias) e 2 (linhas tracejadas) e para os grupos de aleatorização, TR e RT.

A diferença entre as médias para as duas fases nos distintos tempos de coleta foi avaliada pelo teste de Tukey, e as médias foram consideradas diferentes para p-valor menor que 0,05. Os resultados das médias e p-valores estão apresentados na Tabela 4.45. Somente não houve diferença significativa entre as médias dos tempos de coleta de 1 hora e 24 horas. Sendo que para o tempo de 72 horas o p-valor é limítrofe.

Tabela 4.45 Valores médios de RNI para os tempos de coleta para as fases 1 e 2

Fase	Tempo de coleta (horas)									
	-0,5	1	2	4	8	12	24	48	72	96
Fase 1	1,25	1,19	1,13	1,15	1,15	1,17	1,25	1,09	1,04	1,02
Fase 2	1,16	1,21	1,24	1,24	1,22	1,28	1,24	1,04	1,08	1,02
	(0,005)*	(0,401)	(0,000)	(0,003)	(0,006)	(0,000)	(0,819)	(0,007)	(0,048)	(0,001)

*(p-valor)

Também foram avaliadas possíveis diferenças entre as médias dos grupos de aleatorização, RT e TR, para cada uma das fases do estudo. Não foi identificada nenhuma diferença significativa, pois todos os valores foram maiores que 0,05, como pode ser observado na Tabela 4.46 a seguir.

Tabela 4.46 Valores médios de RNI para os tempos de coleta considerando os grupos de aleatorização e as fases do estudo

Fase	Aleatorização	Tempo de coleta (horas)									
		-0,5	1	2	4	8	12	24	48	72	96
1	RT	1,26	1,19	1,14	1,16	1,16	1,18	1,27	1,09	1,05	1,02
1	TR	1,25	1,18	1,13	1,14	1,14	1,16	1,23	1,10	1,03	1,01
		(0,852)*	(0,949)	(0,724)	(0,614)	(0,504)	(0,662)	(0,506)	(0,962)	(0,348)	(0,398)
2	RT	1,17	1,22	1,25	1,24	1,23	1,30	1,23	1,04	1,06	1,03
2	TR	1,15	1,20	1,23	1,25	1,21	1,26	1,25	1,04	1,09	1,02
		(0,762)	(0,619)	(0,630)	(0,838)	(0,617)	(0,329)	(0,722)	(0,857)	(0,434)	(0,624)

*(p-valor)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os princípios que estimularam a realização desse trabalho foi o extenso quadro literário para o fármaco em estudo, principalmente em relação aos polimorfismos correlacionados à monitorização terapêutica e à segurança de voluntários participantes de estudos de bioequivalência.

Em julho de 2001, o EMEA publicou que a fenotipagem e/ou genotipagem dos voluntários podem ser consideradas em estudos crossover de bioequivalência por razões de segurança ou farmacocinética. As variantes genéticas do VKORC1 foram consideradas no estudo de Rieder e cols. (2005) como as maiores determinantes da variação da sensibilidade à varfarina, mas os polimorfismos do CYP2C9 não deveriam ser ignorados. Wadelius (2007) indicou que nenhum polimorfismo do CYP2C9 contribui mais para a dose de varfarina que os polimorfismos mutantes, CYP2C9*2 e *3.

Em agosto de 2007, o *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) declarou que os polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3 representam risco aumentado de hemorragia durante a terapia com varfarina e, conseqüentemente, sugeriu o requerimento de menores doses deste fármaco para alcançar o RNI adequado e diminuir o risco de ocorrer quadros hemorrágicos. Em setembro do mesmo ano, aprovou a realização de testes genéticos para os genes CYP2C9 e VKORC1 em pacientes anticoagulados com varfarina (FDA *questions* e FDA NEWS, 17/09/07). Resultados de estudos realizados por Zoler (2008) sugerem que polimorfismos genéticos do CYP2C9 causam interferência significativa no RNI após as duas primeiras semanas de anticoagulação.

No presente estudo, após realização de todos os testes necessários para validar o método bioanalítico, foi realizada a quantificação das amostras dos voluntários e determinado os polimorfismos de todos os voluntários participantes do estudo. Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos a partir das concentrações plasmáticas, principalmente C_{max} e ASC_t, os quais são utilizados para comprovar a bioequivalência entre as formulações.

Diferenças nos valores de C_{max}, entre o medicamento teste e referência, ficaram muito evidentes para os voluntários 1, 18 e 27, e os maiores valores de C_{max} são para os voluntários 1, 15, 18, 27 e 30, após administração do medicamento referência, os

quais aumentaram a dispersão dos dados para esse parâmetro relativo ao medicamento referência.

Já para os valores de ASCt, as diferenças entre os medicamentos teste e referência não foram tão distintas. Entretanto, os valores obtidos para os voluntários 18 e 19 destacam-se dos demais após administração de ambos os medicamentos. Estes foram resultados *outliers* superiores identificados nos gráficos *boxplots*, tanto na escala normal quanto na logarítmica. Os resultados obtidos com a razão da ASCt pela ASCinf indicam que os voluntários 1, 3 e 19 foram aqueles que possuem a eliminação do fármaco mais lenta.

Avaliando os resultados para Cmax e ASCt podemos constatar que existe maior variabilidade para os valores de concentração do que para os valores de área. Justifica-se pela evidência de que a ASC é um valor médio ponderado das concentrações plasmáticas durante o período de observação; enquanto que a Cmax é um valor único e, portanto, é geralmente associada a uma maior variabilidade (MARZO, 2004).

Para todos estes voluntários destacados anteriormente, considerando os parâmetros farmacocinéticos avaliados, os voluntários 1, 3, 18, 19 e 27 possuem polimorfismos que justificam os respectivos achados. Uma particularidade do voluntário 1 é que este possui polimorfismos mutantes para os dois genes estudados, indicando que, se for necessária a utilização de varfarina em tratamento futuro, este deve ser anticoagulado com muita cautela. O voluntário 18 é mutante somente para o gene VKORC1, e os voluntários 3, 19 e 27 são mutantes para o gene CYP2C9, sendo o primeiro em homozigose para o alelo *2.

Considerando os mesmos alelos mutantes foi possível investigar comparativamente a frequência alélica da população estudada com algumas populações avaliadas em outros trabalhos. Para ambos os polimorfismos podemos perceber que há semelhanças com os grupos étnicos dos caucasianos (LEE, 2002; STUART, 2010), apresentando maior proximidade da população estudada aos europeus. Também foi investigada a influência dos resultados de voluntários mutantes na comparação da bioequivalência para um fármaco classificado como de grande variabilidade. No entanto, foram identificadas pequenas diferenças entre os intervalos calculados, e estas não alteraram a interpretação quanto a bioequivalência entre os medicamentos.

Outro resultado relevante presente neste estudo foi a significativa diferença entre os valores de RNI se comparados entre a primeira e segunda fase. Os maiores valores médios, nos tempos de coleta entre 2 e 12 horas, foram para aqueles obtidos na segunda

fase. Este resultado era o esperado, pois ao iniciar o tratamento com anticoagulantes é possível observar um aumento nos valores de RNI, principalmente para pacientes mutantes para CYP2C9 após tratamento por duas semanas (ZOLER, 2008). Entretanto, é importante destacar que nenhum dos voluntários obteve valores dentro do intervalo considerado alvo, de 2 a 3 (SUSANNE, 2005), e nenhum dos voluntários mutantes para CYP2C9 apresentou valores discrepantes na segunda fase do estudo.

Dessa forma, avaliando os intervalos de confiança para a razão das médias do C_{max} e da AS_{Ct} , para as três análises comparativas, pode-se concluir pela bioequivalência média entre os medicamentos deste estudo e que essa avaliação não foi influenciada pela presença de voluntários com distintos polimorfismos para os genes CYP2C9 e VKORC1.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. “**Linear regression for calibration lines revisited: weightings schemes for bioanalytical methods**” Journal of Chromatography B, 774 (2002) 215-222
- AULTON, MICHAEL E., **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª edição, [tradução George González Ortega *et al.*]. – Porto Alegre, 2005. 677 p
- AVRAHAMYACOBI; ERIC MASSON; DANIEL MOROS; DEREK GANES; CLAUDELA POINTE; ZOHREHADOLFATHI; MARCLEBEL; YECHIELGALANDER; DARLENEDOEPNER; TAMAR BLUMBERG; YORAMCOHEM; BARRIELEVITT. “**Who needs individual Bioequivalence Studies for narrow therapeutic index drugs? A case for Warfarin**” J Clin Pharmacol 2000; 40:826-835.
- BLUME, H., MIDHA, K.K., **Report of Consensus Meeting: Bio-international '92. Conference on Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies**. Bad Homburg, Germany, 20-22 May, 1992. Eur. J. Pharm. Sci. 1:165-171.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Esclarecimentos sobre a aplicação da RE nº 899/2003–Validação de Métodos Bioanalíticos**. Brasília, jun. 2008.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 33, de 28 de junho de 2011. “**Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**”. Brasília, 30 de junho 2011.
- BRASIL. DOQ-CGCRE-008 - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. “**Orientações sobre validação de métodos analíticos**”. Revisão: 03, fevereiro de 2010.

BRASIL. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência.**

Volume I. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2002a.

BRASIL. Resolução RDC n° 84, de 19 de março de 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Regulamento Técnico para medicamentos genéricos**”. Diário Oficial da União, Brasília, 20 mar, 2002b.

BRASIL. Resolução RDC n° 135, de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Regulamento Técnico para medicamentos genéricos**”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun, 2003a.

BRASIL. Resolução RE 895, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “**Guia para elaboração de relatório técnico de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência**”. Diário Oficial da União. Brasília, de 02 de junho de 2003b.

BRASIL. Resolução RE n° 397, de 12 de novembro de 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos**”. Diário Oficial da União, Brasília, 16 nov. 2004a.

BRASIL. Resolução RE n° 898, de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência**”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003c.

BRASIL. Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003d.

CAPKA, VLADIMIR; CARTER, SPENCERJ.; VICCARONE, STEPHEN. **Determination of warfarin enantiomers in human plasma using LC/MS/MS in the presence of twelve co-administered drugs and metabolites.** Tandem Labs, Salt Lake City, Utah. October, 2006.

CHELLINI, P. R. **Boas Práticas Estatísticas em Estudos de Bioequivalência com Delineamento Crossover 2X2**. Belo Horizonte, MG. Junho, 2007.

CHOW, S.C.; LIU, J-P. **Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies**. Third edition, New York: Marcel Dekker. 2009.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Editora Campinas, SP: UNICAMP, 1997.

COUMADIN® Varfarina sódica cristalina - Bristow-Myers Squibb Farmacêutica Ltda. 2008. In: Bulário eletrônico da ANVISA. Disponível em: <http://bulario.bsv.br/index>.

DORADO P, BERECZ R, NORBERTO MJ, YASAR U, DAHL ML, LLERENA A. **CYP2C9 genotypes and diclofenac metabolismo in Spanish healthy volunteers**. Eur J Clin Pharmacol 2003; 59:221-5.

EMEA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Evaluation of Medicines for Human Use; CPMP, Committee for Proprietary Medicinal Products. **Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence**. London, 26 July 2001

FDA clears genetic lab test for Warfarin sensitivity. In: U.S. Food and Drug Administration; setembro, 2007. Disponível em: www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01701.htm

FDA Food and Drug Administration Drug Safety Newsletter. Pharmacogenomic sandits role in drug safety., v 1. Issue 2, winter 2008. Disponível em: www.fda.gov/cder/dsn/default.htm

FDA Food and Drug Administration. The FDA Process for Approving Generic Drugs. Continuing Medical/Pharmacy. Buehler, Gary J. october, 2002

HURTZ, MARAHELENA; FIEGENBAUM, MARILU. Farmacogenômica. Cap32, Genômica, organizador editorial Luis Mir. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p.1114

KATZUNG, BERTRAM G. Basic & clinical pharmacology. 9 thed. New York: Lange Medical Books/MacGraw Hill, 2004. 1202p.

KLARCK, K.; CARVALHO, J.F. **Vitamina K: Metabolismo, Fontes e Interação com o Anticoagulante Varfarina.** Revista Brasileira de Reumatologia, V26, n6, p.398-406, nov/dez, 2006

LEE CR, GOLDSTEIN JA, PIEPER JA. **Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data.** Phramacogenetics 2002; 12:251-63.

LIMA MV, RIBEIRO GS, MESQUITA ET, VICTER PR, VIANNA-JORGE R. **CYP2C9 genotypes and the quality of anticoagulation control with warfarin therapy among Brazilian patients.** Eur J Clin Pharmacol 2008;64:9–15.

LINDON, J.C.; TRANTER, G.E.; HOLMES, J.L. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.** Vol one, Part 2 (M-Z), Jan2000

MAREVAN® Varfarina sódica comprimidos –Farmoquímica. In: Anticoagulação via internet. Disponível em: <http://www.sosmarevan.com.br/melhorando.asp>.

MARZO, A.; FIBBIOLI, M.; MARONE, C.; CERUTTI, B. **The degree of predictivity in pilot studies on six subjects in bioequivalence trials.** Pharmacological Research, 49. (2004) 283-286

METZGER, IF, SOUZA-COSTA, DC, TANUS-SANTOS, JE. **Farmacogenética: Princípios, Aplicações e Perspectivas.** Simpósio: Farmacogenética; Capítulo I, Ribeirão Preto, dezembro, 2006. 39(4):515-21.

MEIER, P.C.; ZÜND, R.E. **Statistical methods in analytical chemistry**. 2nd ed. New York: A Wiley-Interscience publication, 2000. v. 153

MONTGOMERY, D.C; PECK, E.A.; VINING, G.G. **Introduction to linear regression analysis**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 2006. 612p.

MONTGOMERY, D.C; RUNGER, G.C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. Tradução de Verônica Calado. 2ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2003.

NIAZI, S. **Handbook of bioequivalence testing. Drugs and the pharmaceutical sciences**; Informa Health Care USA, New York, NY, 2007, 569p.

ORSI, FERNANDA A.; BIZZACCHI, JOYCE M. ANNICHINO; V. DE PAULA, ERICH; OZELO, MARGARETH C.; LANGLEY, MICHAEL R.; WECK, KAREN E. **VKORC1 V66M mutation in African Brazilian patients resistant to oral anticoagulant therapy**. Thrombosis Research 126 (2010) e206 – e 210.

OSMAN, ABDIMAJID, **Studies on warfarin treatment with emphasis on inter-individual variations and drug monitoring**. Faculty of Health Sciences, Linköping University. Suécia, 2007.

PALCIO, L.; FALLA, D.; MEJIA, F.; LEWIS, J.; MARTINEZ, A.; ARCOS-BURGOS, M.; CAMARGO, M. **Pharmacogenetic impact of VKORC1 and CYP2C9 allelic variants on warfarin dose requirements in Hispanic population isolate**. Clin Appl Thromb Hemost, jun 2009.

PREMSTALLER A, OEFINER P J. **Denaturing HPLC of Nucleic Acids**. LC.GC, Califórnia, USA. July, 2002: 2-10.

QIANG GU; YAN KONG; JÖRN SCHNEEDE; YING-BIN XIAO; LIN CHEN; QIAN-JIN ZHONG; XUE-FENG WANG; JIA HAO; BAI-CHENG CHEN; JING-JIN CHEN. **VKORC1-1639G>A, CYP2C9, EPHX1691A>G genotype, body wight, and age are important predictors for warfarin maintenance doses in patients with mechanical heart valve prostheses in southwest China.** Eur J Clin Pharmacol (2010) 66:1217-1227.

REPÚBLICA DOMINICANA, **Boas Práticas Clínicas: Documento das Américas.** IV Conferência Pan-Americana para Harmonização da Regulamentação Farmacêutica. República Dominicana, 2ª edição. 4 de março de 2005

RIEDER M J, REINER A P, GEGER B F, *et al.* **Effect of VKORC1 haplotypes on transcription al regulation and warfarin dose.** N Eng J Med. 2005. 352(22): 2285-93.

SCOTT A STUART, KHASAWNEH RAME, PETER INGA, DESNICK J ROBERT, **Combined CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 frequencies among racial and ethnic groups.** Pharmacogenomics, 2010 June; 11(6): 781-791

SOUZA; S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G., “**A procedure to assess linearity by ordinary least squares method**” Analytica Chimica Acta 552 (2005) 25-35

SOUZA, S.V.C.. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos.** Belo Horizonte, 2007

SULLIVAN-KLOSE TH, GHANAYEM BI, BELL DA, ZHANG ZY, KAMINISKY LS, SHENFIELD GM, *et al.* **The role of the CYP2C9-Leu³⁵⁹ allelic variant in the tolbutamide polymorphism.** Pharmacogenetics 1996; 6:341-9.

SUSANNE JOHASSON; LISOHLSSON; HELENE STENHOFF; KARIN WAHLANDER; MARIE COLLBERG. **No effect of encapsulation on depharmacokinetics on Warfarin.** Biopharmaceutics & Drug Disposition 2005; 26, 121-127

TAUBE J, HALSALL D, BAGLIN T. **Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment.** Blood, 2000 Vol. 96(5). p1816-19.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. **Harmonized guide lines for single – laboratory validation of methods of analysis.** Pure Appl. Chem., v. 74, p. 835-855, 2002.

VERCAIGNI, LAVERNM., ZHANEL, GEORGE G. **Clinical significance of bioequivalence and interchange ability of narrow therapeutic range drugs: focus on warfarins.** J. Pharm. Pharmaceut Sci. 1998, 1 (3): 92-94

VIANNA-JORGE R, PERINI JA, RONDINELLI E, SUAREZ-KURTZ G. **CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians.** Clin Pharmacol Ther 2004; 76:18–26.

WATSON, JAMES D.; MYERS, RICHARD M.; CAUDY, AMY A.; WITKOWSKI, JAN A. CAUDY. **DNA Recombinante – genes e genoma.** [Tradução de Elio Hideo Baba], 1ª edição, 2009.

WADELIUS M, LESLIE Y. CHEN, NICLAS ERIKSSON, SUZANNAH BUMPSTEAD, JILUR GHORI, CLAES WADELIUS, DAVID BENTLEY, RALPH MCGINNIS, PANOS DELOUKAS. **Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism.** Hum Genet (2007) 121:23 –34.

WADELIUS M, SÖRLIN K, OWALLERMAN O, KARLSSON J, YUE Q-Y, MAGNUSSON P K E, WADELIUS C, MELHUS H. **Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors.** The Pharmacogenomics Journal (2004) 4, 40–48.

WILKINSON, GRANT R. **Farmacocinética. Dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação dos fármacos.** [tradução Carla de Mello Vorsatz, *et al.*; revisão técnica, Almir Lourenço da Fonseca]. – Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2005

ZOLER M L. **Genetic effects on warfarin dosing under gofine-tuning.** N. Engl. J. Med. March 6, 2008.

Tabela 1 Medidas farmacocinéticas dos indivíduos para o medicamento referência

Fármaco	Vol	Seq	Tmax	Cmax	Kel	T _{1/2}	ASC _t	ASC _∞
R	1	TR	1,00	1206,11	0,010036	29,9960	32905,8738	52810,8636
R	2	TR	4,00	730,87	0,016938	17,7725	26615,5263	33234,9861
R	3	TR	1,00	678,8	0,009822	30,6486	26549,3700	43654,9063
R	4	TR	3,00	652,52	0,014927	20,1665	24705,9558	32291,4383
R	5	RT	1,75	768,23	0,013362	22,5289	28054,6313	38458,0375
R	6	TR	0,83	747,44	0,012503	24,0767	29883,0804	41795,4564
R	8	TR	3,00	591,3	0,018708	16,0908	19599,2958	23164,0307
R	10	RT	0,33	620,71	0,018734	16,0690	18249,0246	21952,5390
R	11	RT	1,25	669,47	0,015702	19,1718	23520,3217	29597,9904
R	12	RT	6,00	582,91	0,018485	16,2850	22522,0963	27826,3750
R	13	RT	0,67	777,94	0,017098	17,6059	21761,6300	26716,5379
R	14	RT	2,50	686,81	0,013804	21,8070	27448,5338	37241,8818
R	15	RT	0,50	1224,97	0,018753	16,0525	29092,4729	34824,4219
R	16	RT	1,50	722,75	0,023022	13,0760	25706,7217	28995,3748
R	17	TR	2,50	632,97	0,015204	19,7992	23704,2521	31229,8246
R	18	TR	2,50	1209,67	0,013598	22,1374	40166,0629	54483,3100
R	19	RT	1,50	741,28	0,009187	32,7674	36392,9350	61214,1830
R	21	RT	2,00	698,49	0,017871	16,8445	24480,6617	30372,3078
R	22	TR	1,75	905,11	0,020092	14,9823	24451,7083	28621,4370
R	23	TR	4,00	757,43	0,016822	17,8948	27196,7442	34159,5657
R	24	TR	0,83	946,02	0,012797	23,5232	24348,2171	33479,1667
R	25	TR	3,00	718,2	0,016496	18,2484	24805,2821	31465,5995
R	26	TR	2,00	805,78	0,017706	17,0014	28603,7758	34760,9300
R	27	RT	0,67	1095,8	0,012142	24,7929	32124,8783	45575,9558
R	28	TR	1,50	846,34	0,013326	22,5896	27305,5433	37566,6708
R	29	TR	1,00	674,38	0,015454	19,4790	26035,0758	34196,6948
R	30	RT	0,50	1194,79	0,017171	17,5309	31544,4304	38226,4570
R	31	RT	1,75	648,96	0,015941	18,8842	23963,4092	30288,0551
R	30	RT	3,00	662,63	0,017709	16,9990	25613,5938	30882,1956
R	109	TR	2,50	864,71	0,016076	18,7250	31503,0488	39719,4530
R	120	RT	0,33	979,05	0,015011	20,0546	25022,7842	32654,0959

Vol: voluntário; Seq: sequência de aleatorização; Cmax: concentração máxima; Kel: constante de eliminação; T_{1/2}: tempo de meia vida; ASC_t: área sob a curva de zero a t; ASC_∞: área sob a curva de zero a infinito.

Tabela 2 Medidas farmacocinéticas dos indivíduos para o medicamento teste

Fármaco	Vol	Seq	Tmax	Cmax	Kel	T _{1/2}	ASC _t	ASC _∞
T	1	TR	1,75	778,47	0,014693	20,4874	30979,8079	39862,0205
T	2	TR	1,75	730,53	0,017620	17,0847	23829,8567	28904,2561
T	3	TR	10,00	448,67	0,010171	29,5968	25094,5317	40049,7581
T	4	TR	1,25	732,87	0,015806	19,0456	21549,6758	27165,9763
T	5	RT	4,00	584,74	0,014192	21,2108	25843,4133	35464,8376
T	6	TR	1,75	647,46	0,012949	23,2465	27066,6425	37625,3551
T	8	TR	2,50	549,5	0,014908	20,1928	23740,7204	30685,4227
T	10	RT	3,00	431,86	0,017832	16,8819	17989,1654	21885,6371
T	11	RT	2,50	521,77	0,015732	19,1353	22979,7975	29130,4536
T	12	RT	4,00	554,57	0,017710	16,9981	21943,3354	26910,1325
T	13	RT	2,50	491,25	0,016337	18,4261	22580,4638	28547,8361
T	14	RT	4,00	579,49	0,013776	21,8522	24611,5817	34033,2225
T	15	RT	1,75	960,89	0,016639	18,0913	27922,5746	34832,6584
T	16	RT	0,83	943,57	0,024225	12,4265	26490,3808	29522,8004
T	17	TR	2,50	604,5	0,014900	20,2029	20874,7046	27355,1048
T	18	TR	2,00	858,42	0,015146	19,8756	32567,3663	42005,0318
T	19	RT	2,50	730,83	0,005968	50,4439	39080,9654	90024,2545
T	21	RT	1,75	696,84	0,018287	16,4618	23530,9358	28319,1444
T	22	TR	4,00	717,39	0,020065	15,0028	23582,5129	28190,5635
T	23	TR	4,00	684,03	0,016114	18,6813	26459,4579	33328,0326
T	24	TR	1,00	670,64	0,011513	26,1480	23658,6892	34795,2170
T	25	TR	2,00	691,74	0,015733	19,1337	32124,8783	42505,6100
T	26	TR	4,00	778,98	0,019073	15,7834	27471,3517	33104,5789
T	27	RT	1,25	752,6	0,011664	25,8084	34294,9571	50423,1418
T	28	TR	2,50	744,27	0,015468	19,4615	24805,2821	31908,3628
T	29	TR	1,25	730,68	0,017910	16,8083	23218,9013	28380,9458
T	30	RT	2,00	904,75	0,015313	19,6579	30196,5413	40363,4184
T	31	RT	1,50	654,01	0,016207	18,5741	21416,5400	26822,2296
T	30	RT	4,00	759,86	0,017661	17,0451	23921,6558	29710,7633
T	109	TR	4,00	812,64	0,017155	17,5473	28675,2075	36092,1582
T	120	RT	1,75	939,22	0,014697	20,4823	24167,3533	31521,2086

Vol: voluntário; Seq: sequência de aleatorização; Cmax: concentração máxima; Kel: constante de eliminação; T_{1/2}: tempo de meia vida; ASC_t: área sob a curva de zero a t; ASC_∞: área sob a curva de zero a infinito.

Tabela 3 Estatísticas das concentrações plasmáticas ao longo do tempo (horas) do medicamento referência

Tempo	MA	MG	MD	s	EP	CV	MIN	MAX
0,00	3,16	-	0,00	4,1176	0,74	130,1	0	12,36
0,17	106,11	65,930	63,14	169,7884	30,49	160,0	13,16	946,5
0,33	212,43	151,816	149,58	212,9466	38,25	100,2	25,18	979,05
0,50	302,45	205,198	217,70	308,3353	55,38	101,9	29,2	1224,97
0,67	369,17	239,471	228,50	346,2877	62,20	93,8	29,25	1146,67
0,83	375,16	245,753	239,20	328,1816	58,94	87,5	30,32	979,85
1,00	408,34	279,893	323,17	328,8906	59,07	80,5	28,92	1206,11
1,25	431,77	313,512	490,17	295,9036	53,15	68,5	29,54	918,58
1,50	478,05	365,257	592,73	276,0420	49,58	57,7	31,05	882,79
1,75	506,81	397,037	611,52	262,5160	47,15	51,8	28,91	905,11
2,00	513,01	419,215	591,38	244,8330	43,97	47,7	28,31	866,16
2,50	564,79	485,684	621,46	231,8276	41,64	41,0	27,97	1209,67
3,00	578,91	523,112	623,51	203,8909	36,62	35,2	26,79	1180,47
4,00	578,02	566,303	591,04	139,4539	25,05	24,1	74,44	897,89
6,00	493,15	502,470	507,48	82,8860	14,89	16,8	336,74	772,22
8,00	465,32	474,535	471,19	75,3077	13,53	16,2	332,2	706,82
10,00	456,90	466,381	465,05	70,0682	12,58	15,3	340,79	656,86
12,00	425,89	433,651	437,47	72,5608	13,03	17,0	317,09	666,34
16,00	384,15	392,418	391,13	55,3478	9,94	14,4	299,08	566,65
24,00	364,34	371,313	365,66	56,1360	10,08	15,4	261,24	520,21
48,00	249,95	252,596	245,01	47,0541	8,45	18,8	162,42	399,46
72,00	167,39	164,954	163,16	46,5725	8,50	27,8	96,91	292,19
96,00	120,82	116,562	114,42	37,6857	6,77	31,2	66,69	228,03

MA: média aritmética; MG: média geométrica; MD: mediana; s: desvio padrão; EP: erro padrão; CV: coeficiente de variação; MIN: mínimo; MAX: máximo.

Tabela 4 Estatísticas das concentrações plasmáticas ao longo do tempo (horas) do medicamento teste

Tempo	MA	MG	MD	s	EP	CV	MIN	MAX
0,00	3,24	-	0,00	5,7841	1,04	178,4	0,00	26,50
0,17	78,06	63,34	65,99	68,0822	12,23	87,2	12,69	385,80
0,33	163,19	124,90	133,95	158,5900	28,48	97,2	31,17	820,77
0,50	200,42	153,65	170,86	183,4440	32,95	91,5	31,83	908,41
0,67	214,72	162,28	167,38	189,9360	34,11	88,5	29,16	884,03
0,83	248,83	184,75	191,75	210,6187	37,83	84,6	26,44	943,57
1,00	291,64	212,26	210,38	232,5277	41,76	79,7	27,13	876,32
1,25	355,83	257,30	312,93	251,9206	45,25	70,8	26,28	752,60
1,50	402,79	303,65	429,98	261,6384	46,99	65,0	27,09	793,51
1,75	463,83	352,28	555,68	287,1437	51,57	61,9	32,92	960,89
2,00	484,12	407,75	561,54	254,6124	45,73	52,6	90,38	904,75
2,50	521,37	484,86	586,73	188,6358	33,88	36,2	97,97	814,21
3,00	523,62	511,86	577,80	145,9818	26,22	27,9	126,96	754,18
4,00	568,81	578,22	579,49	104,1385	18,70	18,3	414,26	812,64
6,00	477,04	486,08	488,88	79,0461	14,20	16,6	356,74	633,42
8,00	447,67	455,89	451,78	74,9872	13,47	16,8	318,59	589,23
10,00	438,53	447,85	440,45	65,2654	11,72	14,9	338,67	571,30
12,00	411,71	419,73	406,83	65,4604	11,76	15,9	310,79	541,90
16,00	372,31	378,87	363,47	63,7991	11,46	17,1	280,19	528,14
24,00	350,01	356,72	352,96	53,8079	9,66	15,4	258,97	476,22
48,00	236,70	238,55	234,15	49,2846	8,85	20,8	176,38	415,40
72,00	163,03	160,99	154,07	46,2793	8,31	28,4	104,63	338,95
96,00	117,11	112,41	107,44	43,3306	7,78	37,0	69,48	304,01

MA: média aritmética; MG: média geométrica; MD: mediana; s: desvio padrão; EP: erro padrão; CV: coeficiente de variação; MIN: mínimo; MAX: máximo.

Tabela 5 Medidas de RNI dos voluntários em dez coletas (horas) na fase 1

Vol.	-0:30	1	2	4	8	12	24	48	72	96
1	1,23	1,22	1,13	1,15	1,09	1,16	1,22	1,11	1,00	1,00
2	1,11	1,07	1,05	1,04	1,00	1,04	1,11	1,00	1,00	1,00
3	1,28	1,18	1,11	1,11	1,25	1,14	1,14	1,05	1,00	1,00
4	1,32	1,29	1,20	1,25	1,21	1,18	1,53	1,08	1,13	1,00
5	1,27	1,22	1,12	1,17	1,16	1,21	1,31	1,30	1,15	1,12
6	1,07	1,02	1,00	1,00	1,00	1,00	1,07	1,00	1,00	1,00
8	1,28	1,25	1,13	1,14	1,21	1,13	1,18	1,09	1,02	1,00
10	1,22	1,17	1,11	1,22	1,25	1,11	1,42	1,02	1,01	1,01
11	1,31	1,32	1,28	1,37	1,30	1,29	1,40	1,27	1,12	1,09
12	1,22	1,18	1,07	1,15	1,27	1,16	1,25	1,06	1,08	1,00
13	1,12	1,09	1,06	1,02	1,05	1,06	1,34	1,00	1,00	1,00
14	1,28	1,21	1,19	1,20	1,14	1,26	1,26	1,08	1,04	1,03
15	1,27	1,05	1,00	1,00	1,06	1,05	1,21	1,01	1,00	1,00
16	1,31	1,46	1,25	1,27	1,22	1,23	1,34	1,14	1,15	1,06
17	1,07	1,03	1,05	1,00	1,08	1,00	1,06	1,00	1,00	1,00
18	1,46	1,38	1,26	1,29	1,21	1,39	1,40	1,20	1,06	1,00
19	1,17	1,23	1,20	1,19	1,28	1,25	1,27	1,13	1,06	1,00
21	1,56	1,30	1,12	1,13	1,08	1,27	1,29	1,09	1,02	1,00
22	1,00	1,02	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
23	1,26	1,31	1,31	1,20	1,27	1,29	1,42	1,27	1,09	1,05
24	1,60	1,28	1,13	1,20	1,18	1,20	1,20	1,04	1,00	1,00
25	1,09	1,04	1,03	1,06	1,00	1,04	1,04	1,00	1,00	1,00
26	1,28	1,19	1,22	1,27	1,16	1,29	1,42	1,21	1,09	1,03
27	1,11	1,19	1,09	1,08	1,14	1,26	1,17	1,00	1,00	1,00
28	1,27	1,16	1,11	1,11	1,08	1,26	1,25	1,11	1,00	1,00
29	1,22	1,11	1,09	1,07	1,18	1,18	1,29	1,12	1,00	1,02
30	1,32	1,27	1,32	1,32	1,29	1,28	1,42	1,19	1,11	1,03
31	1,11	1,00	1,09	1,00	1,00	1,00	1,00	1,07	1,00	1,00
30	1,13	1,05	1,16	1,12	1,09	1,17	1,13	1,05	1,00	1,00
109	1,42	1,39	1,23	1,31	1,30	1,32	1,40	1,25	1,11	1,10
120	1,46	1,06	1,04	1,12	1,12	1,12	1,20	1,00	1,00	1,00

Vol: voluntário.

Tabela 6 Medidas de RNI dos voluntários em dez coletas (horas) na fase 2

Vol.	-0:30	1	2	4	8	12	24	48	72	96
1	1,06	1,16	1,23	1,28	1,20	1,30	1,20	1,02	*	1,00
2	1,02	1,07	1,06	1,28	1,23	1,27	1,11	1,00	1,00	1,00
3	1,14	1,23	1,16	1,22	1,30	1,21	1,19	1,00	1,03	1,00
4	1,27	1,26	1,28	1,31	1,34	1,41	1,29	1,09	1,11	1,11
5	1,16	1,25	1,22	1,21	1,18	1,30	1,33	1,19	1,11	1,05
6	1,00	1,01	1,02	1,02	1,04	1,16	1,29	1,00	1,00	1,00
8	1,12	1,29	1,25	1,19	1,20	1,27	1,30	1,00	1,01	1,00
10	1,00	1,19	1,18	1,28	1,38	1,26	1,16	1,00	1,01	1,00
11	1,25	1,31	1,21	1,28	1,30	1,29	1,29	1,10	1,11	1,08
12	1,15	1,21	1,26	1,20	1,19	1,26	1,19	1,00	1,10	1,00
13	1,15	1,26	1,21	1,25	1,27	1,69	1,35	1,00	1,01	1,00
14	1,22	1,32	1,30	1,47	1,32	1,38	1,37	1,09	1,04	1,01
15	1,03	1,06	1,14	1,06	1,11	1,17	1,00	1,00	1,00	1,00
16	1,25	1,31	1,39	1,40	1,34	1,41	1,30	1,11	1,29	1,15
17	1,00	1,11	1,14	1,06	1,07	1,11	1,14	1,00	1,00	1,00
18	1,18	1,35	1,47	1,50	1,43	1,31	1,35	1,03	1,12	1,00
19	1,25	1,27	1,49	1,22	1,26	1,30	1,28	1,01	1,09	1,03
21	1,20	1,19	1,26	1,41	1,30	1,30	1,32	1,01	1,12	1,00
22	1,00	1,00	1,06	1,06	1,07	1,09	1,08	1,00	1,00	1,00
23	1,30	1,23	1,30	1,37	1,26	1,21	1,40	1,14	1,29	1,03
24	1,28	1,16	1,22	1,25	1,22	1,30	1,26	1,00	1,05	1,00
25	1,11	1,12	1,23	1,18	1,09	1,23	1,11	1,00	1,00	1,00
26	1,41	1,51	1,35	1,47	1,27	1,37	1,49	1,19	1,24	1,10
27	1,26	1,30	1,28	1,29	1,22	1,30	1,26	1,00	1,00	1,00
28	1,21	1,22	1,29	1,30	1,23	1,30	1,20	1,02	1,13	1,00
29	1,16	1,20	1,26	1,23	1,18	1,31	1,33	1,09	1,15	1,00
30	1,32	1,37	1,34	1,34	1,23	1,40	1,30	1,06	1,06	1,07
31	1,02	1,00	1,03	1,00	1,02	1,07	1,00	1,00	1,00	1,00
30	1,15	1,08	1,17	1,02	1,16	1,17	1,16	1,00	1,03	1,00
109	1,19	1,29	1,32	1,25	1,30	1,35	1,25	1,09	1,23	1,06
120	1,07	1,21	1,23	1,14	1,21	1,26	1,21	1,00	1,00	1,00

Vol: voluntário; *: ausência de leitura.