

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL – INOVAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

IRILDA DE OLIVEIRA COSTA

ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES DE ATENOLOL
EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS E GENOTIPAGEM DOS
POLIMORFISMOS DOS GENES ECA E CYP2D6*4

Belo Horizonte – MG

2010

IRILDA DE OLIVEIRA COSTA

ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES DE ATENOLOL
EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS E GENOTIPAGEM DOS
POLIMORFISMOS DOS GENES ECA E CYP2D6*4

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Inovação Biofarmacêutica, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati - UFMG

Belo Horizonte

2010

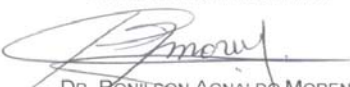
**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES DE
ATENOLOL EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS E
GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DOS GENES ECA E CYP2D6*4**

IRILDA DE OLIVEIRA COSTA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 13 de agosto de 2010, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:


DR. ALESSANDRO CLAYTON FERREIRA
INSTITUTO HERMES PARDINI


DR. FÁBIO ALESSANDRO PROENÇA DE BARROS
CORE-CLINICAL RESEARCH


DR. RONILSON AGNALDO MORENO
UNICAMP E SYNCHROPHAR


PROFA. DRA. ALICE MACHADO DA SILVA
DEP. BIOLOGIA GERAL/UFBA


PROF. DR. FRÉDÉRIC JEAN FRÉZARD
ICB/UFMG


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

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

Belo Horizonte, 13 de agosto de 2010.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar ao meu lado e mesmo nas horas mais incertas iluminar o meu caminho.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Tagliati, pela constante orientação e por todos os ensinamentos que possibilitaram a conclusão deste trabalho.

A Maria Joana, minha mãe, por seu apoio incondicional e por sempre acreditar em mim.

Ao Wander Duarte Machado, meu marido, por todo amor.

Ao Rogério Antonio, pelas inúmeras discussões estatísticas, por toda a colaboração e amizade.

Ao Thales Ribeiro Cardoso, pela colaboração em todo o trabalho.

A Cláudia de Souza Pedrosa por toda contribuição para a execução deste trabalho.

Ao Instituto Hermes Pardini, pelo apoio institucional.

Ao Dr. Alessandro Ferreira, pelo incentivo, colaboração e ajuda nas análises estatísticas.

A todos da Synchrophar apoiadora do projeto, em especial ao Dr. Ney Carter Borges.

A Multilab que gentilmente concedeu a execução do projeto.

A todos familiares e também aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“O caminho para a vida é de quem guarda o ensino.”

Provérbios 10:17

RESUMO

Vários foram os fatores envolvidos na adoção de políticas de medicamentos que culminassem com o acesso da população aos mesmos. Sendo assim, com a aplicação da Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro de 1999, iniciaram-se os estudos de bioequivalência, que referem-se basicamente à comparação das principais medidas farmacocinéticas observadas no experimento, relativas aos produtos a serem testados. Por outro lado, a farmacogenética estuda as diferenças genéticas dos indivíduos na biotransformação das drogas. Os polimorfismos genéticos contribuem para a formação de diferentes perfis genotípicos que constituem a base para variações individuais e suscetibilidade aos fármacos. Nesse contexto, foi realizada a validação de método bioanalítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM/EM) com extração líquido-líquido para o atenolol e foi realizada a genotipagem dos polimorfos dos genes Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e metabolizador com atividade enzimática reduzida de CYP2D6 (CYP2D6*4) nos voluntários participantes do estudo de bioequivalência e foram determinadas as respectivas frequências genotípicas e alélicas. A metodologia bioanalítica validada de acordo com normas do FDA e ANVISA demonstrou-se adequada à avaliação das formulações de atenolol (teste e referência), sendo os medicamentos bioequivalentes. Nos resultados obtidos para os polimorfismos, pode-se concluir que existe diferença entre o medicamento teste e referência, mas essa não comprometeu o resultado da bioequivalência entre as duas formulações.

Palavras-chave: Atenolol, bioequivalência, CLAE-EM/EM, CYP2D6*4, ECA, polimorfismo.

ABSTRACT

There were several factors involved in the adoption of drug policies that could culminate with the population's access to them. Thus, with the application of law n° 9.787 from February 10, 1999, began the bioequivalence studies, which basically refer to the comparison of the main pharmacokinetic measures observed in the experiment, for products to be tested. Moreover, the pharmacogenetics studies the genetic differences of the individuals in drug biotransformation. The genetic polymorphism contribute to the formation of different genotypic patterns that form the basis for individual variations and susceptibility to drugs. In that context, it was validated the bioanalytical method by high performance liquid chromatography coupled mass spectrometry (LC-MS/MS) with liquid-liquid extraction for atenolol and was performed the genotyping of polymorphs from angiotensin converting enzyme (ACE) and metabolizer with reduced enzyme activity of CYP2D6 (CYP2D6*4) genes, in volunteers participating in the bioequivalence study and their respective genotypic and allelic frequencies were determined. The validated bioanalytical method according to FDA standards and ANVISA proved to be adequate the assessment of atenolol formulations (test and reference), when the drugs are bioequivalent. On the results obtained for the polymorphisms it can be concluded that there is a difference between the test and reference drug, but it did not affect the outcome of the bioequivalence between the two formulations.

Key words: Atenolol, bioequivalence, LC-MS/MS, CYP2D6*4, ACE, polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

1 Representação esquemática dos principais parâmetros farmacocinéticos de um estudo de bioequivalência.....	27
2 Componentes básicos do sistema de espectrometria de massas	36
3 Sistema do cone da forma ortogonal (<i>Z-spray</i>) (www.micromass.co.uk).....	38
4 Arquitetura típica de um triplo quadrupolo.....	39
5 a: Fórmula estrutural do atenolol b: Fórmula estrutural do nadolol (padrão interno).....	44
6 Modelo do teste de interferência iônica.....	62
7 Cromatograma ilustrando a análise de atenolol e nadolol (padrão interno) extraídos do plasma (tempo médio)	72
8 Cromatogramas para o teste de especificidade; a: Branco <i>pool</i> de plasma, b: Limite inferior de quantificação extraído.....	74
9 Teste de <i>carry-over</i> ; a: limite superior de quantificação (2000 ng/mL).....	75
10 Cromatogramas para o teste de <i>cross-talk</i> ; a: limite superior de quantificação (2000 ng/mL) sem padrão interno, b: amostra zero.....	76
11 Curva de calibração para atenolol.....	79
12 Gráfico de dispersão dos resíduos para diferentes ponderações a: ponderação 1/x, b: ponderação 1/x ²	81
13 Cromatogramas típicos do teste de supressão; a: limite inferior de quantificação com infusão de solução diluente, b: sobreposição entre cromatogramas de limite inferior de quantificação e branco de <i>pool</i> de plasma normal com infusão de mistura de atenolol e nadolol.....	86
14 Curva média da concentração plasmática de atenolol de 31 voluntários sadios que participaram do estudo de bioequivalência entre os produtos atenolol (medicamento teste) e Atenol [®] (medicamento referência) <i>versus</i> tempo (h).....	95

15 Distribuição dos grupos de genótipos do polimorfismo da ECA.....	97
16 Contribuição dos autovalores para os componentes principais do medicamento referência.....	104
17 Contribuição das variáveis para o medicamento referência.....	104
18 Contribuição dos autovalores para os componentes principais do medicamento teste.....	107
19 Contribuição das variáveis para o medicamento teste.....	108
20 Comparação entre os autovetores das variáveis para o medicamento referência e medicamento teste para o primeiro componente principal.....	109
21 Comparação entre os autovetores das variáveis para o medicamento referência e medicamento teste para o segundo componente principal.....	110
22 Comparação entre os autovetores das variáveis para o medicamento referência e medicamento teste para o terceiro componente principal.....	110

LISTA DE TABELAS

1 Parâmetros para a validação de métodos bioanalíticos	40
2 Tempos de retenção típicos.....	72
3 Valores de concentração de controles de qualidade.....	77
4 Valores de concentração de controles de qualidade incluindo os valores com desvio superior a 15%.....	77
5 Valores de concentração de limite inferior de quantificação.....	78
6 Valores de concentração de listas de validação.....	79
7 Curva de calibração.....	83
8 Recuperação de atenolol em plasma normal.....	84
9 Recuperação de atenolol em diferentes matrizes.....	84
10 Recuperação de nadolol em plasma normal.....	85
11 Recuperação de nadolol em diferentes matrizes.....	86
12 Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol.....	90
13 Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol.....	91
14 Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol.....	91
15 Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol.....	92
16 Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol.....	92

17	Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol.....	93
18	Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol.....	93
19	Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol.....	94
20	Estatísticas das medidas farmacocinéticas da formulação Referência.....	94
21	Estatísticas das medidas farmacocinéticas da formulação Teste.....	95
22	Medidas farmacocinéticas das médias das concentrações plasmáticas dos medicamentos de referência (R) e teste (T).....	95
23	Resultados da Enzima Conversora de Angiotensina.....	96
24	Resultados de CYP2D6*4.....	100
25	Autovetores dos três primeiros componentes principais do medicamento referência.....	103
26	Autovalores e percentuais de variância explicados pelos componentes principais para o medicamento referência.....	103
27	Autovetores dos três primeiros componentes principais.....	106
28	Autovalores e percentuais de variância explicados pelos componentes principais para o medicamento teste.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALIQ: Abaixo do limite inferior de quantificação

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: Ionização química

ASC: Área sob a curva

ASC_{0-∞}: Área sob a curva do tempo zero ao último infinito

ASC_{0-t}: Área sob a curva do tempo zero ao tempo t

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CONEP: Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

Cmax: Concentração plasmática máxima

CQ: Controle de qualidade

CQA: Controle de qualidade baixo

CQB: Controle de qualidade médio

CQC: Controle de qualidade alto

Ct: Concentração do fármaco determinada experimentalmente

CV: Coeficiente de variação

CYP: Citocromo

CYP2D6*4: Citocromo P450 isoforma 2D6 alelo 4

D: Deleção

D: dose administrada

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ECA: Enzima conversora de angiotensina

EM: Metabolizadores homozigóticos extensos

EM/EM: Espectrometria de massas

ESI: *Electrospray*

F: Fração absorvida

FAB: Bombardeamento rápido dos átomos

FD: quantidade do fármaco absorvido

FDA: *Food and Drug Administration*

I: Inserção

IC: Intervalo de confiança

IM: Metabolizador intermediário

IMC: Índice de massa corporea

Ke: constante de velocidade de eliminação do fármaco

LIQ: Limite inferior de quantificação

LSQ: Limite superior de quantificação

MRM: monitoramento de reações múltiplas
M/Z: Relação massa/carga
PCR: Técnica de reação em cadeia da polimerase
PM: Pobres metabolizadores
Q1: Quadrupolo 1
Q2: Quadrupolo 2
Q3: Quadrupolo 3
RDC: Resolução
RE: Resolução
RNA: Ácido ribonucléico
SNP: Single nucleotide polymorphism
T1/2: Tempo de meia vida
TA: Tampão
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TBE: Tampão
TEMED: Tampão tetramethylethylenediamine
Tmax: Tempo para atingir o Cmax
UV-VIS: Ultravioleta e visível
Vd: Volume de distribuição
VNTR: Variable number of tandem repeats

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Política dos medicamentos genéricos.....	20
2.2 Biodisponibilidade e bioequivalência.....	22
2.3 Planejamento de estudos de bioequivalência.....	23
<u>2.3.1 Etapa clínica.....</u>	24
<u>2.3.2 Etapa analítica.....</u>	25
<u>2.3.3 Etapa estatística.....</u>	26
2.4. Metodologias de quantificação de fármacos em fluidos biológicos...29	
<u>2.4.1 Métodos cromatográficos.....</u>	30
<u>2.4.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência</u>	31
<u>2.4.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas</u>	35
<u>2.4.2.1 Princípios da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.....</u>	35
<u>2.4.2.2 Representação esquemática do espectrômetro de massas.....</u>	38
<u>2.4.3 Validação de métodos bioanalíticos.....</u>	39
2.5 Métodos de extração.....	41
<u>2.5.1 Extração líquido-líquido.....</u>	43
2.6 Atenolol.....	43
2.7 Polimorfismo.....	46
<u>2.7.1 Biotransformação de drogas.....</u>	47
<u>2.7.2 Marcador molecular.....</u>	47
<u>2.7.3 Isoformas do citocromo p450.....</u>	49
<u>2.7.4 Citocromo p450 isoforma 2D6.....</u>	51
2.7.5 Enzima conversora de angiotensina	52
3 OBJETIVOS.....	54
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 Método bioanalítico	55
<u>4.1.1 Substâncias químicas e reagentes.....</u>	55
<u>4.1.2 Condições de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.....</u>	55

<u>4.1.3 Preparação dos padrões de calibração e controles de qualidade</u>	56
<u>4.1.4 Procedimento de extração</u>	56
<u>4.1.5. Validação do método</u>	57
<u>4.1.5.1 Especificidade</u>	57
<u>4.1.5.2 Carry-over</u>	57
<u>4.1.5.3 Cross-talk</u>	58
<u>4.1.5.4 Precisão e exatidão</u>	58
<u>4.1.5.5 Limite inferior de quantificação</u>	59
<u>4.1.5.6 Linearidade</u>	59
<u>4.1.5.7 Recuperação</u>	60
<u>4.1.5.8 Teste de interferência iônica</u>	62
<u>4.1.5.9 Estabilidade</u>	63
<u>4.1.5.10 Aplicação do método</u>	63
<u>4.1.5.10.1 Protocolo clínico</u>	63
<u>4.1.5.10.2 Análise farmacocinética</u>	64
4.2 Determinação de enzima conversora de angiotensina e citocromo p450 isoforma 2D6 alelo 4	65
<u>4.2.1 Citocromo p450 isoforma 2D6 alelo 4</u>	65
<u>4.2.1.1 Extração de ácido desoxirribonucléico</u>	65
<u>4.2.1.2 Amplificação para o alelo 4 do citocromo p450 isoforma 2D6 e para enzima conversora de angiotensina</u>	65
<u>4.2.1.3 Digestão do produto de PCR - corrida em gel para o alelo 4 do citocromo p450 isoforma 2D6</u>	66
<u>4.2.1.4 Detecção e eletroforese para o alelo 4 do citocromo p450 isoforma 2D6</u>	66
<u>4.2.1.5 Identificação do alelo 4 do citocromo p450 isoforma 2D6</u>	66
<u>4.2.1.6 Detecção e eletroforese em gel de agarose para enzima conversora de angiotensina</u>	69
<u>4.2.1.7 Identificação da enzima conversora de angiotensina</u>	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 Condições de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas	71
5.2 Procedimento de extração	73
5.3 Validação do método	73

5.3.1 Especificidade	73
5.3.2 Carry-over	74
5.3.3 Cross-talk	75
5.3.4 Precisão e exatidão	77
5.3.5 Limite inferior de quantificação	78
5.3.6 Linearidade	78
5.3.6.1 Análise do modelo de regressão linear	80
5.3.6.2 Parâmetro de detecção	83
5.3.7 Recuperação	83
5.3.8 Teste de Interferência iônica	86
5.3.9 Estabilidade	87
5.3.9.1 Estabilidade de pós-processamento	88
5.3.9.2 Estabilidade de congelamento/descongelamento	88
5.3.9.3 Estabilidade a curto prazo	88
5.3.9.4 Estabilidade a longo prazo	88
5.3.9.5 Estabilidade em solução-mãe de atenolol	89
5.3.9.6 Estabilidade em solução-mãe de nadolol	89
5.3.9.7 Estabilidade em solução de trabalho para atenolol em temperatura ambiente	89
5.3.9.8 Estabilidade em solução de trabalho para nadolol em temperatura ambiente	89
5.4 Aplicação do método	89
5.5 Análise descritiva das medidas farmacocinéticas	94
5.6 Resultados de enzima conversora de angiotensina	96
5.7 Resultados de citocromo p450 isoforma 2D6 alelo 4	100
5.8 Análise dos componentes principais	101
5.9 Comparação entre medicamento referência e medicamento teste ...	109
6 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ANEXO A	121
ANEXO B	122
ANEXO C	123
ANEXO D	124
ANEXO E	125

1 INTRODUÇÃO

A adoção da Política Nacional de Medicamentos Genéricos pelo Governo Federal (Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro de 1999) envolve a produção de medicamentos de melhor qualidade, mais seguros e eficazes, comprovados através da realização de testes de equivalência farmacêutica e bioequivalência. Tal fato contribuiu para aumento do acesso aos medicamentos e fortaleceu a indústria nacional através do desenvolvimento tecnológico.

Os estudos de biodisponibilidade iniciaram-se no final da década de 40, quando surgiram os primeiros estudos para determinação de concentrações sanguíneas de fármacos (KANO, 2002). Em 1977, a *Food and Drug Administration* (FDA) editou as primeiras diretrizes para a realização de estudos de bioequivalência que foram mais tarde ampliadas a partir do Ato Waxman-Hatch, de 1984.

Considera-se biodisponibilidade como sendo a taxa e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível para exercer seu efeito farmacológico. A biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do princípio ativo da droga em sangue total, soro, plasma ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo (BRASIL, 2002a; BOLANOS, 2004; CRAIG & STITZEL, 2005).

Demonstrar a bioequivalência implica, indiretamente, em evidenciar que dois medicamentos testados são terapeuticamente equivalentes e podem ser usados indistintamente, ou seja, são intercambiáveis. Para a bioequivalência devem ser avaliados parâmetros farmacocinéticos. Esses parâmetros podem ser estimados a partir de um perfil concentração-tempo da droga (BRASIL, 2003c; BOLANOS, 2004; GRAIG & STILTZEL, 2005).

Segundo a resolução da ANVISA, RDC nº 84/02 e RDC nº 135/03, que estabelecem os critérios para provas de Bioequivalência de medicamentos

genéricos, essas deverão contemplar três etapas: clínica, analítica e estatística (BRASIL, 2002c e 2003e).

Vários foram os fatores envolvidos na adoção de políticas de medicamentos que culminassem com o acesso da população aos mesmos. Dentre esses, podemos citar o aumento na expectativa de vida da população, a partir do século passado. Sendo, ainda, esse aumento acompanhado de alterações no estilo de vida e nos hábitos alimentares, culminando numa elevação da incidência de doenças cardiovasculares e, conseqüentemente, no aumento da necessidade de desenvolvimento de novas terapias farmacológicas (SANDRIN, *et al.*, 2006).

Atenolol é uma droga que pertence ao grupo dos beta bloqueadores, classe de drogas usada principalmente em doenças cardiovasculares (WADWORTH *et al.*, 1991). Introduzida em 1976, o atenolol foi desenvolvido como um substituto para o propranolol no tratamento da hipertensão. A hipertensão é uma condição clínica na qual a pressão sanguínea em repouso excede constantemente 140/90 mm Hg, conforme definido pela Organização Mundial de Saúde. A hipertensão é um fator de risco para ataques cardíacos, infarto e sérios danos renais (LEITE *et al.*, 2006).

Um dos mais importantes achados em pacientes hipertensos foi obtido em estudos sobre o polimorfismo de inserção (I) / deleção (D) do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA). STAESSEN *et al.*, (1997) foram os primeiros a demonstrar que o genótipo DD estava significativamente associado à hipertensão arterial.

A literatura tem mostrado que o estudo de polimorfismos genéticos na predição do risco em doenças complexas e multifatoriais pode ser um grande desafio. Uma única substituição de nucleotídeo em um gene candidato pode ser insuficiente para demonstrar seu efeito em termos individuais. Entretanto, quando esse mesmo polimorfismo apresentar freqüência populacional considerável, seu impacto poderá ser mais relevante (BIOLO & ROHDE, 2004).

Dessa forma, considerando que: 1-estudos de variações individuais na capacidade de absorção e/ou metabolização de xenobióticos já identificaram inúmeros polimorfismos genéticos (SNIDER *et al.*, 2004; ANDERSON, 2008); 2- a correlação de estudos genéticos com os resultados farmacocinéticos de estudo de bioequivalência trará informações valiosas para a compreensão dos fatores que interferem na absorção, metabolização e excreção dos fármacos, bem como a grande variabilidade observada nas concentrações plasmáticas desses produtos nos estudos de bioequivalência (FDA, 2007), o trabalho foi proposto para avaliar como a variabilidade genética contribui para a variabilidade da resposta ao atenolol em um estudo de bioequivalência de forma integrada fazendo o cruzamento dos resultados farmacocinéticos com a genotipagem.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Política dos medicamentos genéricos

Até pouco tempo, o Brasil não reconhecia patentes de medicamentos. A cópia era permitida e podia ocorrer simultaneamente ao lançamento do produto no mercado internacional sem exigência de testes de equivalência (equivalência farmacêutica e/ou terapêutica). Dessa forma, não houve desenvolvimento de medicamentos genéricos no Brasil, apenas dos medicamentos similares. A partir de 1999, o Brasil passou a respeitar patentes na área de medicamentos e instituiu o genérico. Essas patentes são concedidas por 20 anos, aos respectivos laboratórios que pesquisam um princípio ativo e documentam cientificamente e clinicamente suas propriedades, estabelecendo parâmetros de utilização do produto. Vencido o prazo, essa tecnologia passa a ser de domínio público, quando poderão ser registrados medicamentos genéricos (BRASIL, 2001a).

O ponto central dessas ações está inserido entre as diretrizes da Política Nacional de Medicamentos, aprovada em outubro de 1998 Portaria GM n° 3.916/98, instrumento que passou a nortear todas as ações do Ministério da Saúde, na área de medicamentos para o setor público. Assim, em 10 de fevereiro de 1999, com a Lei n° 9.787, estabeleceu-se as bases legais para os medicamentos genéricos e atribuições de poderes à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para regulamentação das condições de registro e controle de qualidade. Até então, não existiam genéricos no país, somente medicamentos de marca e similares, utilizando a denominação genérica (BEDOR, 2007; BRASIL, 2001a).

Os medicamentos genéricos apresentam vantagens como:

- Oferecer à população medicamentos de melhor qualidade, mais seguros e eficazes, comprovados através da realização de testes de equivalência farmacêutica e bioequivalência;

- Disponibilizar medicamentos de menor preço, visto que os fabricantes de genéricos não precisam investir em pesquisa para o seu desenvolvimento e nem em propaganda;
- Reduzir os preços dos medicamentos de referência, com a entrada de medicamentos concorrentes (genéricos);
- Contribuir para aumento do acesso aos medicamentos;
- Fortalecer a indústria nacional;
- Mudar o comportamento dos profissionais de saúde (prescritores e dispensadores);
- Proporcionar o desenvolvimento tecnológico das indústrias e, conseqüentemente, do país (BRASIL, 2001a).

A indústria de medicamentos genéricos teve origem na década de 60, por iniciativa do governo dos Estados Unidos – primeiro país a adotar essa política – onde os medicamentos genéricos representam, atualmente, 72% do receituário médico e entram no mercado, em média, três meses após expiração da patente. Há mais de 20 anos, muitos países da Europa também adotaram a Política dos Genéricos (GONÇALVES, 2005).

Os genéricos são bem aceitos nos Estados Unidos, Canadá, Dinamarca, Alemanha, Reino Unido e Holanda. Estados Unidos, Japão e Alemanha representam 60% do mercado mundial de genéricos. Outros países de destaque na comercialização de medicamentos genéricos são: Reino Unido (50%), Dinamarca (22%), Holanda (14,5%), Áustria (8,7%), Finlândia (7,8%), Itália (7,5%) e Bélgica (5,9%) (BRASIL, 2001a).

Muitos países têm adotado políticas agressivas de promoção dos genéricos, como forma de propiciar à população medicamentos com preços mais acessíveis e reduzir gastos com a Assistência Farmacêutica (GONÇALVES, 2005).

A adoção da Política Nacional de Medicamentos Genéricos pelo Governo Federal envolve a produção, a garantia da qualidade, a prescrição, a

dispensação e o uso dos medicamentos genéricos, tudo constitui um pilar indispensável para o uso racional de medicamentos no país (BEDOR, 2007).

2.2 Biodisponibilidade e bioequivalência

Os estudos de biodisponibilidade iniciaram-se no final da década de 40, com a introdução do conceito de disponibilidade biológica. Assim, a partir da década de 50, surgiram os primeiros estudos para determinação de concentrações sanguíneas de fármacos (KANO, 2002; BRASIL, 2002a). No início da década de 60, constataram-se diferenças de biodisponibilidade de importantes agentes terapêuticos como a prednisona, hormônios tireoidianos, varfarina, digoxina, cloranfenicol e tetraciclina (GLEITER *et al.*, 1998). Tal fato contribuiu para o desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis que permitissem a quantificação de drogas ou metabólitos, inicialmente na urina, e posteriormente no plasma, possibilitando a avaliação e comparação da biodisponibilidade de diferentes formulações em voluntários, bem como a demonstração de que diferenças significativas entre estas podem ocorrer (BRASIL, 2002a).

Em 1977, a *Food and Drug Administration* (FDA) editou as primeiras diretrizes para a realização de estudos de bioequivalência que foram mais tarde ampliadas do Ato *Waxman-Hatch*, de 1984, o qual concedia à FDA poderes para autorizar a aprovação de drogas genéricas sem ensaios clínicos de segurança ou eficácia, desde que a droga fosse bioequivalente ao produto inovador (BRASIL, 2001b, 2002a, 2003f e 2005b).

No Brasil, houve grande salto nos trabalhos científicos relacionados à farmacologia clínica, através da realização de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, que pode ser creditado à Lei dos genéricos nº 9787/99, quando da implementação da nova política de medicamentos genéricos.

Atualmente, os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência constituem um dos temas mais debatidos nas áreas farmacêutica e médica. Nos últimos 28 anos, houve, provavelmente, o maior número de publicações e de encontros científicos que qualquer outro tópico da biofarmácia (GLEITER *et al.*, 1998).

O termo biodisponibilidade é, na verdade, uma contração de disponibilidade biológica. Considera-se como biodisponibilidade a taxa e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível para exercer seu efeito farmacológico. Considerando-se que a quantidade do fármaco contida no fluido biológico está em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do princípio ativo da droga em sangue total, soro, plasma ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Quando duas formulações ou preparações farmacêuticas exibem a mesma biodisponibilidade são chamadas de bioequivalentes. A biodisponibilidade comparativa entre duas formulações administradas como doses únicas, a partir de dados de concentrações sanguíneas, deve ser determinada a partir dos valores de concentração máxima atingida (C_{max}) pela espécie farmacologicamente ativa e a área sob a curva (ASC). Em estudos que comparam formulações orais, os tempos de coleta de amostras devem ser idênticos. A variabilidade individual na resposta a um medicamento é acompanhada de uma variabilidade no comportamento farmacocinético (BEDOR, 2007).

2.3 Planejamento de estudos de bioequivalência

A realização do teste de bioequivalência deve ser precedida, necessariamente, pela realização do teste de equivalência farmacêutica. A comparação dos perfis de dissolução do fármaco a partir dos medicamentos em estudo, antes da realização do teste de bioequivalência, também é exigida. Entretanto, a demonstração da semelhança entre os perfis de dissolução *per se* não qualifica os produtos como bioequivalentes (SHARGEL & YU, 1999).

Os medicamentos a serem submetidos ao estudo de biodisponibilidade/bioequivalência deverão, inicialmente, ser analisados segundo sua monografia inscrita na Farmacopéia Brasileira e, na falta desta, em outros códigos autorizados pela legislação vigente (BRASIL, 2002c).

Segundo a resolução da ANVISA, RDC n° 135/03, que estabelece os critérios para provas de bioequivalência de medicamentos genéricos, o estudo deverá contemplar três etapas: clínica, analítica e estatística, e devem ser planejados conforme o GUIA PARA ELABORAÇÃO DE PROTOCOLO DE ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA/BIOEQUIVALÊNCIA (BRASIL, 2002c e 2003e).

2.3.1 Etapa clínica

Na etapa clínica devem ser estabelecidos o cronograma de coleta das amostras (deve contemplar um tempo igual a 3-7 vezes a meia vida de eliminação), de acordo com o tipo de forma farmacêutica (liberação imediata ou modificada) e a meia-vida de eliminação do fármaco. Os critérios de inclusão e exclusão de voluntários do estudo devem ser suficientes para selecionar voluntários saudáveis, evitando que características fisiopatológicas dos indivíduos interfiram nos resultados. A forma pela qual as amostras serão coletadas, processadas, armazenadas e transportadas também faz parte do planejamento da Etapa Clínica (SHARGEL & YU, 1999).

O desenho do estudo é do tipo aberto, aleatório e cruzado. Para a realização desses estudos são empregados voluntários humanos que recebem os medicamentos teste e referência em ocasiões separadas (períodos), em esquema de dose simples ou múltipla. O intervalo entre os períodos (*washout*) deve ser de, no mínimo, sete meias-vidas de eliminação do fármaco, ou do metabólito, quando o mesmo for ativo (BRASIL, 2002a e 2002c).

A legislação estabelece que para testes de biodisponibilidade relativa/bioequivalência o número de voluntários não poderá ser inferior a 12, com idade entre 18 e 50 anos. Os estudos podem ser conduzidos com voluntários de sexo masculino, feminino ou ambos, sendo que neste último caso, o número de homens e mulheres deve ser o mesmo. A ANVISA pode exigir número maior de voluntários para fármacos que apresentem grande variabilidade, de forma a assegurar poder estatístico suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo. O peso dos voluntários deve estar em

um limite de $\pm 15\%$ do peso considerado normal, levando-se em consideração a altura e estrutura física (BRASIL, 2002a e 2003a; BOLAÑOS, 2004).

O protocolo experimental do estudo e o TCLE devem ser submetidos à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), credenciado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde / MS (BRASIL, 1996, 2002a e 2003a).

Os voluntários participantes dos estudos clínicos, que necessitem de confinamento, devem permanecer em local apropriado que atenda às Boas Práticas Clínicas (BPC), sob a responsabilidade de um médico (BRASIL, 2002a, 2003a e 2004b).

2.3.2 Etapa analítica

Após a realização da Etapa Clínica, as amostras de material biológico coletadas dos voluntários participantes da pesquisa são encaminhadas a um Centro Analítico para a quantificação do fármaco do estudo. A condução dos trabalhos se dá de acordo com as normas de Boas Práticas de Laboratório (BPL), através do desenvolvimento de metodologias, que devem ser validadas seguindo critérios definidos pela legislação vigente, os quais serão realizados para fins de registro do medicamento em estudo (BEDOR, 2007).

O desenvolvimento do método é uma etapa importante nos estudos de bioequivalência, visto que a confiabilidade dos resultados desses estudos está na dependência direta da etapa analítica (BRASIL, 2005a). O método de quantificação deve ser seletivo para cada analito, exato e relativamente simples, de modo a minimizar erros.

Durante a condução desta etapa faz-se necessário verificar a metodologia de preparação da amostra, a qual envolve os processos de extração, separação, purificação, identificação e quantificação do fármaco na matriz biológica. Toda a metodologia deve estar devidamente validada antes da realização do estudo, apresentando todos os parâmetros de validação previamente estabelecidos

(BRESSOLE et al., 1996; CAUSON, 1997) e devem ser realizados estudos prévios de estabilidade na matriz biológica em questão (BRASIL, 2002a, 2003a e 2004a).

2.3.3 Etapa estatística

A etapa estatística começa, na realidade, antes do início do estudo, com o cálculo do número adequado de voluntários para o medicamento em questão e a elaboração da lista de aleatorização, além da definição de um delineamento adequado para o estudo (capaz de identificar e isolar a variabilidade inter-individual da análise dos dados) (BRASIL, 2003c). Também faz parte do planejamento da etapa estatística, o tratamento a que serão submetidos os dados gerados na etapa analítica (SHARGEL & YU, 1999).

Os parâmetros farmacocinéticos são obtidos das curvas de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo e analisados, estatisticamente, para a determinação da biodisponibilidade. Essa curva de concentração do medicamento ao longo do tempo é caracterizada pela quantificação de um determinado número de amostras biológicas, relativas aos tempos de coleta previamente estabelecidos. Os seguintes parâmetros farmacocinéticos (**Figura 1**) devem ser determinados (BRASIL, 2002a e 2003c; BOLAÑOS, 2004):

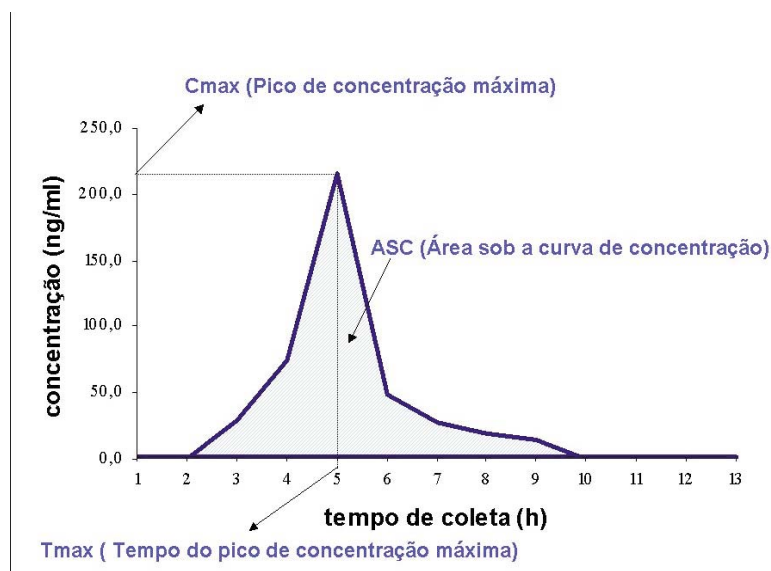


Figura 1: Representação esquemática dos principais parâmetros farmacocinéticos de um estudo de bioequivalência.

Relacionados a quantidade de fármaco absorvida:

Área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo (ASC_{0-t}): frequentemente utilizada para medir a extensão da absorção do fármaco após sua administração. É calculada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao tempo t , onde t é o tempo relativo à última concentração determinada experimentalmente. A ASC_{0-t} deve ser igual ou superior a 80% da $ASC_{0-\infty}$. A determinação da bioequivalência é resultado da comparação do referido parâmetro entre duas formulações:

$$ASC = FD / Ke \cdot Vd$$

Onde: F- Fração absorvida; D – dose administrada; FD – quantidade do fármaco absorvido; Ke – constante de eliminação; Vd – volume de distribuição.

Área sob a curva de concentração sanguínea do tempo zero a infinito ($ASC_{0-\infty}$): extrapolação da ASC que é calculada do tempo zero até o tempo relativo à completa eliminação do fármaco. A área sob a curva de zero a infinito é obtida da seguinte maneira:

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + Ct / Ke$$

Onde C_t é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente e K_e é a constante de eliminação.

Concentração Máxima (C_{max}) do fármaco e /ou metabólito: concentração plasmática máxima obtida após administração do fármaco.

Tempo Máximo (T_{max}): tempo para atingir a concentração máxima, cujo pico é obtido diretamente em interpolação dos dados. Indicador da velocidade de absorção.

Outros parâmetros farmacocinéticos:

$t_{1/2}$: meia-vida de eliminação plasmática do fármaco;

K_e : constante de eliminação.

A avaliação estatística é composta basicamente por métodos estatísticos associados à avaliação da bioequivalência, considerando o critério da bioequivalência média sob delineamento experimental crossover 2 x 2. Essa etapa deve ser conduzida segundo critérios estabelecidos na Resolução RE nº 898, de 29 de maio de 2003.

Os parâmetros ASC_{0-t} e C_{max} são usados transformando-os em logaritmo natural, uma vez que, em geral, a distribuição dos dados transformados se aproxima mais a uma distribuição normal em relação aos dados originais. No caso de realização da análise estatística nos dados em escala original deve-se apresentar justificativas (BRASIL, 2003c).

Os valores obtidos para os parâmetros $ASC_{0-\infty}$, ASC_{0-t} e C_{max} são utilizados para a verificação dos efeitos de sequência, de voluntário dentro da sequência, período e tratamento através da análise de variância (ANOVA). Deve-se construir um intervalo de confiança (IC) de 90% para as relações entre os valores da ASC_{0-t} e C_{max} dos produtos teste e referência, que devem estar compreendidos entre 80 a 125%, utilizando-se para tal as transformações logarítmicas dos valores dos referidos parâmetros (BRASIL, 2003c):

$$80 \leq (ASC_{0-t} \text{ TESTE} / ASC_{0-t} \text{ REFERÊNCIA}) \geq 125\%$$

$$80 \leq (C_{\max} \text{ TESTE} / C_{\max} \text{ REFERÊNCIA}) \geq 125\%$$

Para análise do T_{max} utiliza-se testes não paramétricos pela diferença individual = teste – referência (BRASIL, 2003c).

Um estudo de bioequivalência refere-se basicamente à comparação das principais medidas farmacocinéticas observadas no experimento, relativas aos produtos a serem testados, representados na **Figura 1**. Os resultados dos estudos são expressos como bioequivalentes ou bioinequivalentes para a comparação das formulações Teste e Referência. Contudo, dois medicamentos serão considerados bioequivalentes quando o IC de 90% para as seguintes razões: $ASC_{0-t} \text{ TESTE} / ASC_{0-t} \text{ REFERÊNCIA}$ e $C_{\max} \text{ teste} / C_{\max} \text{ REFERÊNCIA}$ entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos de teste e referência estiverem compreendidos entre 80 a 125%. Quando clinicamente relevante, T_{max} deverá também ser considerado (BRASIL, 2002a e 2003c).

2.4 Metodologias de quantificação de fármacos em fluidos biológicos

A determinação de fármacos em matrizes biológicas pode ser realizada utilizando diversas metodologias de quantificação direta e indireta, havendo, no entanto, diferenças na sensibilidade e seletividade nos níveis mínimos de concentração desses para sua determinação em cada matriz. Novas metodologias desenvolvidas para esse fim têm conseguido aumentar a sensibilidade e rapidez de quantificação de fármacos, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção ultravioleta a técnica mais descrita na atualidade (GONÇALVES, 2005).

No entanto, o uso de outras metodologias como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) tem aumentado progressivamente, sobretudo para estudos bioanalíticos. Isto se deve ao fato desta técnica apresentar alta sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão e rapidez.

Durante o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico, diversos fatores devem ser levados em consideração, como a otimização das condições cromatográficas, a avaliação do melhor método de extração da matriz biológica, a escolha de uma técnica instrumental de detecção adequada, a realização de estudos de estabilidade até a avaliação dos critérios de aceitação e rejeição empregados para a análise das amostras (BEDOR, 2007).

2.4.1 Métodos cromatográficos

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura que encontra aplicação em todos os ramos da ciência. Os componentes da amostra a serem separados se distribuem entre duas fases, que estão em contato íntimo, uma estacionária, geralmente de grande área enquanto a outra, a fase móvel, move-se através da primeira. Como consequência dessa mobilidade, os componentes da amostra se separam em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente (CIOLA, 1998; NETO & NUNES, 2003; SKOOG, 2002).

Em 1906, Michael S. Tswett utilizou pela primeira vez os termos “cromatograma”, “cromatografia” e “métodos cromatográficos”. Contudo, o tremendo impacto desses métodos na ciência só foi atestado pelo Prêmio Nobel de 1952, concedido a A. J. P. Martin pelas suas contribuições nesse campo, antecipado o surgimento de dois tipos de cromatografias: a gás e a líquido de alta eficiência. Martin participou de vários acontecimentos na história da cromatografia: com Synge, desenvolvendo a cromatografia de partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária também líquida é suportada sobre um sólido; com Consden e Gordon, reintroduzindo a cromatografia em papel; e com James, atualizando a cromatografia gás-líquido (CIOLA, 1998).

Nos últimos 50 anos, a cromatografia vem ocupando lugar de destaque no meio científico. Isto se deve não somente ao desenvolvimento de vários novos tipos de técnicas cromatográficas (cromatografia a líquido, cromatografia a gás e cromatografia de fluido supercrítico), mas também sua facilidade de efetuar separações, identificação e quantificação de espécies químicas (SKOOG,

2002), por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (ABREU, 2003).

2.4.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida permaneceu estagnada até o fim dos anos 60, considerada essencialmente como técnica preparativa. Comparada com a cromatografia gasosa, que demonstrou enorme potencialidade devido à sua eficiência, facilidade, baixo custo e possibilidade de analisar misturas voláteis de alta complexidade, a cromatografia líquida pareceu uma técnica de poucos recursos (CIOLA, 1998).

A partir da década de 70, estudos teóricos e práticos desenvolvidos por Snyder, Kirkland, cols., e outros pesquisadores aperfeiçoaram o sistema de bombeamento e detecção de CLAE. Foi comprovado que o uso desses equipamentos, que operam com fase móvel líquida sob pressão e com métodos de detecção sensíveis possibilitam análises de velocidade comparável às de cromatografia gasosa, com resultados altamente satisfatórios (CIOLA, 1998; ABREU, 2003; COLLINS *et al.*, 1995; QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

Dando sequência a evolução da CLAE, foram desenvolvidos recheios das fases estacionárias com tamanhos de partículas superficialmente porosas, e posteriormente, partículas completamente porosas, de diâmetro pequeno, por Kirkland e outros, 1999. O desenvolvimento por Nickell e cols., 1996, de fases estacionárias contendo grupos alquilas quimicamente ligados ao suporte permitiu a aplicação da chamada “fase reversa” (fase estacionária apolar), ampliando as aplicações dessa técnica; enquanto a introdução de colunas de diâmetro interno menores (as “microbores” e as “capilares recheadas”) por Scott e por Novothy, 1992, viabilizaram o uso da cromatografia líquida de alta eficiência para qualquer tipo de análise, quer orgânica, quer inorgânica (ABREU, 2003; HENION *et al.*, 1998).

Atualmente, a CLAE é a técnica de separação mais usada, devido à fácil adaptação para determinações quantitativas exatas, sua adequação à separação de espécies não-voláteis ou termicamente instáveis e, acima de tudo, sua ampla aplicabilidade não só na área bioanalítica, mas também em outras áreas afins como análise de alimentos, fitoterápicos, toxicológicos, forense, de íons inorgânicos, proteoma e genoma (BEDOR, 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação automatizada composta por módulos:

- 1- Reservatório para fase móvel;
- 2- Bomba;
- 3- Injetor;
- 4- Coluna cromatográfica e forno de coluna;
- 5- Detector;
- 6- Sistema de registro e análise dos dados.

O conhecimento sobre todos os módulos que constituem um sistema de cromatografia líquida bem como o detalhamento de diversos solventes, tipos de fases estacionárias e detector são de extrema importância para o desenvolvimento e validação das metodologias bioanalíticas (GONÇALVES, 2005).

A Solventes

O sucesso da separação de misturas, empregando a cromatografia líquida, depende da escolha adequada da fase móvel acoplada à fase estacionária conveniente. A separação dos compostos de interesse pode acontecer pelo emprego de um único solvente de composição constante chamado de eluição isocrática, ou pelo emprego de dois ou três sistemas de solventes, que diferem bastante entre si em polaridade, pela eluição com gradiente. Sistemas envolvendo colunas não polares e uma fase móvel polar são comumente conhecidos como sistemas de fase reversa, onde as moléculas polares são facilmente eluidas pela fase móvel. O inverso ocorre com sistemas de fase

normal, fase móvel apolar e coluna polar cuja retenção do soluto aumente com a polaridade do mesmo (LANÇAS, 2002).

Outro fator adicional, mas de relevância quando se deseja controlar a força de eluição do solvente na fase móvel, é o pH, sobretudo em colunas de fase reversa. Ajustando-se as condições cromatográficas (ajuste do pH) pode-se obter condições ideais de ionização dos analitos, quando a cromatografia líquida está acoplada a espectrometria de massas. Esse ajuste de pH é feito antes da introdução da amostra na fonte de íons do espectrômetro de massas, pela adição de substâncias ácidas ou básicas à fase móvel, apenas para compostos em que a ionização é pH dependente (NASCIMENTO, 2004).

Como a espectrometria de massas com interface de *electrospray* (ESI), o processo de ionização ocorre na fase móvel, isso requer que o analito já possua carga quando dissolvido. Conseqüentemente, o pH da fase móvel deve ser baixo quando usar o modo íons positivo (ESI+) e relativamente alto no modo íon negativo (ESI-) (LANGERWEF *et al.*, 2000).

São propriedades desejáveis para solventes utilizados em cromatografia líquida

- alta pureza;
- não decomposição do analito e da fase estacionária;
- compatibilidade com o sistema de detecção;
- baixa viscosidade.

B Coluna cromatográfica

Durante as décadas de 70 e 80, a cromatografia foi praticada principalmente em colunas de diâmetro interno em torno de milímetros, com comprimento variando de 10 a 25 centímetros. Essas dimensões foram alteradas a partir da constatação de que diminuindo-se o tamanho das partículas da fase estacionária de 10 microns para 5 microns, podia-se diminuir o comprimento da coluna pela metade, mantendo-se a mesma eficiência de separação. A variação no diâmetro interno das colunas motivou o surgimento das colunas denominadas microbore, semi-microbore e capilares. Essa miniaturização,

além de haver permitido considerável economia de solventes, fases estacionárias e amostras, possibilitou ainda ampliação no campo da cromatografia líquida, incluindo o acoplamento com espectrometria de massas (LANÇAS, 2002).

A coluna cromatográfica determina a seletividade e eficiência da separação. Essa capacidade é definida através da seleção de características ideais da coluna, tais como o tipo de empacotamento (fase estacionária) e sua porosidade, dimensões da coluna, diâmetro das partículas empregadas, a fim de obter condições ótimas na separação por cromatografia líquida. A sílica é, certamente, a fase estacionária mais comum em cromatografia líquida. Entretanto, esta vem sendo substituída pelas colunas poliméricas com caráter hidrofílico e lipofílico, porque a maioria dos fármacos apresenta tanto grupos polares quanto apolares na sua estrutura (SOUSA, 2008).

A separação dos compostos empregando CLAE deve-se principalmente aos fenômenos que ocorrem na interface fase estacionária/fase móvel e, a interação entre os componentes das amostras e essa interface envolvem vários processos físico-químicos que refletem na atração ou repulsão relativa destes. Esses fenômenos, em geral, são forças intermoleculares fracas do tipo *Van der Waals*, ligação de hidrogênio, transferências de cargas, interações iônicas, além de processos de adsorção, partição, exclusão por tamanho molecular, contra-corrente, complexação e outros (CIOLA, 1998; NASCIMENTO, 2004).

Contudo, há dois principais mecanismos envolvidos no retardamento da passagem de um composto pela coluna. Em fase reversa, o mecanismo de retardo acontece pelo particionamento da porção lipofílica da molécula dentro da fase estacionária. Já em colunas de fase normal, esse mecanismo é devido a adsorção do grupo polar da molécula sobre os grupos polares da fase estacionária (NASCIMENTO, 2004).

C Detector

O detector mede as mudanças de concentração ou a massa dos compostos da amostra que está deixando a coluna do sistema cromatográfico. A interpretação dos dados registrados pelo detector produz informações quantitativas e qualitativas sobre a amostra e seus constituintes. A escolha de um detector depende de sua sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão adequadas para a execução e tempo da análise empregada (BEDOR, 2007).

Os detectores mais utilizados são:

- Ultravioleta e Visível (UV-VIS);
- Fluorescente;
- Eletroquímico;
- Massas.

2.4.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

2.4.2.1 Princípios da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

No início da década de 40, já existiam registros da aplicação geral da espectrometria de massas para a análise química quantitativa de misturas de hidrocarbonetos obtidos da indústria petrolífera. Isso levou ao aparecimento e rápido aperfeiçoamento de espectrômetros de massas comerciais na década de 50, com aplicação na identificação e elucidação estrutural de uma ampla variedade de compostos orgânicos (SKOOG *et al.*, 2002). A espectrometria de massas foi ganhando mais espaço nos anos 80 com o desenvolvimento de métodos de produção de íons de moléculas não-voláteis ou termolábeis.

A partir dos anos 90, a espectrometria de massas obteve notável crescimento dentro da área bioquímica e da biológica, sendo atualmente aplicada à determinação de estruturas de polipeptídeos, proteínas e outros biopolímeros de alta massa molecular principalmente em projetos de mapeamento genômico (SKOOG *et al.*, 2002; NASCIMENTO, 2004).

O espectrômetro de massa funciona basicamente através da ionização das moléculas e sua fragmentação. Em seguida, os íons resultantes são identificados de acordo com sua relação massa/carga. Os componentes-chave no processo são: a fonte de íons, o analisador e o detector (**Figura 2**). A fonte de íons tem a função de gerar íons essenciais ao processo. Há vários tipos de fonte de íons que podem ser utilizados quando do interfaceamento da cromatografia acoplada à detectores de massas. Cada tipo é específico para uma certa classe de compostos (GONÇALVES, 2005).

Há também vários tipos de analisadores de massa, principais responsáveis pela especificidade e sensibilidade destes tipos de detectores, sendo o analisador do tipo quadrupolo o mais largamente utilizado para trabalhos de quantificação. Esse tipo de analisador, quadrupolo, pode ser utilizado de duas formas: 1- monitorando um dado íon (sensibilidade completa) ou 2- varrendo uma faixa de massa (menor sensibilidade) para obter um espectro de massa completo, e quando acoplados ao modo de aquisição de íon MRM (monitoramento de reações múltiplas) obtém maior sensibilidade e seletividade.

Os detectores são responsáveis pela geração de sinais mensuráveis (BRASIL, 2002b). Todas as etapas são controladas por um microcomputador através de um *software Masslynx*, que permite o monitoramento de parâmetros com temperatura da fonte do gás de solvatação, tensão dos cones (amostragem e extrator), tensão de varredura de entrada e saída dos analisadores, tensão dos analisadores quadrupolares, tensões das lentes, além da pressão do vácuo, energia de colisão (gás de colisão) e velocidade das bombas turbomoleculares.

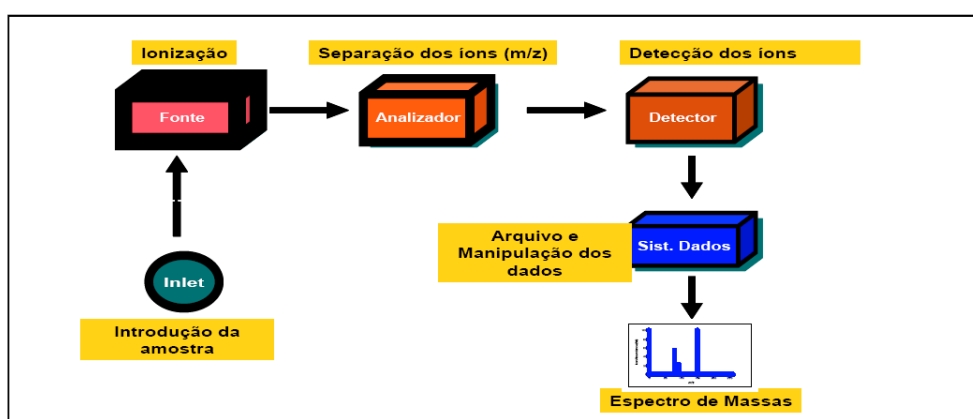


Figura 2: Componentes básicos do sistema de espectrometria de massas.

A quantificação de fármacos através de CLAE-EM/EM é geralmente baseada na razão de áreas de picos do analito e do padrão interno. O padrão interno determina uma compensação de diferenças no comportamento do analito durante a extração, eventuais falhas no processo de injeção e em diferenças na eficiência da ionização. Os fármacos mais utilizados como padrões internos são os de estrutura química semelhante ao analito ou o próprio analito que contenha alguns dos seguintes isótopos estáveis como ^2H , ^{13}C , ^{18}O ou ^{15}N (OLIVEIRA, 2002).

Para a detecção ou quantificação adequadas de uma substância ou íon através da espectrometria de massas, alguns parâmetros devem ser avaliados. Dentre esses parâmetros, a ionização e a eficiência da fragmentação são os mais importantes (LANGERWER *et al.*, 2000).

Existem diversas interfaces de ionização conhecidas como impacto de elétrons (EI), bombardeamento rápido de átomos (FAB), dessorção em matrizes assistidas por laser (MALDI), ionização química (CI) e pressão atmosférica (API), sendo esta última subdividida em *electrospray* (ESI) e por ionização química (APCI).

O método de ionização mais utilizado na análise de fármacos é por eletronebulização ou *electrospray*, podendo ser utilizado no modo positivo (ESI+) ou negativo (ESI-). Para tal, promove-se a adição ou abstração de um próton ao composto. Assim, após a separação pela CLAE, a amostra a ser analisada é introduzida no espectrômetro de massas (GONÇALVES, 2005).

A passagem da fase líquida para a gasosa (dessolvatação) é realizada com auxílio do gás nitrogênio, formando-se um *spray*. O capilar por onde passa a amostra encontra-se carregado eletricamente, daí a origem do nome *electrospray*. O composto assim vaporizado é captado pelo cone do espectrômetro e induzido na câmara de vácuo.

A utilização da técnica *Z-spray*, eixo ortogonal da fonte de íons, tem propiciado maior sensibilidade e simplicidade na quantificação das amostras. A maior

sensibilidade desse sistema de introdução de amostras (ortogonal) deve-se, principalmente, à diminuição do ruído proveniente da entrada de partículas não ionizadas na câmara de vácuo. Além disso, os contaminantes podem ser facilmente removidos através da limpeza do anteparo posterior após feixe gasoso (OLIVEIRA, 2002; ABREU, 2003).

Uma representação esquemática da fonte de íons está apresentada abaixo (Figura 3).

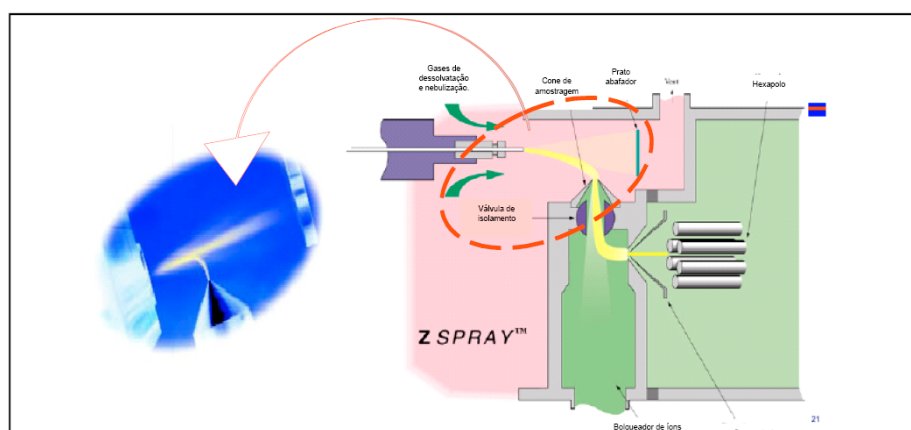


Figura 3: Sistema do cone da forma ortogonal (Z-spray) (www.micromass.co.uk).

2.4.2.2 Representação esquemática do espectrômetro de massas

Após a passagem pelo cone, o analito penetra em uma série de compartimentos dispostos em fileira única (tandem) para a quantificação e seleção dos íons. No primeiro compartimento acontece a seleção dos íons precursores – compartimento Q1. No segundo compartimento (Q2), a fragmentação ocorre pela colisão dos íons precursores com moléculas do gás de colisão (geralmente Argônio). A partir daí, os íons produto penetram em outro compartimento onde são novamente selecionados e finalmente o íon que sai deste último compartimento é detectado por uma célula fotomultiplicadora.

O número de contagens por segundo é registrado na forma de um gráfico (cromatograma) e a área sob a curva é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, acontecendo assim o processo de

quantificação (OLIVEIRA, 2002). A **Figura 4** mostra um esquema geral do triplo quadrupolo.

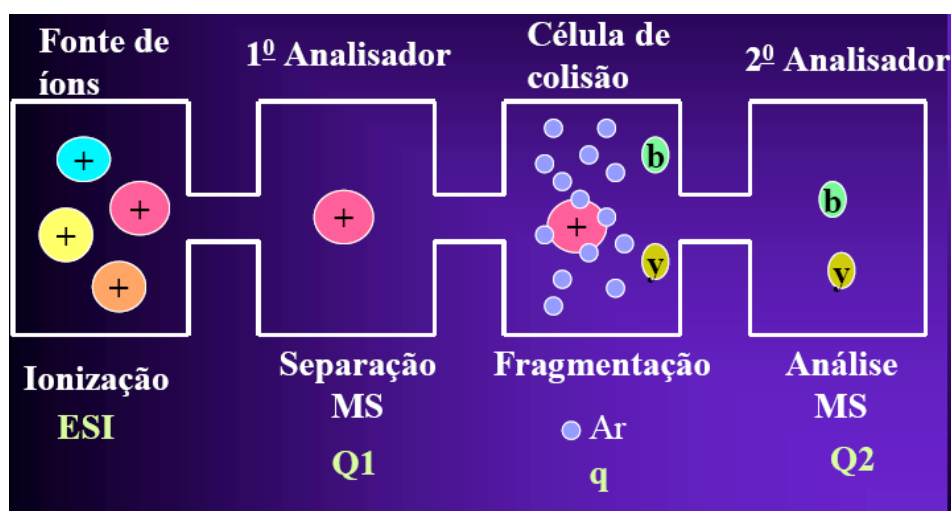


Figura 4: Arquitetura típica de um triplo quadrupolo.

No modo de aquisição de íons monitoramento de reações múltiplas (MRM), o primeiro analisador de massa é ajustado para monitorar o íon precursor, enquanto que o segundo analisador monitora um íon característico obtido pelo processo de fragmentação do primeiro:

- Q1: o íon molecular é gerado (íon precursor – íon pai);
- Q2: célula de colisão, o ocorre o processo de dissociação;
- Q3: um fragmento específico é selecionado (íon produto – íon filho).

2.4.3 Validação de métodos bioanalíticos

A determinação de fármacos em fluidos biológicos já é rotina em grandes centros de pesquisa no mundo empregando métodos cada vez mais apurados, sensíveis e específicos. Diferentes métodos são aplicados em bioanálises, contudo, a certeza dos resultados obtidos com a execução desses, só pode ser garantida se o método bioanalítico tiver sido desenvolvido e validado previamente, de forma a assegurar que os fluidos biológicos obtidos dos voluntários serão devidamente analisados.

A ANVISA e a FDA apresentam normas e guias específicos que definem parâmetros e critérios de aceitação para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar seletividade, linearidade, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, recuperação, exatidão adequados às análises. Além disso, deve-se determinar a estabilidade do analito na matriz biológica (BRASIL, 2002a e 2003b). Um resumo dos parâmetros estabelecidos pela RE 899 de 29 de maio de 2003 estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Parâmetros para a validação de métodos bioanalíticos

Parâmetro	Definição
Seletividade	Verificação de interferentes no tempo de retenção do analito
Recuperação	Eficiência do processo de extração
Precisão	Representação do grau de repetibilidade dos resultados de análises individuais, quando provenientes de uma mesma homogenia: Intra-ensio: variação dos resultados realizados no mesmo dia. Inter-ensaio: variação dos resultados realizados em dias consecutivos
Exatidão	Avalia a variação entre o valor nominal do analito e o valor obtido pelo método
Linearidade	Faixa linear da concentração plasmática onde os resultados do detector são diretamente proporcionais a concentração do fármaco
LIQ	Menor concentração do fármaco que pode ser quantificada com precisão e exatidão.

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado (NASCIMENTO, 2004). A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros. Os estudos prévios de estabilidade em matrizes biológicas são essenciais para fornecer parâmetros de adequabilidade e confiabilidade do método em amostras envelhecidas e condições de armazenamento para os estudos analíticos de bioequivalência e biodisponibilidade.

Os procedimentos de estabilidade devem avaliar a estabilidade do fármaco durante a coleta e o manuseio das amostras, após estocagem de longa duração, estocagem de curta duração, após ciclo de congelamento e

descongelamento e processo analítico, incluindo também uma avaliação da estabilidade do analito na solução estoque (BRASIL, 2002a e 2003b).

2.5 Métodos de extração

A preparação de amostras é uma importante etapa para a quantificação de fármacos em estudos clínicos quando se trabalha com métodos cromatográficos. O objetivo da preparação de amostras é a eliminação de compostos interferentes provenientes da matriz, usando o menor número de etapas possíveis, obtendo uma metodologia reproduzível. Dentre os métodos empregados na rotina, a extração em fase sólida tem evoluído como uma técnica adequada de extração com uma ampla faixa de aplicações e tem provado ser muito eficiente, altamente sensível, além de requerer a utilização de menores quantidades de solvente.

Após definição das condições de separação cromatográfica dos compostos, o próximo passo será a avaliação dos procedimentos de preparação da amostra, visando a recuperação máxima do analito e minimizando a extração de interferentes na matriz biológica (CAUSON, 1997; KLINK, 2000; ABREU, 2003). O ponto crítico, nesses procedimentos, é a taxa exata da concentração de fármacos conhecidos ou de seu metabólito em material biológico como sangue, urina ou fluidos dos tecidos.

Matrizes biológicas complexas como sangue, plasma, urina, saliva e fluido cérebro espinhal e tecidos contêm, em geral, grande quantidade de compostos endógenos que podem interferir no método analítico usado para determinar materiais de interesse farmacológico, a menos que métodos ultra-específicos de análise sejam usados. A estratégia está intrinsicamente ligada aos conhecimentos da cinética do fármaco em questão, pois o conhecimento da biotransformação governa a técnica usada para assegurar especificidade e seletividade para a determinação dos limites de quantificação e detecção.

Biomatrizes, como urina, não necessitam ser pré-tratadas antes da extração líquido-líquido ou extração em fase sólida. Plasma pode requerer algum grau

de pré-tratamento, devido a ligação do fármaco pelas proteínas plasmáticas tais como albumina, α -glicoproteína ácida, lipoproteínas e t-globulina (AERT *et al.*, 1995). Métodos bioanalíticos, comumente, envolvem a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida do fármaco e seus metabólitos da biomatriz ou remoção de proteínas antes da separação por técnicas cromatográficas (ROUAN *et al.*, 2001).

As estratégias de extração de fármacos dependem da natureza da matriz biológica. Na extração líquido-líquido, o uso de procedimentos de múltiplas etapas, envolvendo extração e re-extração em fase orgânica e aquosa com apropriado uso de pH e concentração iônica, pode remover compostos desejáveis das matrizes, bem como reduzir a quantidade de interferentes e contaminantes no extrato final (NASCIMENTO, 2004). A eficiência de extração (recuperação) é avaliada a partir das características de cada analito em questão como pKa, coeficiente de partição e estabilidade no meio de extração.

De acordo com Lagerwerf *et al.* (2000), a completa preparação das amostras tem dois objetivos cruciais: (1) concentração do analito e (2) remoção de compostos interferentes das amostras. No caso especial de análises envolvendo a técnica de CLAE-EM/EM, a limpeza das amostras torna-se indispensável para evitar um efeito de matriz comumente conhecido como supressão iônica. O efeito matriz pode ser negativo, caso exista supressão do sinal, ou positivo, caso exista incremento do sinal (OLIVEIRA, 2002).

Para prevenir problemas de supressão durante as análises, esse efeito matriz pode ser investigado durante o desenvolvimento e validação do método. O experimento para verificação desse efeito consiste na contaminação de uma amostra de plasma branco previamente extraído e ressuspendido num volume fixo de solvente apropriado, e a supressão do sinal do analito pode ser determinada pela diferença do sinal entre as injeções diretas do analito em solução e as amostras preparadas. O melhor processo de extração é aquele que fornece o menor efeito matriz com o máximo de eficiência e menor tempo de trabalho.

2.5.1 Extração líquido-líquido

O conhecimento das características de solubilidade do fármaco na presença de dois solventes imiscíveis é fundamental para a aplicação do método de extração líquido-líquido. O fármaco se particiona, ou seja, se distribui entre as duas fases imiscíveis, geralmente, uma fase orgânica e uma aquosa. Alguns solventes imiscíveis em água como tolueno, éter dietílico e hexano são utilizados para separar o analito entre as fases. Dessa forma, isola-se o agente de interesse num extrato limpo para subsequente análise.

Esse tipo de extração é comumente empregado na rotina de laboratórios bioanalíticos para análises cromatográficas, principalmente pelo baixo custo e fácil operação. A extração líquido-líquido fornece condições adequadas de pré-tratamento às amostras com eficiente remoção dos seus interferentes endógenos. Para isto requer, em geral, apenas uma etapa de extração da fase aquosa ou orgânica, mas também pode ser realizada através de vários passos, caso haja problemas para retirada desses interferentes (HENION *et al.*, 1998).

2.6 Atenolol

Fármacos beta-bloqueadores foram considerados medicamentos de primeira linha para o tratamento da hipertensão. Contudo, o atenolol é um dos beta-bloqueadores mais utilizados clinicamente, e foi frequentemente usado como fármaco de referência em tentativas controladas randomizadas de hipertensão. Atualmente, os beta-bloqueadores são utilizados, principalmente, em doenças cardiovasculares (WADWORTH *et al.*, 1991).

O atenolol é descrito quimicamente como 2-{p-[2-Hidroxi-3-(isopropilamino) propoxi]fenil}acetamida. É um fármaco com uma fórmula empírica $C_{14}H_{22}N_2O_3$, e com um peso molecular de 266.3. Sua fórmula estrutural encontra-se na **Figura 5**.

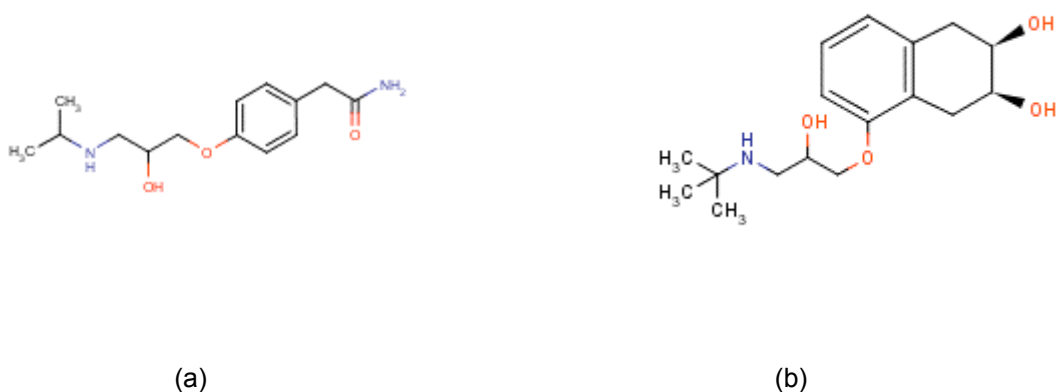


Figura 5: a: Fórmula estrutural do atenolol e b: Fórmula estrutural do nadolol (padrão interno).

Apresenta-se como um pó branco ou quase branco. Moderadamente solúvel em água; solúvel em álcool desidratado; pouco solúvel em diclorometano.

Introduzido em 1976, o atenolol foi desenvolvido como um substituto para o propranolol no tratamento da hipertensão. A hipertensão é uma condição clínica na qual a pressão sanguínea em repouso excede constantemente 140/90 mm Hg, conforme definido pela Organização Mundial de Saúde. Essa patologia é considerada um fator de risco para ataques cardíacos, infarto e sérios danos renais (LEITE *et al.*, 2006).

Os antagonistas dos receptores β -adrenérgicos (bloqueadores β) têm recebido muita atenção clínica em virtude de sua eficácia no tratamento da hipertensão, da cardiopatia, da insuficiência cardíaca congestiva e de certas arritmias (THADANI *et al.*, 1992; GOODMAN & GILMAN, 2006).

As propriedades farmacológicas dos antagonistas β -adrenérgicos podem ser explicadas, em grande parte, a partir das respostas produzidas pelos receptores dos vários tecidos e da atividade dos nervos simpáticos que inervam esses tecidos. Assim, por exemplo, o bloqueio dos receptores β exerce relativamente pouco efeito sobre o coração de um indivíduo sadio em repouso, porém, tem efeitos profundos quando o controle simpático do coração domina, como ocorre durante exercício ou estresse (BIOLO & ROHDE, 2004).

Em relação à farmacocinética, a literatura relata que em indivíduos saudáveis apenas 50% da dose são absorvidos pelo trato gastrointestinal, após administração peroral (LEITE *et al.*, 2006). Uma vez atingida a corrente circulatória, o atenolol é rapidamente distribuído para os tecidos devido à sua baixa ligação às proteínas plasmáticas (ao redor de 5%), embora o mesmo apresente uma extensão de distribuição relativamente baixa (0,95 L/kg). Devido à sua característica hidrofílica, a eliminação é predominantemente renal, sendo que a fração da dose absorvida é recuperada na urina dentro de 48 horas, apresentando meia-vida biológica de 4 a 8 horas e depuração plasmática de 1,8 a 2,2 mL/min.kg. (MASON *et al.*, 1979; WARDWORTH *et al.*, 1991).

Em relação à farmacodinâmica, a glândula supra-renal produz adrenalina e noradrenalina, e são esses hormônios que serão impedidos de agir pela ação do atenolol. Esses receptores ativados produzem aumento da atividade cardíaca e induz maior produção de noradrenalina. Quando o atenolol bloqueia esses receptores, há menor atividade cardíaca e menor pressão arterial (LEITE *et al.*, 2006).

O atenolol é um betabloqueador beta-1 seletivo, isto é, age preferencialmente sobre os receptores adrenérgicos beta-1 do coração. A seletividade diminui com o aumento da dose. Atua preferencialmente sobre os receptores cardíacos β_1 , embora também tenha afinidade com os receptores vasculares periféricos ou bronquiais β_2 .

É um fármaco que não possui atividade simpatomimética intrínseca, nem atividade estabilizadora de membrana. Assim, como outros beta-bloqueadores, possui efeitos inotrópicos negativos e, portanto, é contra-indicado em insuficiência cardíaca descompensada. Como ocorre com outros agentes beta-bloqueadores, seu mecanismo de ação no tratamento da hipertensão não está completamente elucidado.

2.7 Polimorfismo

Polimorfismo consiste em uma variação na seqüência do DNA de organismos de uma mesma espécie que está presente em uma freqüência alélica igual ou superior a 1% em determinada população. Dois tipos principais de variação na seqüência foram associados à variação do fenótipo humano: polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP – *single nucleotide polymorphism*) e inserções/deleções (*indels*) (GRIFFITHS *et al.*, 2006). A presença de polimorfismos gênicos constitui fenômeno compatível com o isolamento geográfico das populações humanas, inerentes, portanto, à formação dos grupos étnicos (STEPHENS *et al.*, 2001).

Esses polimorfismos provavelmente se originaram em populações isoladas e, em seguida, atingiram determinada freqüência por serem vantajosos (seleção positiva) ou, mais provavelmente, neutros (não conferiam qualquer vantagem ou desvantagem à população).

Estudos genômicos em ampla escala com populações etnicamente diversas, tais como a norte-americana, demonstraram que afro-americanos têm maior número de polimorfismos populacionais específicos, em comparação com os americanos de ascendências européia, mexicana e asiática (XIE *et al.*, 2001). Os africanos são considerados a população mais antiga e, por questões migratórias do passado recente da humanidade, podem apresentar, simultaneamente, polimorfismos populacionais específicos recém-desenvolvidos ao lado de polimorfismos mais antigos, que se formaram antes das migrações para fora da África (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

No entanto, a população brasileira apresenta marcada miscigenação (IBGE, 2002), o que contribui para que indivíduos apresentem ancestralidade genética que difere de seus caracteres fenotípicos/fisionômicos, o que se revela como uma variável de difícil controle em estudos populacionais.

2.7.1 Biotransformação de drogas

A exposição diária a uma variedade de compostos químicos na forma de medicamentos com fins terapêuticos desperta diversos interesses na clínica médica. Isto se deve às respostas biológicas de natureza farmacológica ou tóxica que cada indivíduo desenvolve (METZGER *et al.*, 2006).

O sistema de biotransformação dos fármacos inclui diversos processos que utilizam enzimas catabolizadoras ou anabolizadoras, em associação com biomoléculas, evitando o acúmulo de xenobióticos nocivos nas células.

Vários fatores genéticos estão relacionados com os processos cinéticos e dinâmicos que interferem nos princípios ativos dos fármacos, dentre elas, as mutações nas bases nitrogenadas, que ocorrem nas seqüências do ácido desoxirribonucléico (DNA), representam fonte significativa para estudos que irão fornecer um caminho para antecipar a responsividade ao fármaco.

Dessa forma, a identificação molecular dos polimorfismos CYP2D6 que biotransforma certos grupos de medicamentos como antidepressivos, inibidores seletivo de recaptção de serotonina, antipsicóticos, antiarrítmicos, beta bloqueadores, analgésicos opioídes, entre outros, é de grande importância na clínica médica, uma vez que genotipando o paciente estaríamos beneficiando o tratamento de 30 a 40% de substratos de drogas dependentes da CYP2D6 (GARDINER *et al.*, 2006).

2.7.2 Marcador molecular

Os genes são constituídos basicamente de DNA, que é uma molécula composta de seqüências complexas de nucleotídeos. Variações nessas seqüências que ocorrem na população geral de forma estável, sendo encontradas com freqüência de 1% ou superior, são denominadas polimorfismos genéticos (METZGER, 2006). No genoma humano, possuímos cerca de 30.000 genes, com um total de 3,12 bilhões de nucleotídeos, os quais apresentam mais de dois milhões de polimorfismos, ocorrendo com freqüência

de 1 a cada 1.250 pares de bases, possibilitando a análise destas diferenças e sua utilização como marcador molecular (METZGER, 2006).

As formas mais comuns de polimorfismos genéticos são deleções, inserções, substituição de única base (*Single Nucleotide Polymorphisms - SNP*), variações no número de seqüências repetidas (*Variable Number of Tandem Repeats - VNTR*) em uma fração de DNA. As VNTR consistem em regiões denominadas minisatélite e repetição em tandem de nucleotídeos ou microsatélite (GARDINER, 2006).

Portanto, variações em genes que codificam enzimas metabolizadoras de fármacos podem alterar a transcrição e, conseqüentemente, tradução e, por fim, alterar a função do transcrito. Essas alterações podem determinar enorme variabilidade na capacidade catalítica da enzima, podendo resultar em metabolizadores lentos com maior tendência aos efeitos adversos ou tóxicos, metabolizadores normais e metabolizadores ultra-rápidos podem resultar dificuldades na obtenção de concentrações plasmáticas adequadas para uma resposta terapêutica (MEYER, 2000 apud LIMA, 2004).

Indivíduos com dois alelos selvagens com enzima funcional são denominadas metabolizadores homozigóticos extensos (EM), enquanto aqueles com dois alelos variantes resultando em uma enzima ativo ou ausente são denominados pobres metabolizadores (PM). Pode, também, haver um metabolizador intermediário (IM) com função reduzida no fenótipo, o que resulta na presença de um alelo normal e um variante. Intermediário e extensos metabolizadores muitas vezes são referidos coletivamente como extensos metabolizadores, especialmente, em estudos nos quais a categoria de metabolizar determina o fenótipo (GARDINER *et al.*, 2006).

Portanto, a identificação de indivíduos portadores dessas variações genéticas representa um importante passo para a clínica médica. A técnica molecular de PCR aliada ao Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), representa uma das maneiras para determinação do polimorfismos. Tal técnica utiliza enzimas de restrição que digerem o DNA

amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em pontos específicos. Os fragmentos gerados dessa restrição são separados por tamanho do fragmento por meio da eletroforese.

Através da PCR-RFLP, foram estabelecidos mais de 20 alelos para o gene CYP2D6, sendo quatro comumente associados ao fenótipo de pobre metabolizador: o alelo CYP2D6*4, responsável por até 80% dos fenótipos PM; o alelo CYP2D6*3 e CYP2D6*6 e o alelo CYP2D6*5 (HERSBERGER et al., 2000).

No polimorfismo CYP2D6*4 ocorre uma mudança de base G1934→A na junção do íntron 3 com o éxon 4, alterando o *splicing* de RNA que causa uma proteína truncada, com frequência alélica de aproximadamente 0,8. O CYP2D6*5 apresenta deleção completa da região que codifica o gene CYP2D6, com frequência alélica de aproximadamente 0,1. Portanto, a escolha da técnica molecular para identificação destes polimorfismos dependerá, exclusivamente, da característica da mutação e disponibilidade de recursos (HERSBERGER et al., 2000).

2.7.3 Isoformas do citocromo P450

O citocromo P450 (CYP) apresenta várias isoformas que são formas múltiplas de uma mesma enzima que catalisam o mesmo tipo de reação, neste caso, de oxidação, apresentando afinidade por substratos diferentes, biotransformando, portanto, fármacos distintos. Além disso, as isoformas diferem na sua distribuição pelo organismo e na regulação de sua atividade, apresentando diferentes inibidores, indutores e fármacos marcadores. Estes últimos são utilizados para a determinação da atividade de cada isoforma e já que são também substratos das mesmas. (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

Atualmente, mais de 74 famílias de genes do CYP estão identificadas em humanos, as quais são classificadas de acordo com as convenções da biologia molecular e identificadas por um número arábico indicando a família (membros de uma mesma família são os que apresentam mais de 40% de aminoácidos

idênticos); seguido de uma letra em caixa alta que indica a subfamília (55% de aminoácidos idênticos) e um outro número representando o gene na subfamília, por exemplo, CYP1A2.

As enzimas envolvidas na biotransformação de fármaco em humanos pertencem às famílias 1, 2, 3 e 4 (NELSON *et al.*, 1996 apud GREGHI, 2002). Aproximadamente 70% do CYP hepático são constituídos pelas isoformas CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A. Entre estes, o CYP3A (CYP3A4 e CYP3A5) e o CYP2C (principalmente o CYP2C9 e 2C19) são as subfamílias mais abundantes, responsáveis por 30% e 20%, respectivamente, do CYP total. As outras isoformas apresentam a seguinte contribuição para o CYP total: CYP1A2 em 13%, CYP2E1 em 7%, CYP2A6 em 4% e CYP2D6 em 2% (GREGHI 2002).

Uma avaliação do mecanismo de *clearance* metabólico de 315 drogas diferentes (GREGHI, 2002) revelou que 56% são eliminadas primariamente através da ação das várias isoformas do CYP; a CYP3A4 foi a mais importante (50%), seguida pela CYP2D6 (20%), CYP2C9 e CYP2C19 (15%) e o restante era biotransformado pelas CYP2E1, CYP1A2, CYP2A6 entre outras, de modo que podemos estimar que 90% das reações de oxidação das drogas em humanos podem ser atribuídas a estas sete enzimas principais. O conceito que a maioria das oxidações de drogas é catalisada por um pequeno número de enzimas é importante na prevenção e identificação das possíveis interações medicamentosas envolvendo a biotransformação dos fármacos (GREGHI 2002).

2.7.4 Citocromo P450 isoforma 2D6

A dedrisoquina 4 hidroxilase é uma isoenzima do sistema do citocromo P450 codificada pelo gene *CYP2D6*, responsável pela biotransformação de compostos com estruturas amplamente divergentes. As diferenças dietéticas adquiridas pelas espécies ao longo do seu desenvolvimento poderiam explicar a variação marcante na complexidade das enzimas metabolizadoras dos fármacos encontradas nas diversas espécies. Assim, a seleção pode ter ocorrido no nordeste da África devido à capacidade da *CYP2D6* detoxificar alcalóides, aumentando a capacidade de aproveitar os alimentos.

Os polimorfismos de *CYP2D6* afetam o metabolismo de mais de 25% de todos os produtos farmacêuticos, incluindo, principalmente, antidepressivos, inibidor seletivo de recaptção de serotonina, antipsicóticos, antiarrítmicos, beta-bloqueador, analgésicos opioídes, entre outros (POOLSUP, 2000). As respostas às drogas são provavelmente determinadas por perfis muito mais complexos, que são compostos por múltiplos polimorfismos em múltiplo locus, não podendo considerar apenas o *CYP2D6*.

Várias estratégias estão sendo usadas para criar perfis genéticos complexos que são preditivos de respostas às drogas. O polimorfismo genético de base única *single nucleotide polymorphism* (SNP), encontrado em média, a cada 1.250 pares de bases do genoma humano, é o que está sendo pesquisado (BROOKES, 1999). Quando um SNP ocorre numa região do genoma que codifica os aminoácidos de um receptor, por exemplo, a substituição de uma base do DNA por outra pode levar à alteração da estrutura primária (seqüência de aminoácidos) do receptor e alterar a sensibilidade desse receptor ao seu ligante natural e/ou os fármacos que se liga a ele. Por outro lado, SNPs também ocorrem em outras regiões do genoma, responsáveis pela regulação da expressão gênica. Dessa forma, tal SNP pode afetar a quantidade de receptores (ou outras proteínas) envolvidos nas respostas às drogas (MOOSER *et al.*, 2003).

Assim, esse tipo de variação genética produz mudança qualitativa no padrão de toxicidade causado pelo fármaco em diferentes populações. Vários estudos demonstraram que alguns alelos do gene CYP2D6 exibem distribuição étnica diferencial, como o CYP2D6*3 e CYP2D6*4 que ocorrem quase que exclusivamente em caucásios (ROSSIT, 2000).

Da mesma forma, há fortes sugestões de freqüências diferenciais desses alelos em outros grupos populacionais, como, por exemplo, entre os portadores de determinadas neoplasias. Nessa direção, o fenótipo EM tem sido associado ao risco aumentado para alguns tipos de câncer, principalmente, ao câncer de pulmão (CONFROTI-FROES, 1997).

Entre as principais isoformas que apresentam polimorfismo genético, segundo um estudo de 1999 realizado por Ingelman; Sundberg *et al.*, apud Greggi. 2002, estão a CYP2D6 (caráter autossômico recessivo, sendo a freqüência de metabolizadores pobres de 5 a 10% na população caucasiana) e a CYP2C19 (também de caráter autossômico recessivo, com a freqüência de metabolizadores pobres variando entre 2% a 3% na população caucasiana, podendo chegar até 23% na população oriental).

É importante mencionar que, entre os produtos metabolizados pela enzima debrisoquina-4-hidroxilase, estão o pró-carcinógeno tabaco-específico NNK, a esparteína, o dextrometorfan e mais de 30 drogas de relevância clínica, tais como codeína, antidepressivos tricíclicos, bloqueadores β -adrenérgicos, neurolépticos e inibidores seletivos da reabsorção da serotonina entre outros (EDEKI, 1996 apud ROSSIT, 2000).

2.7.5 Enzima conversora de angiotensina

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é responsável pela conversão do decapeptídeo angiotensina I em angiotensina II. Esse peptídeo é um potente vasoconstritor que eleva a pressão arterial. O gene da enzima conversora de angiotensina possui um polimorfismo bialélico denominado Deleção (D) e Inserção (I), que afeta diretamente a quantidade circulante desta enzima.

A inserção (I) ou deleção (D) de uma sequência de 287 pares de base localizada no íntron 16 do gene da ECA constitui um dos polimorfismos genéticos mais investigados em estudos de associação.

Um dos mais importantes achados em indivíduos hipertensos foi obtido em estudos sobre o polimorfismo de inserção(I)/deleção(D) do gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Staesen *et al.* foram os primeiros a demonstrar que o genótipo DD estava significativamente associado com hipertensão arterial. Portadores do genótipo DD (homozigose para o alelo D) apresentam concentrações séricas mais elevadas da enzima, enquanto portadores do genótipo II (homozigose para o alelo I) apresentam concentrações mais baixas de ECA. Segundo dados da literatura, os portadores do genótipo DD possuem risco de serem acometidos por infarto aumentado em 3,2 vezes em relação aos genótipos II e ID.

Com relação aos efeitos biológicos desse polimorfismo, vários estudos demonstraram que indivíduos com o genótipo DD apresentam níveis plasmáticos maiores do que aqueles observados em portadores do alelo I, sugerindo maior susceptibilidade à hipertensão entre os primeiros (RIGAT *et al.*, 1990).

Atualmente reconhece-se que os segmentos intrônicos dos genes, até então considerados de pouca relevância, podem regular de alguma maneira a transcrição de alguns genes. Portanto, é possível que esse polimorfismo (I/D), por estar localizado em um íntron, provoque alguma alteração durante a transcrição do gene ou durante o *splicing* do RNA que modifica os níveis plasmáticos desta enzima.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar metodologia bioanalítica para quantificar atenolol em amostra de plasma proveniente de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência bem como genotipar os polimorfismos dos genes ECA e CYP2D6*4 nos voluntários participantes do estudo e avaliar o impacto do polimorfismo no perfil farmacocinético.

Objetivos específicos

- 1- Desenvolver e validar um método sensível, rápido e específico para quantificação de atenolol em plasma humano;
- 2- Avaliar o perfil farmacocinético de duas formulações, teste e referência de atenolol, administrado em voluntários sadios de ambos os sexos participantes de um estudo de biodisponibilidade comparativa;
- 3- Realizar genotipagem dos polimorfos dos genes Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e metabolizador com atividade enzimática reduzida de CYP2D6 (CYP2D6*4) em todos os voluntários envolvidos no estudo e determinação das respectivas frequências genotípicas e alélicas;
- 4- Determinar, estatisticamente, se o polimorfismo estudado influencia no perfil farmacocinético de atenolol obtido para cada voluntário sadio no estudo de biodisponibilidade e avaliar o grau de impacto dessa influência na variabilidade do estudo de bioequivalência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Método bioanalítico

4.1.1 Substâncias químicas e reagentes

A acetonitrila, o acetato de etila, o ácido fórmico, o hidróxido de sódio e a solução de amônio foram adquiridos da Merck. Todos os solventes apresentaram grau “HPLC” e todos os reagentes utilizados tinham grau analítico. O atenolol foi adquirido da Farmacopéia Brasileira e o padrão interno nadolol foi adquirido da Fluka. A água tipo I foi preparada usando sistema de Mili-Q (Millipore, France)

4.1.2 Condições de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

As análises foram feitas utilizando um sistema de cromatografia líquida da Waters (EUA) composto por bomba de gradiente, autoinjeter, forno de coluna e unidade de degaseificação. O detector utilizado foi Espectrômetro de Massas Quatro micro da Micromass (Manchester, UK). A coluna analítica utilizada foi Nova-Pak C18, 4,0 μm (3,9 x 150 mm) da Waters (EUA). A fase móvel consistiu numa mistura de acetonitrila: água (75:25, v/v) com 0,1% de ácido fórmico e 0,018% de solução de amônio 25%, com fluxo de 0,8 mL/min. O volume de injeção das amostras no sistema cromatográfico foi de 10 μL , utilizando um *splitter* de 1:1 para injeção das amostras na fonte do espectrômetro de massas (MS/MS). Os tempos de retenção do analito e seu PI foram de aproximadamente 1,60 e 1,65, respectivamente, sendo o tempo total de corrida de 3 minutos.

O EM/EM foi operado pelo modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), usando a ionização por *electrospray* positiva (ESI+). A tensão do cone foi de 30 V e a temperatura da fonte foi controlada a 100 °C. A energia de colisão foi mantida a 18 eV na presença de argônio. As transições de

massa/carga (m/z) monitoradas para o analito e PI foram $267,20 > 190,00$ e $310,0 > 254,30$, respectivamente. O *dwell time* foi de 0,3 segundos. Os dados de MRM foram obtidos e integrados através do *software Masslynx* versão 4.1 (Micromass).

4.1.3 Preparação dos padrões de calibração e controles de qualidade

A solução mãe de atenolol foi preparada pesando-se uma massa aproximada de 0,01g de atenolol padrão Farmacopéico. Transferiu-se, quantitativamente, para um balão de 10,0 mL e avolumou-se com solução diluente. Foi calculada a concentração da solução-mãe como atenolol (266,34 g/mol) considerando a pureza do padrão. A solução foi armazenada em geladeira de 2 a 8 °C e protegida da luz. Os padrões de calibração foram preparados pela contaminação de plasma humano a partir da diluição das soluções de trabalho, obtendo 10,0, 100,0, 250,0, 400,0, 550,0, 700,0, 850,0 e 1000 ng/mL do analito. Foram preparados três controles de qualidade (CQs), de baixa (CQA- 30,0 ng/mL), média (CQB – 420,0 ng/mL) e alta (CQC 800,0 ng/mL), e foi preparado também o controle de qualidade diluído (CQD – 1600,0 ng/mL), concentração pela adição de quantidades de atenolol em plasma.

4.1.4 Procedimento de extração

O procedimento de extração empregado baseou-se no método de extração líquido-líquido para as amostras de Controles de Qualidade Curvas de Calibração, branco, zero e de voluntários.

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

- 1) Separou-se um número apropriado de ponteiras descartáveis em *rack* e microtubos de 2,0 mL;
- 2) Em um microtubo de 2,0 mL foi adicionado 200 μ L de plasma branco, padrões em plasma, controles (LIQ, CQA, CQB e CQC) e amostras a serem quantificadas, de acordo com o objetivo da lista;
- 3) Adicionou-se 50 μ L de solução de Nadolol 1,00 μ g/mL preparada em solução diluente;

- 4) Adicionou-se 25 μL de Hidróxido de Sódio 0,1 M;
- 5) Agitou-se por 10 segundos em agitador vórtex;
- 6) Adicionou-se 1,000 mL de Acetato de Etila;
- 7) Agitou-se por 40 segundos em agitador vórtex;
- 8) Centrifugou-se a 14000 rpm, por 5 minutos e sob refrigeração (4 °C);
- 9) Congelou-se por 15 minutos a -80 °C;
- 10) Verteu-se a fase orgânica para tubo limpo e seco;
- 11) Secou-se completamente em centrifuga evaporadora;
- 12) Ressuspendeu-se com 300 μL de solução de acetonitrila:água (75:25, v/v) com 0,1% de ácido fórmico e 0,018 % de solução de amônio 25%;
- 13) Agitou-se em vórtex por 20 segundos;
- 14) Transferiu-se para *inserts* de 150 μL e injetou-se conforme condições cromatográficas estabelecidas.

4.1.5 Validação do método

4.1.5.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada pela comparação de cromatogramas obtidos de plasma branco, de diferentes origens, com aqueles obtidos de amostras contendo concentrações conhecidas de atenolol e nadolol (padrão interno). O ensaio investigou a existência de interferentes presentes nas amostras.

4.1.5.2 Carry-over

O sistema cromatográfico foi testado a fim de se verificar a ocorrência de *carry-over*.

O *carry-over* ocorre quando os analitos presentes em uma primeira amostra ainda são detectados quando da injeção da amostra subsequente e é devido a qualquer contaminação que possa ocorrer no sistema, desde a injeção até a detecção.

O teste foi preparado na seguinte sequência.

- 1) dois brancos extraídos;
- 2) dois LIQ (limite inferior de quantificação) extraídos;
- 3) dois LSQ (limite superior de quantificação) extraídos;
- 4) dois brancos extraídos;
- 5) dois LSQ (limite superior de quantificação) extraídos;
- 6) dois brancos extraídos;
- 7) dois LSQ (limite superior de quantificação) extraídos;
- 8) dois brancos extraídos.

4.1.5.3 Cross-talk

A seletividade do sistema de detecção foi verificada pelo teste de *cross-talk*.

O *cross-talk* ocorre quando há detecção cruzada entre o analito e o padrão interno. As substâncias foram injetadas diretamente, uma a uma, e foi verificada a não detecção de picos no outro canal.

O teste foi preparado na seguinte sequência.

- 1) dois brancos extraídos;
- 2) dois LIQ (Limite Inferior de Quantificação) extraídos;
- 3) dois LSQ (Limite Superior de Quantificação) do analito extraídos sem o padrão interno;
- 4) dois zeros (plasma branco com padrão interno – nadolol) extraídos.

4.1.5.4 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram obtidas pela análise de amostras de Controle de Qualidade (CQA, CQB e CQC), acrescida do nível de concentração do Limite de Quantificação Inferior (LIQ). A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV) e a exatidão em percentual (%) de desvio das concentrações médias observadas, experimentalmente, em relação ao valor nominal.

A precisão e exatidão intra-corrída forneceu a precisão e exatidão durante uma única corrida analítica. A precisão e exatidão inter-corrída mediu a precisão e exatidão ao longo do tempo.

4.1.5.5 Limite inferior de quantificação

O Limite Inferior de Quantificação (LIQ) é a menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser determinado, quantitativamente, com precisão e exatidão. Para avaliar precisão e exatidão, amostras de controle de qualidade foram incluídas no procedimento de validação. A sensibilidade do método deve garantir que a concentração do LIQ esteja na faixa de 1 a 3% do valor de C_{max} .

- em amostras de plasma branco extraídas não houve nenhuma interferência significativa no tempo de retenção do analito e do padrão interno;
- o pico identificado do analito deve ter exatidão entre 80 a 120% comparando com a concentração nominal declarada;
- o pico identificado do analito deve ter precisão elevada (coeficiente de variação, $CV \leq 20\%$);
- os controles de qualidade devem ser comparados com a concentração nominal declarada e seguir os critérios de precisão e exatidão.

4.1.5.6 Linearidade

A linearidade da curva de calibração foi avaliada utilizando os critérios descritos abaixo:

- o menor ponto da curva, ao nível LIQ (Limite inferior de Quantificação), deve ter desvio $\leq 20\%$ da concentração nominal declarada;
- outros padrões não-zero devem ter desvio $\leq 15\%$ da concentração nominal declarada;
- no mínimo 4 entre 6 padrões não-zero devem atingir o critério descrito acima, os pontos excluídos não podem ser consecutivos, nem

extremos da curva, e a exclusão não pode alterar o modelo a ser utilizado.

- o coeficiente de correlação r deve ser maior ou igual do que 0,98 em todas as listas.

4.1.5.7 Recuperação

A eficiência da extração do método analítico foi assegurada usando uma corrida específica, contendo as amostras descritas abaixo:

- duas amostras de solução de ressuspensão;
- dois brancos extraídos em Plasma Normal;
- dois brancos extraídos em Plasma Lipêmico;
- dois brancos extraídos em Plasma Hemolisado;
- seis CQA preparados em solução;
- seis CQA extraídos em Plasma Normal;
- seis brancos extraídos em Plasma Normal contaminado com CQA em solução;
- seis CQB preparados em solução;
- seis CQB extraídos em Plasma Normal;
- seis brancos extraídos em Plasma Normal contaminado com CQB em solução;
- seis CQB extraídos em Plasma Lipêmico;
- seis brancos extraídos em Plasma Lipêmico contaminado com CQB em solução;
- seis CQB extraídos em Plasma Hemolisado;
- seis brancos extraídos em Plasma Hemolisado contaminado com CQB em solução;
- seis CQC preparados em solução;
- seis CQC extraídos em Plasma Normal;
- seis brancos extraídos em Plasma Normal contaminado com CQC em solução.

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 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 Recuperação Real, ou seja, aquela que estima exclusivamente a eficiência do método analítico de extração, deve ser mensurada comparando-se a resposta obtida de amostra submetida à extração com aquela obtida da adição do analito no substrato da mesma matriz biológica que foi submetida a extração.

Considera-se como Recuperação Absoluta aquela que avalia ambos efeitos em conjunto (eficiência de extração e efeito da matriz na resposta com o detector), na 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.

A recuperação foi calculada levando-se em conta as médias de área para cada um dos níveis de concentração. Os resultados das áreas para as amostras em solução, amostras extraídas e de brancos contaminados estão apresentados na **Tabela 8**. Os resultados dos cálculos para recuperação de atenolol em plasma normal, considerando os diferentes níveis de concentração dos controles (CQA, CQB e CQC), também estão apresentados na **Tabela 8**.

Os coeficientes de variação entre as médias de diferentes concentrações de controle de qualidade e do controle de qualidade médio (CQB) em diferentes matrizes foram calculados. Vale ressaltar que os valores apresentados para cada amostra foram apenas das áreas dos analitos, e não da razão entre o analito e seu padrão interno.

4.1.5.8 Teste de interferência iônica

O sinal de supressão do íon no EM pode ser causado por:

- contaminantes (por exemplo sais, proteínas, aminoácidos, etc.);
- interferentes na cromatografia líquida que eluem ao mesmo tempo que o analito/padrão interno de interesse;
- uso de extração não específica;
- variabilidade na ionização dos compostos.

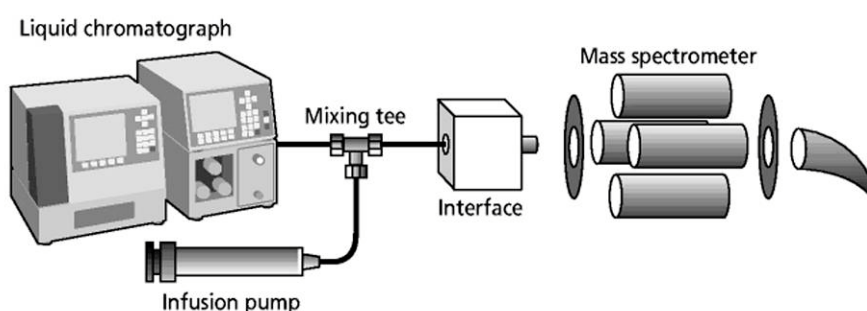


Figura 6: Modelo do teste de interferência iônica

Para investigar se há efeito da supressão iônica no EM/EM no sinal do analito, atenolol e do nadolol (padrão interno), o procedimento de extração foi avaliado. A resposta da infusão de analitos, no tempo de retenção das substâncias, não deve apresentar interferência iônica significativa, no nível do LIQ (Limite Inferior de Quantificação). A **Figura 6** apresenta a montagem do sistema com uma conexão em “T” conectando o fluxo do LC e o fluxo da bomba infusora ao probe do espectrômetro de massas.

A corrida analítica é composta por:

- Solução de ressuspensão + infusão de solução diluente;
- Branco de Pool de 4 plasmas + infusão de solução diluente;
- Branco de Plasma Lipêmico + infusão de solução diluente;
- Branco de Plasma Hemolisado + infusão de solução diluente;
- Limite inferior de quantificação (LIQ) + infusão de solução diluente;
- Solução de ressuspensão + infusão de analitos (padrão e padrão interno);

4.1.5.9 Estabilidade

A estabilidade do atenolol e do nadolol (padrão interno) foram expressas, como a relação entre o percentual de valores iniciais (amostras recém preparadas) e os obtidos de amostras submetidas a diferentes condições.

Foram avaliados os resultados oriundos de ensaios do analito em soluções padrões, após armazenamento de curta duração e longa duração, após ciclos de gelo e degelo e nas condições de análise (pós-processamento).

4.1.5.10 Aplicação do método

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a análise de amostras de plasma de voluntários provenientes de estudo de biodisponibilidade relativa pela administração oral de duas formulações de atenolol comprimido simples. Através da obtenção da curva plasmática de concentração *versus* tempo dos medicamentos testados, pode-se estimar os parâmetros farmacocinéticos. Tratou-se de um estudo cruzado de dois períodos e duas seqüências (*crossover 2x2*), aberto, randomizado em dose única para verificação da bioequivalência/biodisponibilidade entre duas formulações em questão (Teste e Referência). O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Campinas – UNICAMP.

4.1.5.10.1 Protocolo clínico

Trinta e um voluntários sadios de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos, com IMC entre 18,5kg/m² e 29,9 kg/m², foram selecionados para o estudo de biodisponibilidade relativa. Os voluntários não estavam fazendo uso concomitante de outras medicações e não apresentavam sinais ou sintomas evidentes de doenças cardíacas, hepáticas, pulmonares, neurológicas, gastrintestinais, hematológicas e psiquiátricas, avaliados pela execução de exames clínicos e laboratoriais (hematológicos, bioquímicos e sorológicos, além de sumário de urina e parasitológico) e avaliação cardiológica. Todos os

voluntários foram informados do objetivo do estudo e assinaram o TCLE. O parecer CEP foi nº 214/2009.

As amostras para a determinação de enzima conversora de angiotensina e citocromo P450 isoforma 2D6 alelo 4 foram coletadas na alta do voluntário.

4.1.5.10.2. Análise farmacocinética

A avaliação estatística é composta basicamente por métodos estatísticos associados à avaliação da bioequivalência, considerando o critério da bioequivalência média sob delineamento experimental *crossover* 2x2.

A concentração plasmática máxima observada (C_{max}) e o tempo para atingir esta C_{max} (T_{max}) foram obtidos diretamente da curva de concentração *versus* tempo da droga. A área sob a curva da concentração de atenolol *versus* o tempo de 0-48 horas (ASC_{0-48}) foi calculada usando o método dos trapezóides, além da determinação da área sob a curva do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$). A constante de eliminação (K_e) de cada medicamento analisado foi determinada a partir de regressão linear de um mínimo de 3 pontos da fase de eliminação da droga em padrão log-linear. A meia-vida plasmática ($t_{1/2}$) foi derivada dessa constante K_e . A verificação dos efeitos de seqüência, de voluntário dentro da seqüência, período e tratamento foi realizada através da análise de variância (ANOVA) da ASC_{0-48} e C_{max} , transformados em logaritmo, com um intervalo de confiança (IC) de 90% para a diferença das médias desses parâmetros para os medicamentos teste e referência.

4.2 Determinação do polimorfismo da enzima conversora de angiotensina e citocromo P450 isoforma 2D6 alelo 4

4.2.1 Citocromo P450 isoforma 2D6 alelo 4

4.2.1.1 Extração de ácido desoxirribonucléico

As amostras de ácido desoxirribonucléico (DNA) foram extraídas dos 31 voluntários participantes de estudo de bioequivalência a partir de sangue total em EDTA armazenado de 2 a 8 °C.

- Utilizou-se tubos devidamente identificados. Em tubo de 1,5 mL contendo 1 mL de água para PCR, misturou-se 50 µL de sangue total e homogeneizou-se;
- Centrifugou-se por 3 minutos;
- Descartou-se o sobrenadante deixando aproximadamente 10 µL;
- No *pellet*, adicionou-se 600 µL de hidróxido de sódio 50 mM, homogeneizou-se;
- Colocou-se o tubo em água fervente durante 5 minutos;
- Retirou-se o tubo e esfriou-se por 10 minutos;
- Conservou-se em freezer até execução da próxima etapa.

4.2.1.2 Amplificação para o alelo 4 do citocromo P450 isoforma 2D6 e para enzima conversora de angiotensina

Em área específica para essa atividade (área 3), iniciou-se o programa do termociclador para amplificação do polimorfismo CYP2D6*4 que contém as seguintes condições:

- 94 °C 5 minutos;
- 94 °C 1 minuto;
- 61 °C 1 minuto;
- 72 °C 1 minuto;
- Extensão final 72 °C 10 minutos;
- 4 °C 10 minutos;

- 10 °C até infinito;
- Finalizada a amplificação, removeu-se a estante com tubos de PCR do termociclador, identificou-se e colocou-as em geladeira de 2 a 8 °C.

4.2.1.3 Digestão do produto de PCR corrida em gel para o alelo 4 do citocromo P450 isoforma 2D6

- Em área específica para esta atividade (área 1), colocou-se tubo onde foi feito o *Master-Mix* para digestão em recipiente resfriado;
- Adicionou-se a cada tubo 3,15 µL de água tipo I para PCR e 1,5 µL do tampão da enzima correspondente;
- Adicionou-se 0,2 µL da enzima de restrição BstN1 e 0,15 µL de BSA;
- Homogeneizou-se os tubos. Distribuiu-se 5,0 µL de cada *Master-Mix* em tubos de 200,0 µL de acordo com o número de voluntários e controles da reação;
- Adicionou-se 10,0 µL do produto de amplificação;
- Os tubos foram colocados em banho à temperatura de 60 °C, no qual foram mantidos por no mínimo duas horas;
- Após este tempo, foi feita a eletroforese.

4.2.1.4 Detecção e eletroforese para o alelo 4 do citocromo P450 isoforma 2D6

Poliacrilamida não desnaturante:

- Lavou-se as placas de vidro com água corrente e detergente. Enxugou-se de modo a retirar todo resíduo de detergente;
- Colocou-se as placas de vidro em suporte e com uma garrafa lavadora contendo álcool comercial, lavou-se as placas. Após este procedimento, lavou-se as placas com água tipo I;
- As placas foram secas com papel toalha;
- As placas foram colocadas em superfície horizontal apoiadas no suporte e, na extremidade lateral, foram colocados espaçadores laterais e espaçador da base do gel;

- Colocou-se a menor placa sobre a placa maior. Verificou-se o devido emparelhamento;
- Vedou-se as laterais e a base das placas já montadas com grampos de modo que as mesmas não se movessem;
- Apoiou-se o conjunto inclinadamente no suporte de placas, em ângulo aproximado de 45 °C;
Misturou-se em béquer de 50,0 mL: 19,5 mL de água tipo I, 6,0 mL de TBE 5X, 6,0 mL de acrilamida 19:1, 200,0 µL de persulfato de amônia 10% e 20,0 µL de TEMED;
- Adicionou-se a solução preparada imediatamente na placa utilizando o próprio béquer com fluxo contínuo para evitar a formação de bolhas;
- Colocou-se o pente e manteve-se a placa na posição inclinada até a polimerização do gel, que dura uma hora;
- Após este tempo, retirou-se o espaçador da base do gel e o pente;
- Lavou-se a placa com água tipo I e secou-se com papel toalha;
- Colocou-se a placa na cuba de eletroforese na posição vertical;
- Prendeu-se a placa com grampos, de modo alternado para evitar a quebra da mesma;
- Colocou-se tampão de corrida TBE 1X no reservatório superior e inferior. Observou-se completo cobrimento das canaletas pelo tampão;
- Com auxílio de seringa, aspirou-se o próprio tampão e retirou-se as bolhas de ar que se formaram na extremidade inferior entre as duas placas;
- Limpou-se as canaletas com auxílio da seringa;
- As amostras foram preparadas em tubos *eppendorf* de 250 µL limpos e autoclavados. Todos tubos foram devidamente identificados com numeração dos voluntários;
- Misturou-se ao volume total de amostra e a 10 µL de padrão de peso molecular o tampão (TA) 6X, na proporção de diluição de 6X e, então, aplicou-se nas canaletas do gel. Conectou-se os fios de tensão;
- Aplicou-se todo o volume do tubo contendo o padrão de peso molecular em uma das canaletas do gel, e das amostras nas outras canaletas, respeitando a ordem pré definida da aplicação no gel;

- Tampou-se a cuba de eletroforese e conectou-se os fios de tensão na fonte de eletroforese;
- A fonte foi ligada e correu em uma tensão de 190V;
- Após término da corrida eletroforética, desligou-se a fonte de eletroforese, retirou-se os fios conectados à cuba e retirou-se a tampa da cuba;
- Abriu-se os grampos e retirou-se a placa;
- Retirou-se os espeçadores laterais e a placa menor;
- Procedeu-se a coloração do gel com *Syber Green*:
- Dissolveu-se 2,5 µL do reagente *Syber Green* em 25 mL de tampão TBE 1 X;
- Cobriu-se o gel com esta solução em local plano e escuro e aguardou-se trinta minutos;
- O gel foi levado para ser *scaneado* no *Scanner FMBIO II Hitachi*.

4.2.1.5 Identificação do alelo 4 do citocromo P450 isoforma 2D6

A técnica da PCR é baseada na repetição cíclica e automática de três simples reações: desnaturação da fita dupla do DNA, anelamento dos iniciadores nas fitas desnaturadas e síntese da fita complementar na seqüência molde de DNA. Este fenômeno ocorre através da extensão de cada iniciador anelado, pela ação da enzima termoestável Taq polimerase (EISENSTEIN,1990). Todas as três reações ocorrem no mesmo tubo, com os mesmos reagentes, variando-se apenas a temperatura. Teoricamente, após 25 ciclos, a fita inicial de DNA terá sido amplificada na ordem de 10^6 (DEACON & LAH, 1989). Essa técnica permitiu a utilização de pequenas quantidades de DNA, as quais são exponencialmente multiplicadas, para rápida identificação e classificação de várias seqüências de DNA e organismos (WELSH & McCLELLAND,1990).

Utilizando-se pequenas quantidades de DNA, a técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite a amplificação de produtos específicos, como regiões cromossômicas, e a detecção dos mesmos em um curto espaço de tempo. O

fato de associar digestão enzimática aos produtos de amplificação permite diferenciar os indivíduos afetados dos indivíduos normais para esta mutação, visto que a presença das alterações genéticas modifica o padrão com o qual os produtos de PCR são digeridos.

4.2.1.6 Detecção e eletroforese em agarose para enzima conversora de angiotensina

- Pesou-se 3,6 gramas de agarose e colocou-se em *erlenmeyer*;
- Completou-se o volume para 180 mL com tampão TBE 0,5X;
- Levou-se ao microondas por 5 minutos e foi verificado se a solução estava completamente dissolvida;
- Resfriou-se em torneira com água corrente;
- Adicionou-se 3,5 μ L de Brometo de etídio, homogeneizou-se, e preencheu-se a “cama” da cuba de eletroforese com esta mistura;
- Esperou-se no mínimo trinta minutos até a completa polimerização do gel;
- Após este período, colocou-se a cama na cuba de eletroforese e preencheu-se com tampão TBE 0,5X;
- Preparou-se as amostras em tubos *ependorf* de 250,0 μ L, os quais foram devidamente identificados;
- Misturou-se ao volume total de amostra e a 10 μ L de padrão de peso molecular de 100 pb o tampão de amostra (TA) 6X, e aplicou-se as amostras nas canaletas do gel.
- Conectou-se os fios de tensão da fonte de eletrofores e correu-se em tensão de 150V;
- Após término da corrida eletroforética, desligou-se a fonte de eletrofore, retirou-se os fios conectados à cuba;
- O gel foi retirado e levado ao transiluminador para observar as bandas sob UV.

4.2.1.7 Identificação da enzima conversora de angiotensina

O gene da ECA está localizado na banda 17q23 do cromossomo 17 e apresenta 2 polimorfismos, correspondendo a alelos de 490pp e 190pb, respectivamente, denominados como alelos de Inserção e Deleção. A ECA tem como principal função converter angiotensina I em angiotensina II e inativar a bradicinina. Logo, a geração de angiotensina e degradação de bradicina pode depender dos níveis de ECA encontrados nos tecidos. Visto que a hipertensão é um grande fator de risco para a ocorrência de infarto do miocárdio, estudos mostram a associação entre infarto e os polimorfismos do gene da ECA.

O procedimento visa a identificação dos genótipos II, ID e DD.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Condições de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) apresenta grandes vantagens quando comparada a outras técnicas cromatográficas com detecção convencional, pois oferece alta especificidade, velocidade, sensibilidade e aplicabilidade para vários tipos de compostos. Contudo, o desenvolvimento de um método preciso e robusto para a quantificação de compostos por CLAE-EM/EM requer a otimização e adequação de alguns parâmetros (limpeza da amostra, fase móvel, ionização do composto) a fim de garantir a sua aplicabilidade, sobretudo no campo bioanalítico.

No presente estudo, foi desenvolvido e validado um método por CLAE-EM/EM, com extração líquido-líquido, utilizando a técnica ionização por *electrospray* positivo (ESI+), como um novo e rápido método para a quantificação do atenolol em plasma. Os tempos de retenção típicos para atenolol e nadolol (padrão interno) estão ilustrados no cromatograma apresentado na **Figura 7**. Esse método aliou a eficiência da extração e limpeza das amostras biológicas à otimização das condições cromatográficas.

A otimização dos parâmetros cromatográficos foi alcançada pelo ajuste da composição da fase móvel com a utilização da acetonitrila como modificador orgânico com água (CH₃CN: H₂O, 75:25 v/v), reduzindo, assim, a possibilidade de formação de íons adutos que poderiam interferir na detecção do analito. Adicionou-se à fase móvel, 0,1% de ácido fórmico (ácido fraco, com boa volatilidade e baixa viscosidade) como agente modificador desta, que aumentou, significativamente, a resposta da ESI+ para a formação do íon [atenolol + H]⁺ como também na fragmentação do analito. Em seguida, adicionou-se 0,018% de amônio. A otimização da Energia de Colisão (Ecol) foi

ajustada para aumentar a fragmentação dos íons precursores, produzindo íons filhos, ampliando a sensibilidade do método.

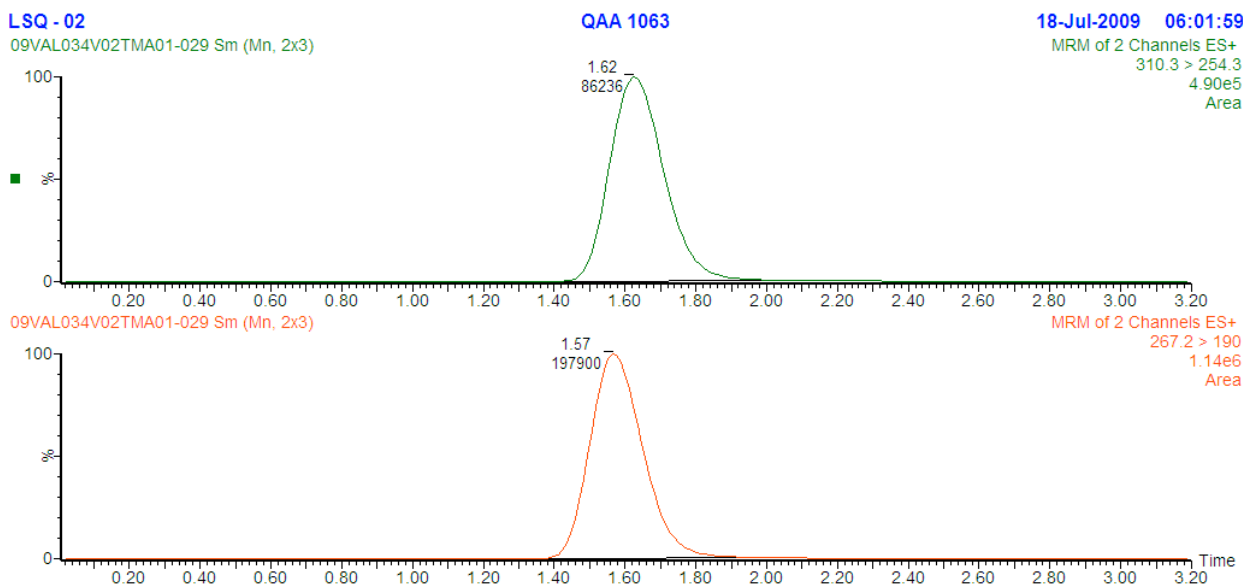


Figura 7: Cromatograma ilustrando a análise de atenolol e nadolol (padrão interno) extraídos do plasma (tempo médio)

Os íons formados pela fragmentação do atenolol e nadolol (padrão interno) foram monitorados pelo modo monitoramento de reações múltipla (MRM), cuja relação massa/carga (m/z) para os íons pai e filho estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Tempos de retenção típicos

Substância	Íons monitorados pelo método MRM	Tempo de retenção típico
Atenolol	267,20 > 190,00	1,60 ± 0,3 min
Nadolol	310,00 > 254,30	1,65 ± 0,3 min

Todos os cromatogramas presentes na mesma corrida analítica foram processados automaticamente pelo *software* usando os mesmos parâmetros, tais como, tipo de integração, alisamento (*smooth*) e amplitude (*peak-to-peak*).

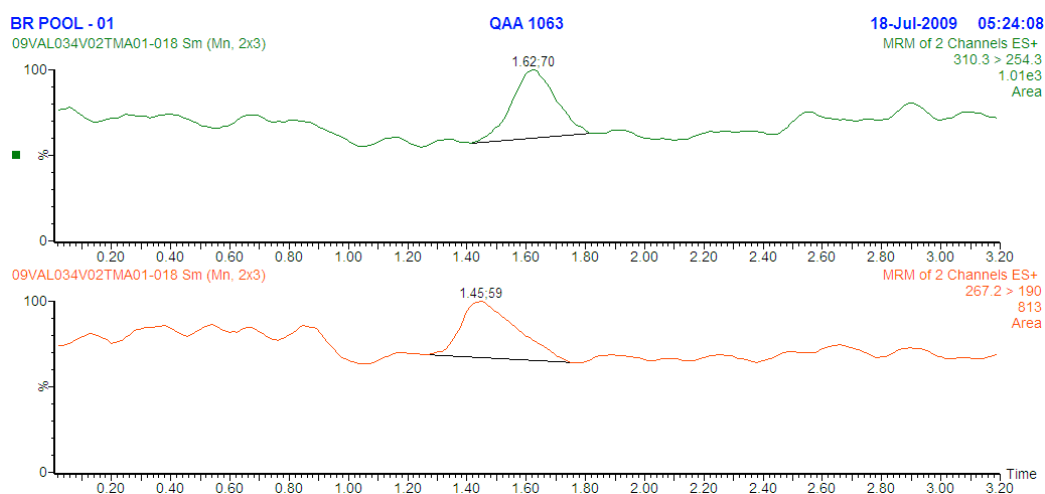
5.2 Procedimento de extração

A obtenção de resultados quantificáveis, específicos e de confiança depende da adequada preparação das amostras biológicas. O método de extração escolhido determina o percentual de recuperação do analito, e a limpeza adequada da amostra determina a ausência de possíveis interferentes. Em bioanálise, esse objetivo é usualmente alcançado utilizando-se um pré-tratamento mais apurado por extração, por exemplo, do tipo líquido-líquido. As amostras de plasma humano, utilizadas no desenvolvimento do presente trabalho, foram preparadas por extração líquido-líquido, obtendo-se extratos rápidos, limpos e reprodutíveis, trazendo como vantagens a utilização de pequenas quantidades de amostra, além de pequenas quantidades de solvente. Tal fato contribui para a redução dos custos laboratoriais diretos.

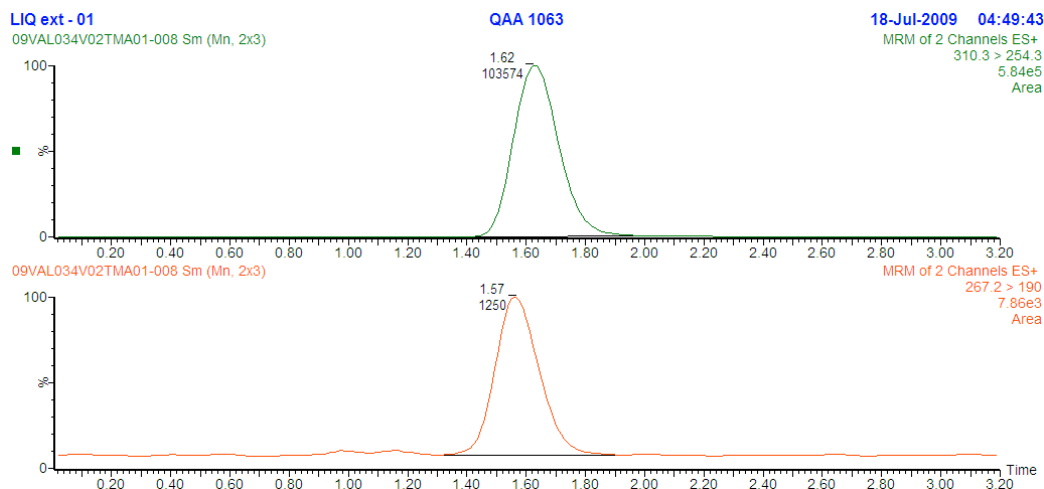
5.2 Validação do método

5.3.1 Especificidade

Cada amostra em branco foi processada e a interferência do extrato, nas condições cromatográficas e espectrométricas, foram comparadas com uma injeção de Limite Inferior de Quantificação extraído.



(a)



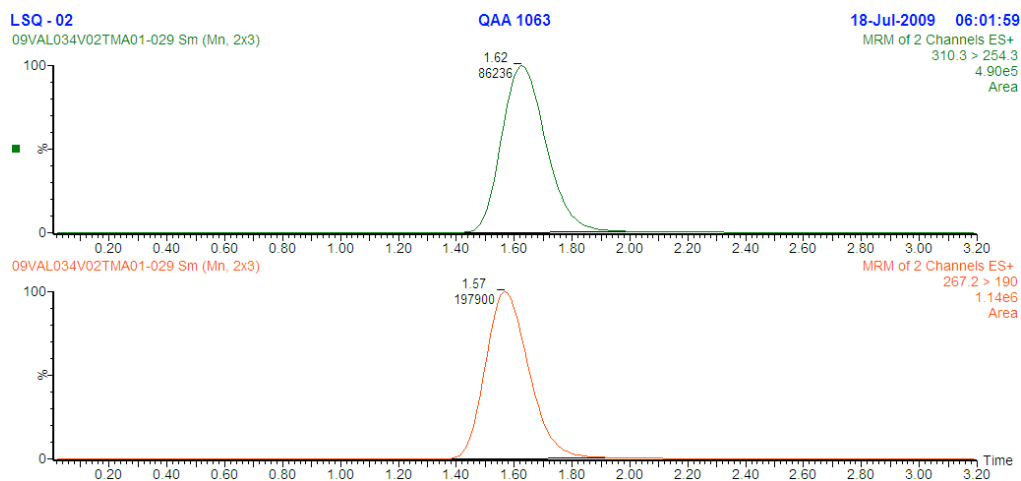
(b)

Figura 8: Cromatogramas para o teste de especificidade; a: Branco pool de plasma, b: Limite inferior de quantificação extraído.

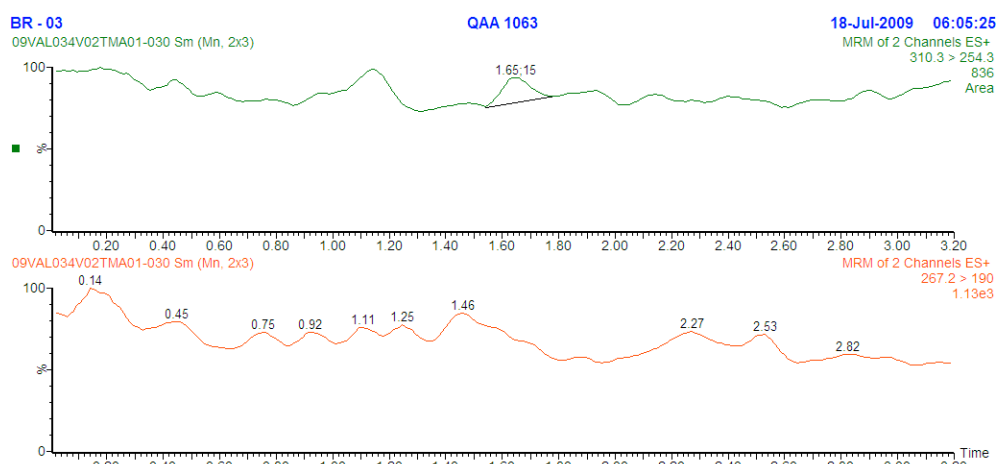
Não foi verificada nenhuma interferência significativa no tempo de retenção dos compostos, como pode ser observado na **Figura 8**. Vale ressaltar que todos os picos integrados nos cromatogramas são inferiores ao preconizado pela RE-899 (área menor que 20% da menor concentração para o analito e 5% para o padrão interno).

5.3.2 Carry-over

Não foi verificado nenhum efeito de *carry-over* significativo nos tempos de retenção dos compostos, como pode ser observado nos cromatogramas apresentados na **Figura 9**. Existe uma pequena área, mas é inferior a 20% da área do Limite Inferior de Quantificação.



(a)

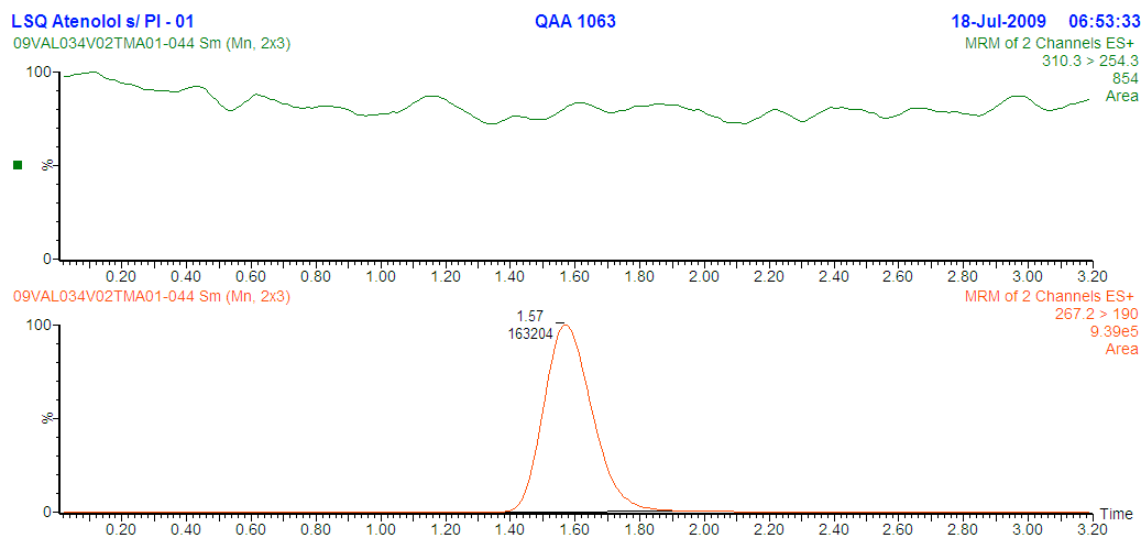


(b)

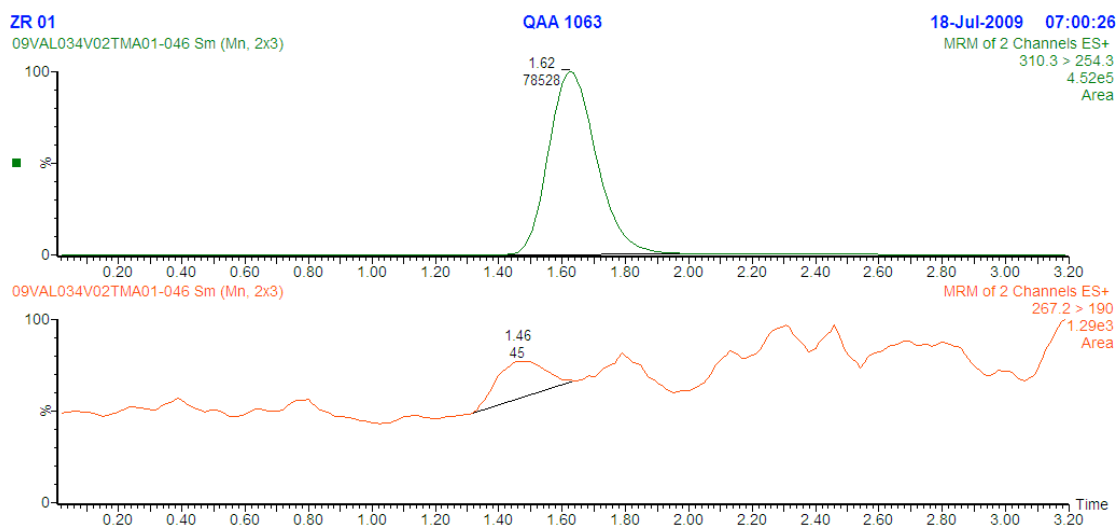
Figura 9: Teste de *carry-over*, a: Limite superior de quantificação (2000 ng/mL), b: Branco de plasma normal.

5.3.2 Cross-talk

O *cross-talk* ocorre quando há detecção cruzada entre o analito e o padrão interno. As substâncias foram injetadas diretamente, uma a uma, e não foi verificada detecção de picos no outro canal.



(a)



(b)

Figura 10: Cromatogramas para o teste de *cross-talk*; a: limite superior de quantificação (2000 ng/mL) sem padrão interno, b: amostra zero.

Não foi verificado efeito de *cross-talk* no tempo de retenção dos compostos, como pode ser observado nos cromatogramas apresentados na **Figura 10**.

5.3.4 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método obtidas pela análise intra e inter-ensaio de três amostras de controle de qualidade (n=9) são apresentadas nas **Tabelas 3 e 4**.

Tabela 3: Valores de concentração de controles de qualidade

Concentração esperada	30,00 ng/mL			800,00 ng/mL			1600,00 ng/mL		
Identificação da Corrida**	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Concentração calculada (ng/mL)	29,22	26,19	31,21	908,48	802,43	837,78	1667,24	1845,37*	1673,25
	31,49	27,30	33,58	766,22	746,03	827,36	1683,51	1584,62	1577,14
	35,85*	32,55	32,28	761,48	719,36	843,64	1685,16	1461,26	1589,49
	32,74	29,22	31,11	829,15	721,87	827,11	1806,01	1490,47	1586,97
	29,28	28,32	30,97	733,00	758,67	836,94	1732,67	1506,47	1763,08
	31,41	30,50	33,14	909,14	747,30	843,41	1777,05	1507,04	1596,07
	35,26*	31,52	29,96	920,13	761,97	861,29	1810,14	1408,80	1789,81
	34,28	33,31	29,47	806,91	780,17	750,70	1807,83	1488,22	1564,84
	30,52	31,82	30,88	944,03*	837,69	824,07	1782,82	1735,00	1628,97
Média intra-corrída	31,28	30,08	31,40	829,31	763,94	828,03	1750,27	1522,74	1641,07
Precisão intra-corrída	5,8	8,2	4,4	9,0	5,0	3,8	3,4	6,5	5,1
Exatidão intra-corrída	104,3	100,3	104,7	103,7	95,5	103,5	109,4	95,2	102,6
Média inter-corrída	30,89			806,24			1642,46		
Precisão inter-corrída	6,4			7,2			7,4		
Exatidão inter-corrída	103,0			100,8			102,7		

* Valor excluído do cálculo por apresentar desvio superior a 15% em relação ao valor teórico.

** 1: 09VAL034V02LVA02; 2: 09VAL034V02LVA03; 3: 09VAL034V02LVA04;

Tabela 4: Valores de concentração de controles de qualidade incluindo os valores com desvio superior a 15%

Concentração esperada	30,00 ng/mL			800,00 ng/mL			1600,00 ng/mL		
Identificação da Corrida**	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Concentração calculada (ng/mL)	29,22	26,19	31,21	908,48	802,43	837,78	1667,24	1845,4*	1673,3
	31,49	27,30	33,58	766,22	746,03	827,36	1683,5	1584,6	1577,1
	35,85*	32,55	32,28	761,48	719,36	843,64	1685,2	1461,3	1589,5
	32,74	29,22	31,11	829,15	721,87	827,11	1806,0	1490,5	1587,0
	29,28	28,32	30,97	733,00	758,67	836,94	1732,7	1506,5	1763,1
	31,41	30,50	33,14	909,14	747,30	843,41	1777,1	1507,0	1596,1
	35,26*	31,52	29,96	920,13	761,97	861,29	1810,1	1408,8	1789,8
	34,28	33,31	29,47	806,91	780,17	750,70	1807,8	1488,2	1564,8
	30,52	31,82	30,88	944,03*	837,69	824,07	1782,8	1735,0	1629,0
Média intra-corrída	32,23	30,08	31,40	842,06	763,94	828,03	1750,3	1558,6	1641,1
Precisão intra-corrída	7,7	8,2	4,4	9,5	5,0	3,8	3,4	9,1	5,1
Exatidão intra-corrída	107,4	100,3	104,7	105,3	95,5	103,5	21,9	19,5	20,5
Média inter-corrída	31,24			811,35			1650,0		
Precisão inter-corrída	7,2			7,7			7,6		
Exatidão inter-corrída	104,1			101,4			103,1		

* Valor incluído no cálculo com desvio superior a 15% em relação ao valor teórico.

** 1: 09VAL034V02LVA02; 2: 09VAL034V02LVA03; 3: 09VAL034V02LVA04;

Para calcular precisão e exatidão inter-corrída, utilizou-se todos os resultados obtidos nas três listas de validação. Esse cálculo representa a variabilidade entre o total de amostras analisadas.

5.3.5 Limite inferior de quantificação

Durante a validação, o pico do analito analisado apresentou-se definido e com precisão $\leq 20\%$ além de exatidão aceitável, proporcionando LIQ de 10 ng/mL.

Tabela 5: Valores de concentração de limite inferior de quantificação

Concentração esperada	10,00 ng /mL			10,00 ng /mL		
	1	2	3	1	2	3
Identificação da Corrida						
Concentração calculada (ng /mL)	11,37	10,65	11,91	11,37	10,65	11,91
	12,89*	10,46	12,13*	12,89**	10,46	12,13**
	12,66*	9,51	11,76	12,66**	9,51	11,76
	11,45	10,24	10,36	11,45	10,24	10,36
	11,28	10,84	10,56	11,28	10,84	10,56
	12,28*	10,27	9,46	12,28**	10,27	9,46
	11,98	9,50	10,15	11,98	9,50	10,15
	11,34	10,33	9,78	11,34	10,33	9,78
	11,55	9,93	11,71	11,55	9,93	11,71
Média intra-corrída	11,50	10,19	10,71	11,87	10,19	10,87
Precisão intra-corrída	2,2	4,6	8,9	5,2	4,6	9,3
Exatidão intra-corrída	115,0	101,9	107,1	118,7	101,9	108,7
Média inter-corrída	10,71			10,98		
Precisão inter-corrída	7,6			9,1		
Exatidão inter-corrída	107,1			109,8		

1: 09VAL034V02LVA02; 2: 09VAL034V02LVA03; 3: 09VAL034V02LVA04.

*: valor excluído do cálculo por apresentar desvio superior a 20%

** : valor incluído no cálculo.

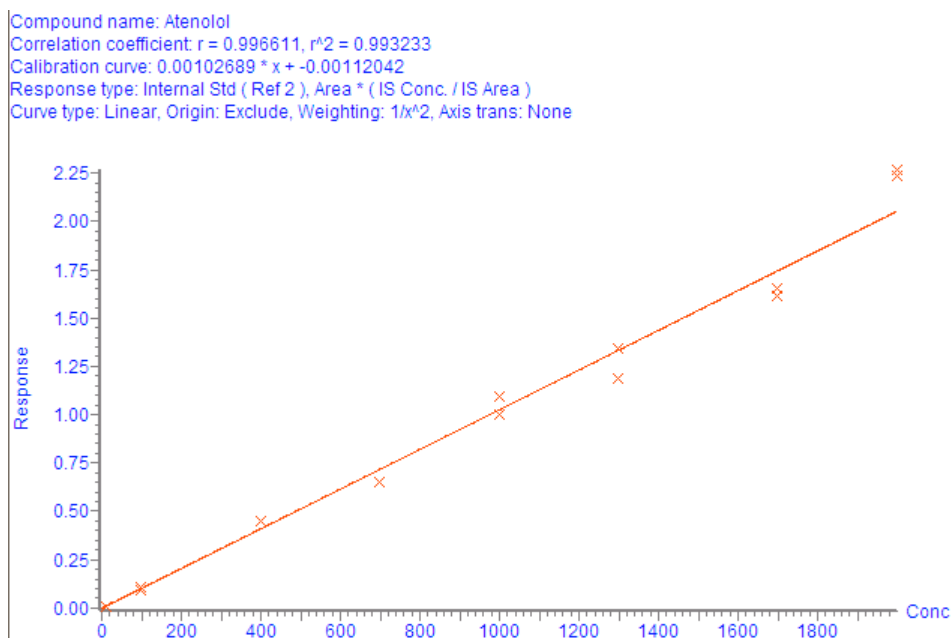
5.3.6 Linearidade

A curva de calibração e o modelo de regressão linear estão apresentados na **Figura 9**, e os resultados obtidos nas três listas de validação estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Valores de concentração de listas de validação

Conc. Nominal (ng /mL)	Modelo de Regressão			$y = mx + b (1/x^2)$			
	Concentração obtida (ng /mL)			Média (ng /mL)	Exatidão (%)	CV (%)	Conc. Aprovada?
	Nome da lista						
	1ª Lista de	2ª Lista de	3ª Lista de				
10,00	10,11	10,45	10,05	10,20	102,0	2,1	sim
	9,90	9,70	9,98	9,86	98,6	1,5	sim
100,00	91,48	92,37	93,42	92,42	92,4	1,1	sim
	106,19	92,80	99,91	99,63	99,6	6,7	sim
400,00	435,05	390,15	410,94	412,05	103,0	5,5	sim
	441,91	378,53	454,77	425,07	106,3	9,6	sim
700,00	637,08	656,08	696,09	663,08	94,7	4,5	sim
	636,74	677,72	715,97	676,81	96,7	5,9	sim
1000,00	973,36	1001,32	1015,46	996,71	99,7	2,1	sim
	1069,52	1149,19	962,51	1060,41	106,0	8,8	sim
1300,00	1310,04	1328,61	1308,22	1315,62	101,2	0,9	sim
	1160,26	1296,86	1309,06	1255,39	96,6	6,6	sim
1700,00	1572,65	1644,57	1669,90	1629,04	95,8	3,1	sim
	1612,36	1861,14	1647,27	1706,92	100,4	7,9	sim
2000,00	2180,31	2214,85	1949,84	2115,00	105,8	6,8	sim
	2208,37	1931,51	1929,44	2023,11	101,2	7,9	sim
r =	0,996611	0,997457	0,998901	-	-	-	-

1ª: 09VAL034V02LVA02; 2ª: 09VAL034V02LVA03; 3ª: 09VAL034V02LVA04

**Figura 11:** Curva de calibração para atenolol

5.3.6.1 Análise do modelo de regressão linear

A função resposta do método bioanalítico é uma relação entre a resposta do detector e a concentração do analito em relação ao padrão interno. A curva de calibração seguiu o modelo de regressão linear. É importante considerar que qualquer desvio de pontos individuais da linha reta é decorrente de erros na medida.

Para definir o melhor modelo de regressão linear, foram utilizadas seis diferentes curvas de calibração em matriz, provenientes de três diferentes conjuntos de soluções de trabalho e extraídas em sequência para análise, utilizando-se os mesmos procedimentos, parâmetros e condições do resto do processo de validação.

A equação de reta foi o modelo matemático escolhido para cálculo das curvas de calibração, apresentando-se a mais simples das opções.

A escolha do peso dos pontos se deu através da observação dos Diagramas de Dispersão (Erro Relativo) calculados para seis curvas de calibração, provenientes de três diferentes conjuntos de soluções de trabalho, usando-se ponderação $1/x$ e $1/x^2$ para comparação.

A uniformidade das variâncias (homocedasticidade) é um parâmetro comumente usado para avaliar a adequação da ponderação ao modelo experimental em questão.

Experimentos, em que a faixa de linearidade se estende através de duas ou mais ordens de magnitude, exigem que se diferencie o “peso” dos pontos situados nas extremidades. Comparando os dois gráficos de dispersão, um ponderado com $1/x$ e o outro com $1/x^2$, optou-se por utilizar a ponderação $1/x^2$, pois apresentou melhor dispersão dos desvios. Assim, a ponderação utilizada para quantificar todas as listas foi o modelo ponderado por $1/x^2$.

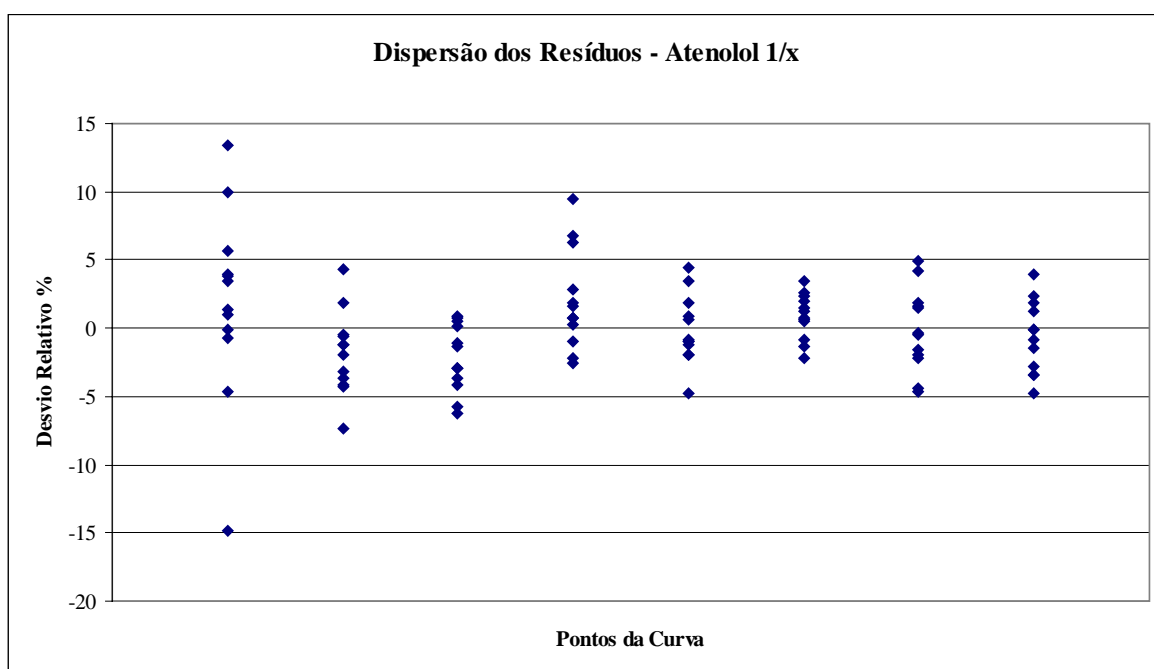
Características observadas nos gráficos de dispersão:

- 1 – Amplitude dos desvios de exatidão nas concentrações mais baixas;
- 2 – Distribuição da amplitude dos desvios ao longo da faixa de trabalho;
- 3 – Soma dos módulos dos desvios de exatidão para todas as concentrações.

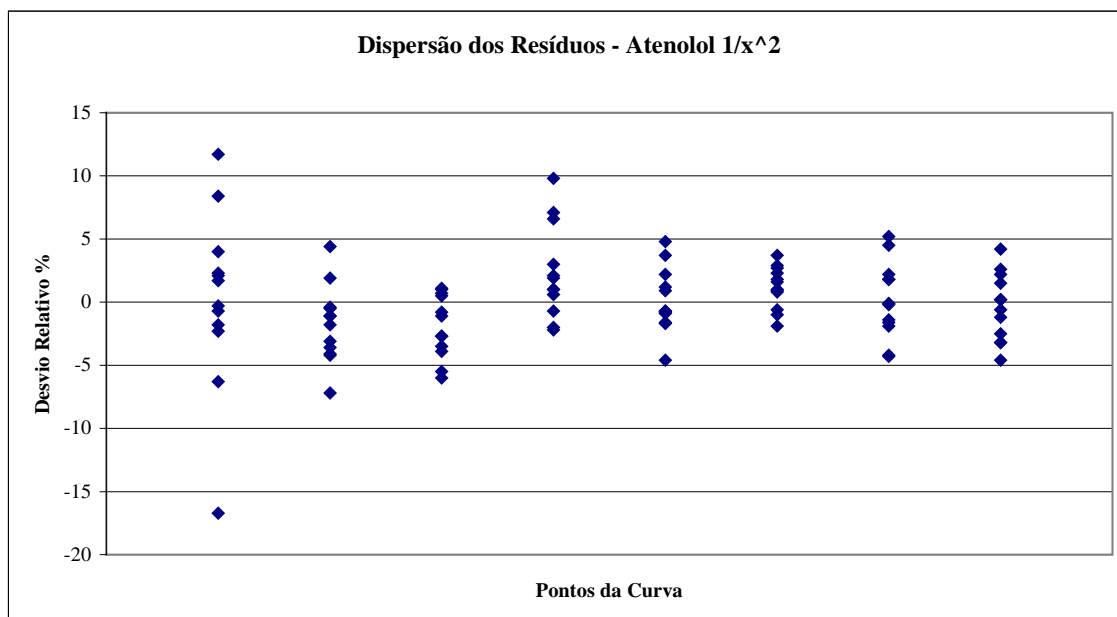
Soma dos módulos dos desvios de exatidão para todas as concentrações usando ponderação $1/x = 263,3$.

Soma dos módulos dos desvios de exatidão para todas as concentrações usando ponderação $1/x^2 = 259,6$.

Concluiu-se que a ponderação mais adequada para a equação que relaciona a resposta do equipamento com a concentração do analito foi $1/x^2$.



(a)



(b)

Figura 12: Gráfico de Dispersão dos Resíduos para Diferentes Ponderações; a: Ponderação $1/x$, b: Ponderação $1/x^2$.

Assim, foi concluído que a relação matemática que descreve o método bioanalítico para atenolol pode ser representada como:

$$y = mx + b \text{ (ponderação } 1/x^2 \text{) onde,}$$

y = relação entre a área do padrão de atenolol e a do padrão de nadolol;

m = coeficiente angular (inclinação da reta);

x = concentração analítica de atenolol;

b = intercepto.

Portanto, todas as listas para a validação do método bioanalítico de atenolol e estudo de estabilidade foram calculadas usando esse modelo de regressão linear.

5.3.6.2 Parâmetro de detecção

Limite de detecção (LD) = $DPa \times 3 / IC$

em que:

- DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de cinco curvas de calibração;
- IC média das inclinações de cinco curvas de calibração.

Tabela 7: Curva de calibração

	y = mx + b		
	m	b	r
09VAL034V02LVA02	0,00102689	-0,00112042	0,99661100
09VAL034V02LVA03	0,00113357	-0,00058212	0,99745700
09VAL034V02LVA04	0,00108862	-0,00008296	0,99890100
09VAL034V02ECP01	0,00103612	-0,00036474	0,99961700
09VAL034V02ECP02	0,00107353	0,00107980	0,99905200
Média	0,001071746	-0,000214087	-
Desvio Padrão	0,000042987	0,000817147	-

LD = 2,29 ng/mL

5.3.7 Recuperação

A recuperação de um fármaco em uma matriz biológica é a quantidade do analito obtida após o processo de separação. A comparação é feita com a concentração nominal de um padrão adicionada à matriz biológica antes do processo de separação. Os resultados obtidos na recuperação para o atenolol e seu PI estão apresentados nas **Tabelas 8, 9, 10 e 11**.

Tabela 8: Recuperação de atenolol em plasma normal.

Recuperação de atenolol em plasma normal – valores de área									
Tipo de Concentração	CQA – 30,00 ng/mL			CQB – 800,00 ng/mL			CQC – 1600,00 ng/mL		
Amostras	Amostra não Extraída	Amostra Extraída	Branco contaminado	Amostra não Extraída	Amostra Extraída	Branco contaminado	Amostra não Extraída	Amostra Extraída	Branco contaminado
1	6705	3162	5320	150211	71543	128172	324778	101021	280399
2	6611	3123	5572	150439	69046	152371	305023	107601	268534
3	8056	2498	5105	166956	71069	158959	428518	100220	301363
4	7832	2648	5636	150449	63084	135697	334838	125474	299304
5	7529	2648	5594	158024	63538	152596	329656	96819	315148
6	6886	2566	5573	177525	66727	149379	319753	117573	306768
Média	7270	2774	5467	158934	67501	146196	340428	108118	295253
CV (%)	8,5	10,5	3,8	7,1	5,4	8,0	13,0	10,4	5,9
Recup. Real (%)	50,7			46,2			36,6		
Média - R. Real (%)	44,5								
CV entre as médias (%)	16,2								
Recup. Absoluta (%)	38,2			42,5			31,8		
Média - R. Absoluta (%)	37,5								
CV entre as médias (%)	14,4								

A Recuperação real e absoluta também foram avaliadas para diferentes tipos de matrizes (plasma lipêmico e hemolisado) usando o controle de concentração média (CQB).

Tabela 9: Recuperação de atenolol em diferentes matrizes.

Recuperação de atenolol em diferentes matrizes – CQB (valores de área)							
Tipo de Plasma	Normal			Lipêmico		Hemolisado	
Amostras	Amostra não Extraída	Amostra Extraída	Branco contaminado	Amostra Extraída	Branco contaminado	Amostra Extraída	Branco contaminado
1	150211	71543	128172	77712	131796	76759	132271
2	150439	69046	152371	74613	144983	78917	145846
3	166956	71069	158959	88693	140728	70006	134739
4	150449	63084	135697	86324	154338	70643	154631
5	158024	63538	152596	79675	149985	70120	162834
6	177525	66727	149379	76550	149946	79608	139477
Média	158934	67501	146196	80595	145296	74342	144966
CV (%)	7,1	5,4	8,0	7,0	5,6	6,2	8,2
Recuperação Real (%)	46,2			55,5		51,3	
Média - R. Real (%)	51,0						
CV entre as médias (%)	9,1						
Recup. Absoluta (%)	42,5			50,7		46,8	
Média - R. Absoluta (%)	46,7						
CV entre as médias (%)	8,8						

Na **Tabela 10**, encontram-se os resultados dos cálculos para recuperação de nadolol em plasma normal. São apresentados os valores da média da recuperação real e absoluta, considerando a mesma concentração utilizada na realização do estudo.

Tabela 10: Recuperação de nadolol em plasma normal.

Recuperação de nadolol em plasma normal – valores de área			
Tipo de Concentração	CQ – 1,00 µg/mL		
Amostras	Amostra não Extraída	Amostra Extraída	Branco contaminado
1	149717	68639	139146
2	150296	67171	153088
3	164183	72964	155112
4	140988	61578	131493
5	154007	63314	150542
6	167182	70019	147677
Média	154396	67281	146176
CV (%)	6,3	6,3	6,2
Recup. Real (%)	46,0		
Recup. Absoluta (%)	43,6		

A Recuperação real e absoluta também foram avaliadas para diferentes tipos de matrizes (plasma lipêmico e hemolisado) na mesma concentração utilizada na realização do estudo.

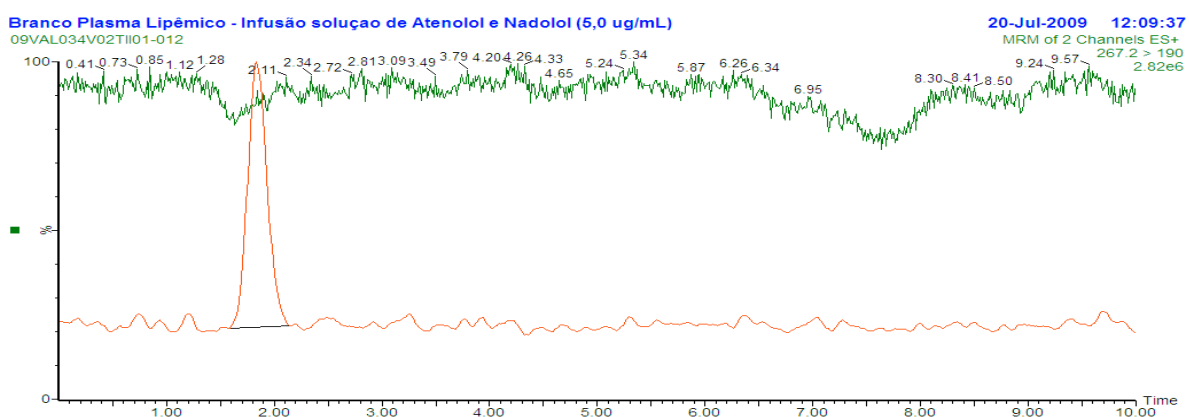
Tabela 11: Recuperação de nadolol em diferentes matrizes

Recuperação de Nadolol em Diferentes Matrizes – CQ (valores de área)							
Tipo de Plasma	Normal			Lipêmico		Hemolisado	
Amostras	Amostra não Extraída	Amostra Extraída	Branco contaminado	Amostra Extraída	Branco contaminado	Amostra Extraída	Branco contaminado
1	149717	68639	139146	85496	148732	83284	133151
2	150296	67171	153088	70105	151116	83447	147489
3	164183	72964	155112	96558	145914	74283	124751
4	140988	61578	131493	90863	156506	75927	154673
5	154007	63314	150542	89802	157788	76723	161646
6	167182	70019	147677	82842	160763	89361	151989
Média	154396	67281	146176	85944	153470	80504	145617
CV (%)	6,3	6,3	6,2	10,6	3,8	7,2	9,6
Recuperação Real (%)	46,0			56,0		55,3	
Média - R. Real (%)	52,4						
CV entre as médias (%)	10,6						
Recup. Absoluta (%)	43,6			55,7		52,1	
Média - R. Absoluta (%)	50,5						
CV entre as médias (%)	12,3						

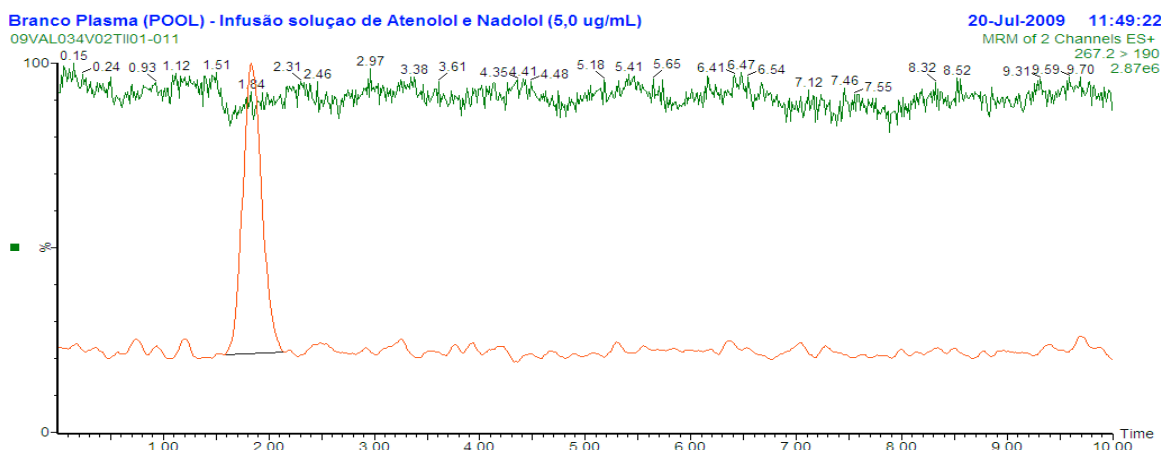
Para realização do teste de recuperação do nadolol, considerou-se a mesma concentração utilizada no protocolo de extração das amostras. O teste foi realizado utilizando a solução de nadolol de 1,00 µg/mL.

5.3.8 Teste de interferência iônica

Segue os cromatogramas obtidos.



(a)



b)

Figura 13: Cromatogramas típicos do teste de supressão; a: limite inferior de quantificação com infusão de solução diluente, b: sobreposição entre cromatogramas de limite inferior de quantificação e Branco de pool de plasma normal com infusão de mistura de atenolol e nadolol.

Os cromatogramas em vermelho correspondem à injeção da amostra de LIQ com infusão de solução diluente, ambas apresentadas nos canais do analito e do padrão interno, separadamente. Os cromatogramas em verde correspondem às injeções dos diferentes plasmas com infusão das soluções de atenolol e nadolol. É importante observar que os tempos de retenção do analito e do padrão interno são de aproximadamente 1,8 minutos, nessas condições. Analisando os cromatogramas para a injeção de plasmas brancos, é possível perceber uma pequena supressão iônica próxima ao tempo de retenção das substâncias. A coeluição do analito e do padrão interno garante a correção dessas possíveis supressões.

Assim, pode-se concluir que a interferência iônica não compromete os resultados.

5.3.9 Estabilidade

Esses procedimentos têm a finalidade de avaliar a estabilidade do analito em plasma humano sob diferentes condições de tempo e temperatura, assim como em soluções concentradas e em soluções de trabalho.

A estabilidade de uma droga em um fluido biológico é função das propriedades químicas do fármaco, da matriz e das condições de estocagem. A estabilidade é relevante apenas para a matriz biológica ensaiada (plasma, soro, urina, etc.) em um sistema de estocagem em particular (temperatura, pressão, concentração, etc), não devendo ser extrapolada para outros sistemas.

As conclusões seguintes foram baseadas nos resultados obtidos em cada teste de estabilidade executado durante o processo de validação de atenolol e nadolol (padrão interno).

5.3.9.1 Estabilidade de pós-processamento

O teste executado indica que amostras processadas de atenolol e nadolol podem ser mantidas em temperatura de 2 °C a 8 °C por um período de 73 horas e 18 minutos, uma vez que as amostras teste não apresentaram degradação significativa.

5.3.9.2 Estabilidade de congelamento/descongelamento

O teste executado indica que atenolol em plasma humano é estável por três ciclos de congelamento/descongelamento, quando estocado a 20 °C negativos.

5.3.9.3 Estabilidade a curto prazo

O teste executado indica que atenolol em plasma humano, após mantido em temperatura ambiente por 24 horas, não apresenta degradação significativa.

5.3.9.4 Estabilidade a longo prazo

O teste executado indica que amostras de atenolol em plasma humano são estáveis por 100 dias e 17,17 horas, quando armazenadas a 20 °C negativos.

5.3.9.5 Estabilidade em solução mãe de atenolol

O teste executado indica que solução-mãe de atenolol, quando armazenada de 2 °C a 8 °C, não apresenta degradação significativa por 90 dias.

5.3.9.6 Estabilidade em solução-mãe de nadolol

O teste executado indica que solução-mãe de nadolol, quando armazenada de 2 °C a 8 °C, não apresenta degradação significativa por 26 dias.

5.3.9.7 Estabilidade em solução-de trabalho para atenolol à temperatura ambiente

O teste executado indica que solução de trabalho de atenolol mantida, à temperatura ambiente por 23 horas e 30 minutos, não apresenta degradação significativa.

5.3.9.8 Estabilidade em solução-de trabalho para nadolol à temperatura ambiente

O teste executado indica que solução de trabalho de nadolol, mantida à temperatura ambiente por 13 horas e 5 minutos, não apresenta degradação significativa.

5.3. Aplicação do método

Após validação do método bioanalítico, 1237 amostras de plasma de voluntários sadios (31 voluntários x 20 tempos de coleta x 2 fases) foram processadas em lotes, os quais encerravam uma curva de calibração e seis controles de qualidade de cada nível de concentração (baixa, média e alta). Os resultados dos controles de qualidade, analisados durante as corridas analíticas, demonstram que o método é completamente válido para a quantificação de atenolol em amostras de voluntários. As concentrações plasmáticas individuais dos medicamentos teste e referência encontram-se nas **Tabelas 12 a 19**.

A **Figura 14** mostra a curva média da concentração plasmática de atenolol em função do tempo, após a administração oral das formulações teste e referência. Os principais parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da curva de concentração *versus* tempo estão apresentados nas **Tabelas 20 e 21**. Após 48 horas, a concentração de atenolol decaiu para aproximadamente 10 ng/mL, próximo ao LIQ do analito. A C_{max} do atenolol foi atingida em torno de 2,4 horas após administração oral.

Tabela 12: Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol

Voluntário	01		02		03		04	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
-00:30	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
00:20	204,55	125,84	288,13	120,07	17,84	24,86	17,81	36,18
00:40	464,41	405,32	895,79	750,98	117,50	128,01	279,44	206,75
01:00	465,11	487,10	1014,57	728,61	236,31	183,12	422,09	355,84
01:20	533,31	506,77	1151,44	592,03	322,28	203,67	571,08	431,29
01:40	522,51	595,25	997,00	537,71	363,12	196,14	783,84	805,56
02:00	560,83	918,48	788,46	583,75	333,15	310,07	1161,00	1022,80
02:20	545,37	921,12	737,13	536,30	339,15	346,31	1047,99	903,99
02:40	684,40	1024,87	762,95	466,53	410,40	511,60	1031,63	793,27
03:00	774,27	1102,10	754,66	448,47	542,54	703,97	920,05	718,54
03:30	794,73	1073,71	660,53	390,83	483,29	571,82	871,09	669,44
04:00	928,04	1046,80	717,17	310,51	445,16	569,55	836,65	624,59
05:00	690,94	855,56	562,12	306,23	383,18	465,96	680,67	582,90
06:00	614,09	702,73	545,38	254,87	308,07	352,92	559,98	469,68
08:00	477,94	544,71	338,64	187,79	212,94	280,56	411,63	340,71
10:00	360,36	393,38	246,56	145,43	164,79	206,11	318,39	260,82
14:00	212,24	240,58	141,88	81,18	100,10	109,34	200,87	158,54
18:00	143,41	150,95	87,82	49,84	65,72	76,74	105,30	108,40
24:00	74,48	83,15	51,66	31,04	35,26	43,98	56,64	56,49
48:00	11,69	ALIQ	ALIQ	10,58	ALIQ	ALIQ	-	-

Tabela 13: Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol

Voluntário	05		06		09		10	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II

Voluntário	05		06		09		10	
-00:30	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
00:20	76,17	44,10	35,05	ALIQ	14,48	64,94	20,26	79,36
00:40	283,73	281,33	147,48	137,40	138,01	258,05	231,60	425,07
01:00	405,48	289,97	222,82	457,10	320,46	459,63	575,32	661,48
01:20	499,56	268,26	411,88	481,38	382,10	456,72	605,17	613,91
01:40	494,75	242,71	535,09	419,94	440,58	418,14	576,16	537,76
02:00	489,26	307,22	564,29	437,09	531,16	450,79	630,04	518,73
02:20	490,44	407,77	560,47	466,36	622,02	505,06	604,84	642,68
02:40	492,03	452,10	547,62	469,95	621,07	455,54	711,20	582,17
03:00	474,88	463,65	594,78	515,97	897,16	597,33	733,42	632,89
03:30	498,82	401,68	804,30	473,22	660,50	513,89	573,88	482,17
04:00	533,69	371,85	658,28	405,92	678,21	583,47	534,58	481,14
05:00	438,49	318,05	608,04	313,39	609,79	475,71	538,29	354,48
06:00	398,52	267,43	469,76	263,77	378,24	312,90	346,11	327,89
08:00	302,14	210,21	345,00	210,70	279,43	229,84	284,88	224,21
10:00	229,89	149,86	275,21	181,97	211,73	189,91	222,00	177,63
14:00	153,45	112,72	168,03	117,21	168,32	124,22	127,36	102,30
18:00	97,69	95,78	121,86	89,81	78,30	63,27	89,16	68,28
24:00	61,33	60,63	74,50	61,61	39,18	30,24	43,19	49,80
48:00	13,11	11,66	12,25	10,54	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ

Tabela 14: Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol

Voluntário	12		14		16		17	
Tempo (h)	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
-00:30	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
00:20	57,13	13,40	29,99	126,65	53,06	35,84	97,45	29,57
00:40	404,00	115,01	108,58	355,93	290,38	110,12	360,74	432,39
01:00	610,79	342,79	365,63	526,26	360,69	209,55	563,48	534,20
01:20	531,65	441,89	456,97	746,66	620,02	304,35	492,29	446,58
01:40	669,38	465,17	466,65	758,99	495,11	373,64	626,20	344,49
02:00	663,60	568,73	526,69	799,21	442,68	415,16	466,23	341,80
02:20	625,79	636,61	548,64	765,85	508,92	406,38	428,64	311,24
02:40	649,51	706,30	616,14	835,71	462,24	486,63	406,47	334,03
03:00	596,16	577,65	687,88	954,52	392,38	511,62	413,47	359,31
03:30	729,48	553,70	610,23	761,03	350,01	399,16	423,05	351,26
04:00	636,73	471,32	571,30	643,93	330,50	351,75	384,39	367,01
05:00	657,14	401,16	428,71	550,10	314,65	308,09	342,06	377,94
06:00	510,79	352,63	340,53	493,88	263,41	285,42	306,36	448,42
08:00	380,94	288,78	294,22	373,81	199,84	206,36	239,81	313,98
10:00	305,81	246,64	253,77	285,48	171,69	168,77	175,78	236,72
14:00	211,84	153,09	172,18	191,04	95,87	116,39	109,19	142,41
18:00	120,58	95,94	109,76	123,20	75,50	77,46	79,61	108,43
24:00	79,36	72,19	74,21	70,31	44,38	42,88	46,30	57,23
48:00	ALIQ	ALIQ	16,56	10,96	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ

Tabela 15: Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol

Voluntário	18	19	20	21
-------------------	-----------	-----------	-----------	-----------

Voluntário	18		19		20		21	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
-00:30	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
00:20	79,48	46,41	12,98	56,22	110,14	37,90	114,73	143,63
00:40	231,67	184,48	207,70	176,60	362,94	326,13	312,52	373,40
01:00	423,42	508,30	592,53	351,40	400,50	420,75	478,91	622,59
01:20	493,09	572,78	923,14	557,96	404,45	422,07	684,87	863,18
01:40	549,00	664,70	1210,11	571,62	416,36	413,47	683,69	797,91
02:00	582,62	668,06	738,99	577,16	488,24	392,14	605,92	737,74
02:20	756,69	712,00	757,03	519,52	671,98	378,29	559,28	637,49
02:40	743,61	682,26	660,71	514,82	649,78	353,09	520,10	577,42
03:00	685,97	734,13	640,60	556,49	660,95	410,82	495,50	581,61
03:30	670,80	757,90	633,49	619,85	647,98	462,46	576,58	692,98
04:00	626,39	759,39	582,47	643,79	609,66	399,88	589,86	670,18
05:00	590,92	634,43	443,29	547,45	521,65	344,97	461,89	550,72
06:00	538,67	509,32	401,63	465,58	396,15	284,42	352,45	403,41
08:00	342,81	342,54	270,31	330,86	329,68	205,33	253,88	266,82
10:00	254,11	280,04	231,08	255,39	215,52	155,64	184,85	208,51
14:00	153,43	149,58	119,29	141,90	132,45	96,98	100,36	106,19
18:00	90,65	97,06	71,20	79,22	70,30	59,79	58,36	60,22
24:00	48,93	58,33	36,44	47,03	42,53	36,00	31,11	31,25
48:00	ALIQ	ALIQ	ALIQ	10,73	11,02	ALIQ	ALIQ	ALIQ

Tabela 16: Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol

Voluntário	22		23		24		25	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
-00:30	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
00:20	127,29	31,15	200,14	102,51	382,69	72,19	50,17	84,67
00:40	197,53	91,35	319,13	295,46	1026,96	701,16	154,72	250,21
01:00	266,51	69,97	355,20	262,79	1260,75	984,12	212,92	271,83
01:20	330,94	67,13	403,95	246,93	1217,90	987,08	302,48	279,88
01:40	325,01	146,34	369,79	241,83	1328,58	976,24	330,06	306,59
02:00	277,33	328,39	304,25	290,13	1070,05	986,07	343,06	296,97
02:20	352,47	322,78	291,84	390,97	992,54	948,58	323,74	289,31
02:40	357,62	313,07	285,68	362,92	954,80	1041,71	315,25	284,93
03:00	437,63	344,81	239,96	340,24	858,09	977,00	300,85	280,48
03:30	402,35	352,23	208,50	275,04	868,45	939,69	252,55	282,22
04:00	434,63	318,20	212,33	243,64	858,30	774,56	252,54	287,24
05:00	381,06	325,22	182,81	207,03	755,74	646,73	207,11	222,36
06:00	321,43	286,23	160,59	176,67	596,91	542,65	174,90	177,62
08:00	238,33	180,70	123,63	131,80	389,86	358,42	120,47	129,82
10:00	169,54	130,33	99,38	101,39	278,78	252,68	79,09	103,88
14:00	79,74	70,04	57,48	68,38	148,01	135,28	48,58	51,20
18:00	50,12	44,81	38,64	44,87	80,12	78,06	34,63	35,05
24:00	26,53	28,06	23,92	25,40	45,07	46,07	23,23	24,13
48:00	11,64	11,25	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ

Tabela 17: Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol

Voluntário	26		27		28		30	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
-00:30	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
00:20	126,22	68,87	104,11	159,88	153,37	27,97	31,67	140,79
00:40	386,68	376,59	444,68	901,55	408,86	106,57	584,49	573,82
01:00	703,31	468,91	591,39	1109,77	450,30	253,08	805,11	877,93
01:20	646,82	465,83	689,98	1036,72	424,93	422,97	799,43	843,30
01:40	558,03	453,62	838,58	1039,24	390,76	408,33	1180,92	742,84
02:00	473,14	579,91	793,01	1420,50	367,57	380,47	1371,28	744,32
02:20	520,17	593,48	739,05	1212,30	378,33	370,33	1348,78	835,65
02:40	797,96	571,20	722,64	1181,50	417,03	413,65	1147,35	839,84
03:00	1008,41	625,89	663,28	1211,05	447,40	488,95	1035,30	725,59
03:30	863,39	575,42	581,20	1081,87	436,64	662,04	852,77	683,63
04:00	691,20	478,00	527,86	968,54	519,57	761,99	806,32	600,61
05:00	596,60	368,22	452,93	858,67	835,44	837,80	640,15	489,89
06:00	455,97	306,76	412,01	684,04	692,08	646,30	542,86	416,67
08:00	312,75	236,20	320,71	512,22	414,19	367,92	336,81	287,91
10:00	217,17	161,80	266,49	408,68	243,02	294,19	287,78	218,34
14:00	113,96	79,72	153,79	261,19	120,50	107,02	176,00	143,85
18:00	66,06	50,99	105,77	176,06	59,42	57,17	122,33	91,45
24:00	32,12	25,66	66,04	103,56	26,09	25,87	64,87	53,11
48:00	ALIQ	ALIQ	17,15	18,05	ALIQ	ALIQ	10,73	17,53

Tabela 18: Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol

Voluntário	31		32		33		34	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
-00:30	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
00:20	66,94	48,23	336,20	295,19	115,00	17,36	69,89	78,78
00:40	393,66	354,55	674,52	718,65	237,32	191,19	246,02	220,06
01:00	679,71	596,69	744,50	754,68	306,62	260,63	331,35	294,79
01:20	810,24	1123,80	699,33	734,41	374,94	268,47	382,56	456,16
01:40	930,24	1025,63	822,86	680,52	516,28	438,35	401,22	505,37
02:00	1053,25	930,78	819,41	598,82	500,08	398,41	399,82	471,01
02:20	812,77	813,53	773,96	560,70	519,28	367,63	348,23	383,54
02:40	775,75	760,95	682,55	543,95	523,86	332,95	317,73	368,53
03:00	765,30	747,69	648,02	517,18	492,33	336,92	342,30	390,68
03:30	651,51	686,21	593,36	492,24	405,06	328,46	315,64	390,42
04:00	564,20	605,46	513,40	421,72	360,67	362,90	323,63	382,30
05:00	470,17	506,62	418,27	390,50	349,87	324,14	259,44	356,62
06:00	396,94	421,30	344,79	287,89	351,44	242,23	220,40	277,23
08:00	292,22	302,20	228,33	196,98	200,05	171,05	164,07	200,99
10:00	220,85	220,39	160,66	146,44	144,83	117,73	123,99	159,80
14:00	129,50	131,03	73,66	78,68	69,55	58,40	69,82	83,42
18:00	85,92	86,67	45,24	45,58	43,64	34,34	48,16	49,76
24:00	45,08	44,96	22,55	22,71	23,95	20,49	28,29	30,45
48:00	13,26	11,11	-	ALIQ	ALIQ	ALIQ	15,60	13,73

Tabela 19: Concentrações plasmáticas individuais dos produtos teste e referência para atenolol

Voluntário	35		37		38	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
-00:30	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ	ALIQ
00:20	241,92	73,97	182,95	126,35	15,16	56,50
00:40	443,85	584,97	707,33	552,24	134,03	225,02
01:00	582,59	847,73	820,69	680,54	343,14	221,63
01:20	745,62	728,23	858,61	630,93	444,99	268,36
01:40	845,76	721,76	718,84	529,56	562,36	315,13
02:00	802,11	643,00	713,36	485,25	574,57	326,53
02:20	757,05	618,78	687,80	423,27	644,74	355,59
02:40	796,61	555,12	713,71	387,94	682,04	547,22
03:00	815,95	584,26	672,07	334,45	671,02	621,45
03:30	736,74	506,79	490,53	326,13	638,80	701,20
04:00	607,56	457,36	474,84	317,89	623,19	751,32
05:00	536,71	404,43	381,82	257,17	552,08	483,42
06:00	418,27	331,25	332,85	235,92	456,37	386,83
08:00	344,69	268,13	219,24	179,24	306,22	280,56
10:00	234,20	195,29	167,83	144,39	242,89	196,83
14:00	128,45	101,30	80,51	79,38	112,95	113,12
18:00	68,92	63,18	60,45	55,25	81,60	79,92
24:00	34,35	37,66	31,16	35,33	43,92	43,26
48:00	ALIQ	ALIQ	ALIQ	14,90	ALIQ	ALIQ

5.5. Análise descritiva das medidas farmacocinéticas

Essas medidas resumem os dados multivariados (concentrações plasmáticas repetidas ao longo do tempo), as quais refletem o comportamento de absorção e eliminação dos fármacos R e T.

As estatísticas para as medidas farmacocinéticas estão nas **Tabelas 20 e 21**, e para as médias das concentrações na **Tabela 22**.

Tabela 20: Estatísticas das medidas farmacocinéticas da formulação Referência

Parâmetro	Média	DP	EP	Mínimo	Mediana	Máximo	CV%
kel	0.1094	0.0291	0.0052	0.0557	0.1104	0.1804	26.6207
t _{1/2}	6.8239	1.977	0.3551	3.8431	6.2785	12.4364	28.9717
t _{max}	2.3868	1.1219	0.2015	1	2.33	5	47.0053
C _{max}	773.3429	261.6163	46.9877	306.59	754.68	1420.5	33.8293
ASCo-t	6048.3841	1968.7154	353.5917	2674.1759	6079.9844	12288.1335	32.5494
ASCo-inf	6325.2928	1964.4596	352.8274	2885.1055	6224.6388	12507.0254	31.0572
%ASC	95.2%	2.6%	0.5%	90.3%	96.1%	98.6%	269.2%

Tabela 21: Estatísticas das medidas farmacocinéticas da formulação Teste

Parâmetro	Média	DP	EP	Mínimo	Mediana	Máximo	CV%
kel	0.1085	0.0309	0.0056	0.0597	0.1147	0.1797	28.503
t1/2	6.974	2.191	0.3935	3.8568	6.0453	11.618	31.4167
tmax	2.3987	0.9626	0.1729	0.67	2.67	5	40.1289
Cmax	733.1894	266.3791	47.8431	343.06	687.88	1371.28	36.3316
ASCo-t	5544.8129	1740.9901	312.691	2503.4369	5356.7703	9587.9249	31.3985
ASCo-inf	5830.7726	1792.1	321.8707	2713.9115	5499.2172	10284.748	30.7352
%ASC	94.9%	2.4%	0.4%	87.7%	95.4%	98.7%	255.9%

Tabela 22: Medidas farmacocinéticas das médias das concentrações plasmáticas dos medicamentos de referência (R) e teste (T)

Medicamento	Tmax	Cmax	K_e	$T_{1/2}$	ASCo-t	ASCo-∞
R	2,4	773,3429	0,1094	6,8239	6048,3841	6325,2928
T	2,4	733,1894	0,1085	6,974	5544,8129	5830,7726

Analisando a **Tabela 22**, observa-se um mesmo padrão das medidas farmacocinéticas para os dois medicamentos (R e T).

A seguir está apresentado gráfico da curva média da concentração plasmática de atenolol para os medicamentos referência e teste baseada em 31 voluntários.

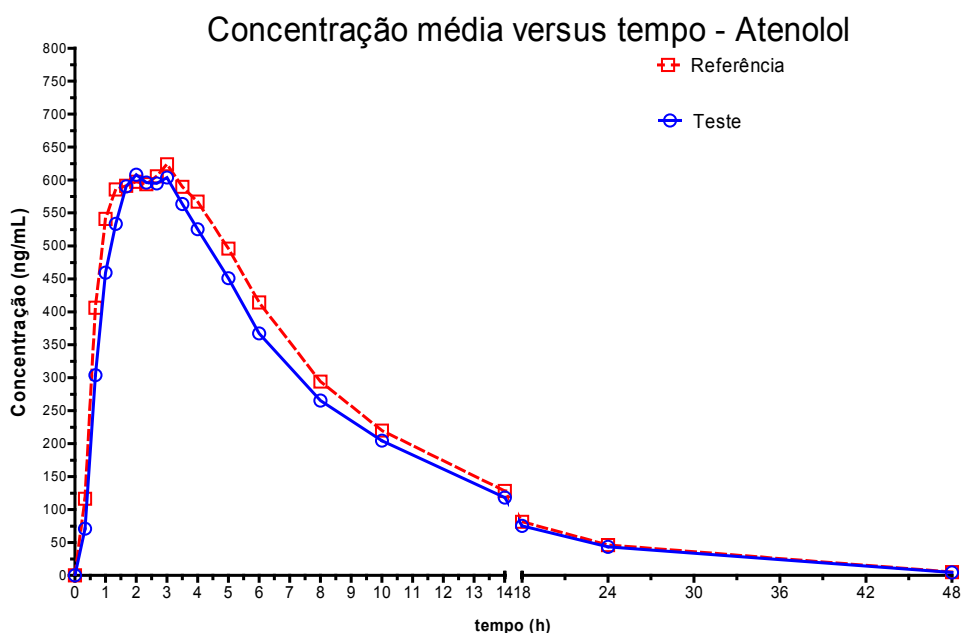


Figura 14: Curva média da concentração plasmática de atenolol de 31 voluntários sadios que participaram do estudo de bioequivalência entre os produtos atenolol (medicamento teste) e atenol® (medicamento referência) versus tempo (h).

Pode-se observar que as médias, medianas e desvios-padrão crescem e depois decrescem ao longo do tempo, refletindo o comportamento natural do fármaco no organismo referentes às fases de absorção até eliminação.

5.6 Resultados de enzima conversora de angiotensina

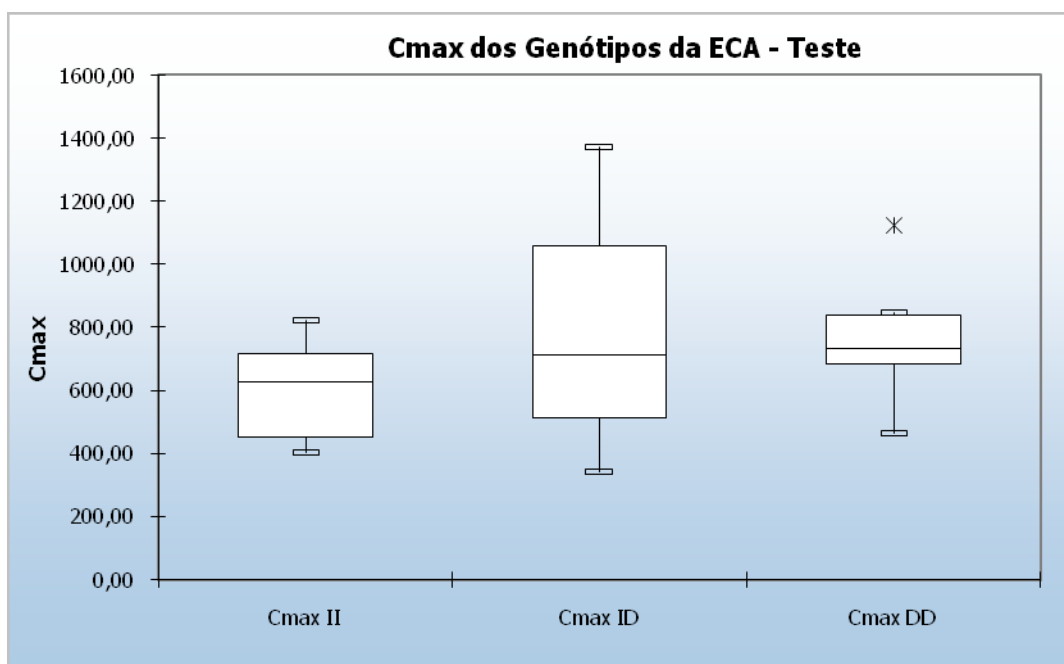
Na **Tabela 23** estão apresentados os resultados obtidos para o polimorfismo ECA.

Tabela 23: Resultados Enzima Conversora de Angiotensina

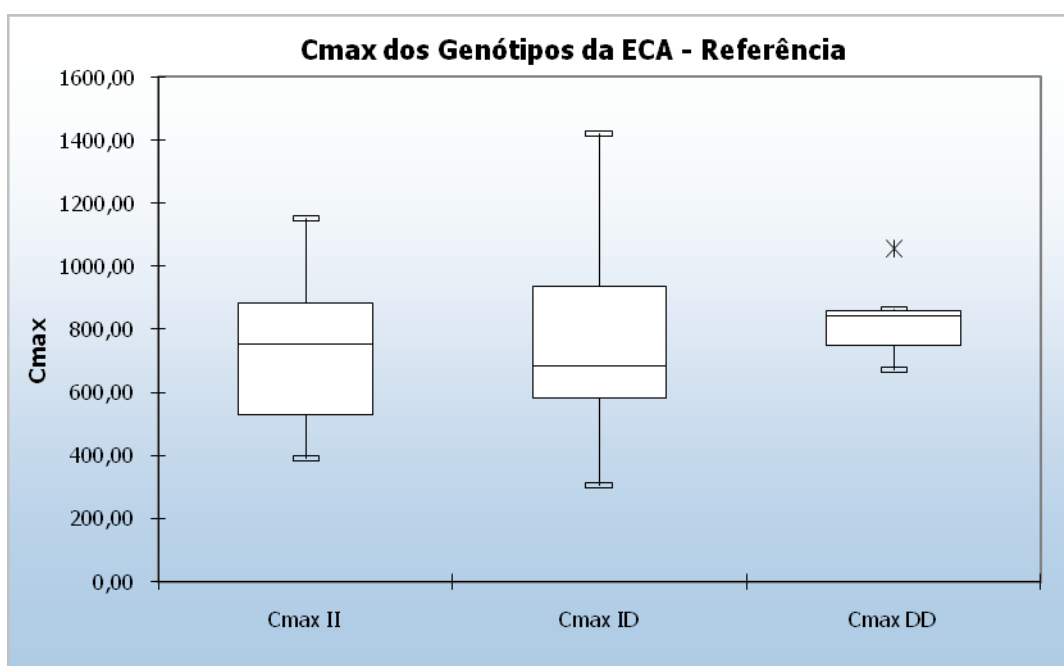
Voluntário	Genótipo do polimorfismo ECA
1	ID
2	II
3	ID
4	ID
5	II
6	ID
9	ID
10	ID
12	DD
14	ID
16	ID
17	ID
18	DD
19	ID
20	DD
21	DD
22	ID
23	II
24	ID
25	ID
26	II
27	ID
28	DD
30	ID
31	DD
32	II
33	II
34	ID
35	DD
37	DD
38	II

Analisando os resultados apresentados, pode-se constatar que foram encontrados 16 voluntários ID, 8 voluntários DD e 7 voluntários II, representando 51,6%, 25,8% e 22,6% do total de voluntários participantes do

estudo. Dessa forma, os grupos II, ID e DD foram separados e construiu-se gráfico com os valores de Cmax para cada grupo.



(a)



(b)

Figura 15: Distribuição dos grupos de genótipos do polimorfismo da ECA para a: medicamento teste e b: medicamento referência

A análise gráfica indica que os grupos DD e II são diferentes em relação ao grupo ID quando comparados a média dos valores obtidos para Cmax.

Foi verificado que a diferença das médias para o medicamento teste *versus* o medicamento referência eram maiores para os grupos DD e II, sendo assim, a análise estatística para bioequivalência foi realizada usando *software* específico, *WINNONLIN LINEAR MIXED EFFECTS MODELING / BIOEQUIVALENCE Version 5.2.1 Build 2008033011 Core Version 17Oct2006*.

Os resultados completos da análise encontram-se nos anexos B, C e D. Segue abaixo os resultados a serem destacados:

Grupo ID

Cmax

	<i>Classical</i>	<i>Westlake</i>
CI 80% = (87.8281, 110.6451)	(88.4629, 111.5371)
CI 90% = (84.7435, 114.6725)	(84.9877, 115.0123)
CI 95% = (81.9986, 118.5112)	(81.7882, 118.2118)

ASC

	<i>Classical</i>	<i>Westlake</i>
CI 80% = (87.5075, 101.2511)	(89.6981, 110.3019)
CI 90% = (85.5535, 103.5637)	(87.4284, 112.5716)
CI 95% = (83.7925, 105.7402)	(85.4800, 114.5200)

Pode-se concluir que os resultados obtidos indicam a bioequivalência entre os medicamentos teste e referência para o grupo ID.

Grupo DD

Cmax

	<i>Classical</i>	<i>Westlake</i>
CI 80% = (81.4570, 99.3725)	(84.3856, 115.6144)
CI 90% = (78.6734, 102.8885)	(81.3105, 118.6895)
CI 95% = (75.9841, 106.5301)	(78.4837, 121.5163)

ASC

	<i>Classical</i>	<i>Westlake</i>
CI 80% =	(84.5315, 107.2024)	(86.9997, 113.0003)
CI 90% =	(81.0907, 111.7511)	(83.1583, 116.8417)
CI 95% =	(77.7890, 116.4944)	(79.4689, 120.5311)

Pode-se concluir que os resultados obtidos indicam a **não** bioequivalência entre os medicamentos teste e referência para o grupo DD.

Grupo II

Cmax

	<i>Classical</i>	<i>Westlake</i>
CI 80% =	(79.3742, 93.4875)	(81.8391, 118.1609)
CI 90% =	(77.0357, 96.3254)	(79.3451, 120.6549)
CI 95% =	(74.6992, 99.3383)	(76.9922, 123.0078)

ASC

	<i>Classical</i>	<i>Westlake</i>
CI 80% =	(83.6800, 93.3446)	(85.4161, 114.5839)
CI 90% =	(82.0254, 95.2275)	(83.6723, 116.3277)
CI 95% =	(80.3554, 97.2066)	(82.0137, 117.9863)

Pode-se concluir que os resultados obtidos indicam a não bioequivalência entre os medicamentos teste e referência para o grupo II.

O critério de decisão de bioequivalência das formulações referência e teste, de acordo com as especificações exigidas pela ANVISA, é avaliar se os intervalos de confiança para a razão das médias geométricas de ASC_{0-t} e C_{max} estão dentro dos limites de bioequivalência de 80 a 125% para o intervalo de confiança (IC) de 90%. O IC de 90% é definido como um intervalo sobre o valor estimado que garante, com 90% de certeza, que este intervalo contém o verdadeiro valor.

Sendo assim, pode-se verificar que quando considerado o grupo como um todo, ou seja, grupo constituído pelos voluntários ID, DD e II, o resultado do estudo é pela bioequivalência entre as duas formulações conforme relatório estatístico-anexo A. Em contrapartida, quando realizados os testes estatísticos para os grupos em separado ocorre a não bioequivalência para os grupos DD e II.

5.7 Resultados de citocromo P450 isoforma 2D6 alelo 4

Na **Tabela 24** estão apresentados os resultados obtidos para o polimorfismo CYP2D6*4.

Tabela 24: Resultados de CYP2D6*4

Voluntário	CYP2D6*4
1	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
2	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
3	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
4	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
5	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
6	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
9	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
10	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
12	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
14	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
16	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
17	Presença do polimorfismo CYP2D6*4 em heterozigose
18	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
19	Presença do polimorfismo CYP2D6*4 em homozigose
20	Presença do polimorfismo CYP2D6*4 em heterozigose
21	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
22	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
23	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
24	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
25	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
26	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
27	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
28	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
30	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
31	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
32	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
33	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
34	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
35	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
37	Ausência do polimorfismo CYP2D6*4
38	Presença do polimorfismo CYP2D6*4 em heterozigose

Os resultados obtidos para o CYP2D6*4 indicam a prevalência desse polimorfismo em 12,9% dos voluntários participantes do estudo de

bioequivalência, porcentagem superior à definida em literatura para a população brasileira que é de aproximadamente 3%.

Para o CYP2D6*4, foi realizada a análise estatística retirando os voluntários 17, 19, 20 e 38 conforme anexo E. Em seguida, estão descritos os resultados mais relevantes dessa análise.

Cmax

	<i>Classical</i>	<i>Westlake</i>
CI 80% =	(87.3196, 99.2042)	(89.2779, 110.7221)
CI 90% =	(85.6764, 101.1069)	(87.3131, 112.6869)
CI 95% =	(84.2293, 102.8439)	(85.6722, 114.3278)

ASC

	<i>Classical</i>	<i>Westlake</i>
CI 80% =	(88.6894, 97.9348)	(90.2389, 109.7611)
CI 90% =	(87.3897, 99.3913)	(88.6892, 111.3108)
CI 95% =	(86.2405, 100.7157)	(87.3904, 112.6096)

Estes resultados, quando comparados aos do relatório estatístico – anexo A, pode-se afirmar:

Embora o CYP2D6*4 seja um metabolizador lento, não foi observado nenhum Cmax superior para os voluntários 17, 19, 20 e 38, quando comparados a média dos voluntários. Esse fato pode ter sido devido a administração de uma única dose do medicamento e também em função do número de voluntários(31) envolvidos. Talvez, em pacientes em uso constante do medicamento pudéssemos evidenciar o efeito do metabolizador lento.

5.7 Análise dos componentes principais

A técnica de análise dos componentes principais (ACP) tem como finalidade explicar a estrutura de variância e covariância de um vetor aleatório. Composto por p variáveis, obtido por meio da combinação linear de k variáveis originais (MINGOTI, 2005).

Tal metodologia leva à redução do número de variáveis (atributos) explicativas, através de ferramentas adequadas para identificar as mais importantes no espaço dos componentes principais. Dessa forma, fornece uma visão privilegiada do conjunto de dados.

Uma breve explanação dos principais fundamentos do método supracitado objetiva proporcionar uma compreensão mínima (porém satisfatória) da técnica empregada no trabalho. O entendimento exaustivo do assunto requer o conhecimento de operações com matrizes e, por isso, optou-se por uma abordagem mais conceitual.

O procedimento consiste na transformação de um conjunto de variáveis a partir de uma combinação linear, em índices estatisticamente independentes, denominados de componentes principais. Por exemplo, um sistema com oito variáveis terá oito componentes principais após a transformação, cada qual sendo escrito como uma combinação linear daquelas variáveis originais. Nessas combinações, cada variável terá um peso ou importância diferente (MOITA NETO, 2004).

A vantagem desse método é que não existe a necessidade de se fazer quaisquer suposições iniciais a respeito da distribuição de probabilidade do conjunto de dados, bastando apenas que existam correlações entre variáveis observadas no início do processo.

Os componentes principais possuem três características que os tornam melhores do que as variáveis originais para a análise do conjunto de dados: a) pode haver correlação entre as variáveis – correlação esta que será excluída nos componentes principais, uma vez que estes são ortogonais entre si. Esse fato faz com que os componentes principais contêm informações estatísticas distintas uns dos outros; b) os componentes principais têm importância estatística decrescente, ao passo que as variáveis originais não se diferenciam neste sentido. Ou seja, de acordo com Simões (2005), os componentes são calculados de maneira que o primeiro capte a maior parcela da variância, e assim por diante.

Tendo em vista a relevância dos primeiros índices, os demais podem ser considerados na análise; c) a ortogonalidade dos componentes permite que eles sejam analisados separadamente e, sendo assim, consegue-se interpretar o peso das variáveis originais na combinação das componentes principais mais importantes (MOITA NETO, 2004).

Para o presente trabalho, foram retidos oito componentes principais, capazes de explicar 100% da variância total existente, sendo que os componentes principais para o medicamento referência apresentaram autovetores com valores positivos e negativos. Autovetores com valores positivos significa que o componente aumenta ou diminui em relação direta com as variáveis originais. Já para os autovetores negativos, a relação é indireta.

Tabela 25: Autovetores dos três primeiros componentes principais do medicamento referência

Variável	Componente 1	Componente 2	Componente 3
CYP2D6*4	-0,0366	0,205	0,7664
ECA	-0,1435	0,1873	-0,396
Cmax	0,5208	-0,0849	-0,1275
Tmax	0,0268	0,6659	0,2404
ASC _{0-t}	0,5631	0,1391	0,0177
ASC _{0-∞}	0,566	0,1338	0,0068
Idade	0,251	-0,5004	0,1845
Sexo	-0,0752	-0,4296	0,3839

Na **Tabela 26**, estão descritos os autovalores obtidos para o medicamento referência.

Tabela 26: Autovalores e percentuais de variância explicados pelos componentes principais para o medicamento referência

Componente	Autovalores	% Total da variância	Autovalor acumulado	Acumulada
Componente 1	2,9726	37,16	2,9726	37,16
Componente 2	1,4699	18,37	4,4425	55,53
Componente 3	1,1758	14,70	5,6183	70,23
Componente 4	0,9217	11,52	6,5401	81,75
Componente 5	0,7907	9,88	7,3308	91,63
Componente 6	0,5383	6,73	7,8691	98,36
Componente 7	0,1294	1,62	7,9985	99,98
Componente 8	0,0015	0,02	8	100

Analisando os autovalores dos componentes principais, descritos na **Tabela 26** e **Figura 16**, para o medicamento referência, observa-se que o primeiro

componente pode explicar 37,16% da variância total, o segundo componente pode explicar 18,37% da variância total, enquanto o terceiro componente pode explicar 14,70% da variância.

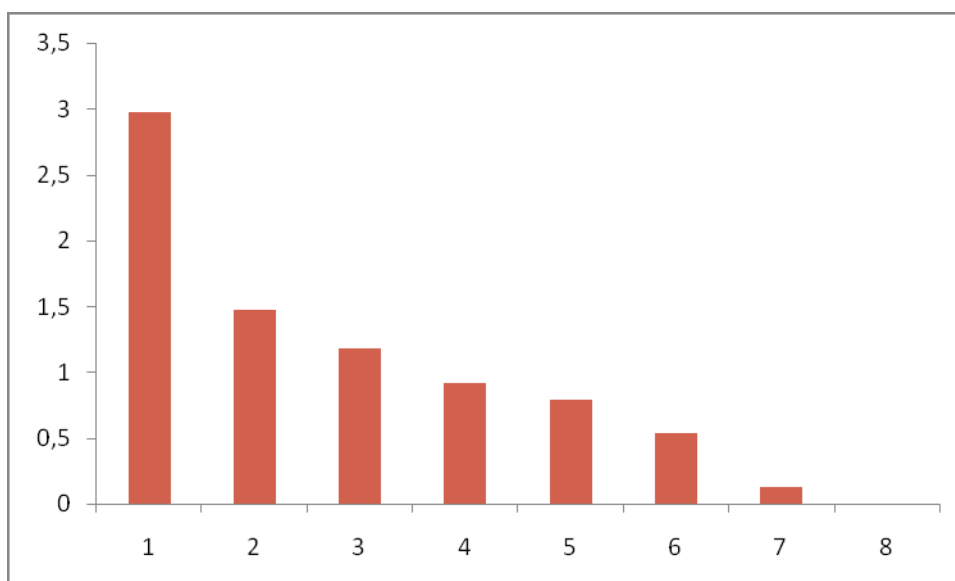


Figura 16 Contribuição dos autovalores para os componentes principais do medicamento referência

Para avaliar o conjunto de dados por completo foram usadas oito variáveis, CYP2D6*4, ECA, Cmax, Tmax, ASC_{0-t}, ASC_{0-∞}, idade e sexo para a construção do gráfico (**Figura 16**) para o medicamento referência. O *software* utilizado foi *Bioestat 4.0*.

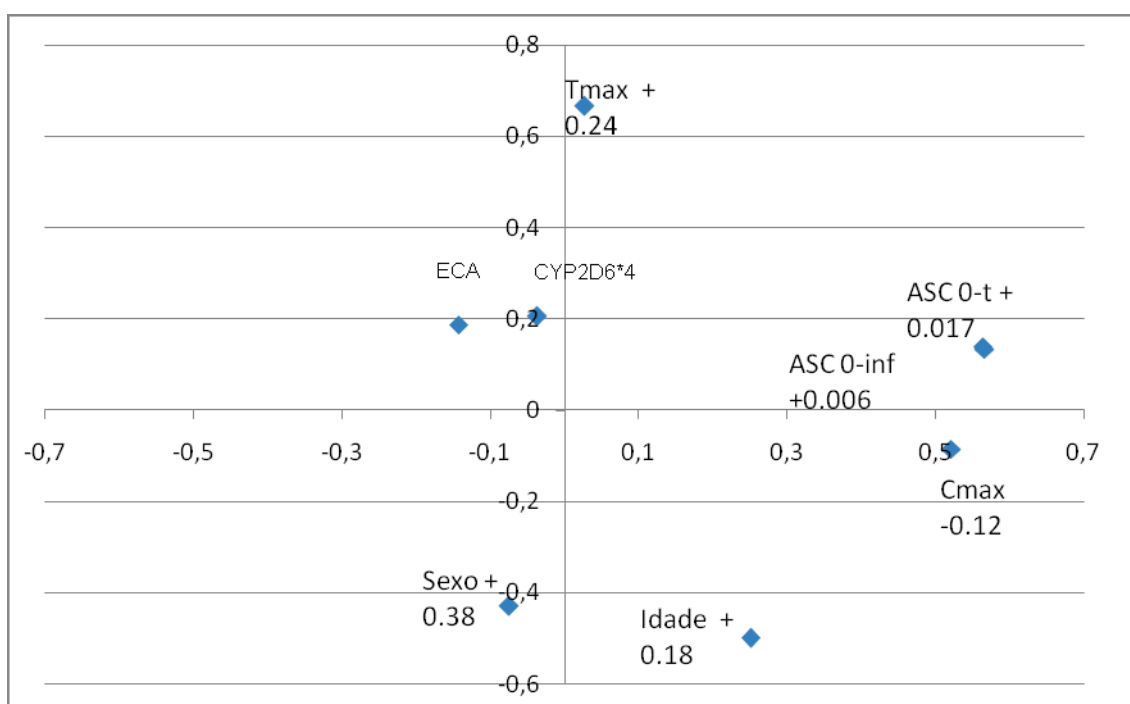


Figura 17 Contribuição das variáveis para o medicamento referência

Analisando o gráfico (**Figura 17**), pode-se fazer algumas considerações importantes:

1- ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$

Essas variáveis estão no mesmo quadrante do gráfico, indicando que são diretamente proporcionais. Ainda, pode-se verificar que as variáveis estão em mesma posição no plano e a distância euclidiana é muito pequena, logo a relação entre elas é muito similar.

2-CYP2D6*4

Essa variável está em quadrante oposto à C_{max} , significando que são inversamente proporcionais e a relação entre elas é muito forte. Sendo que pode-se afirmar:

Quando ocorreu a presença do polimorfismo CYP2D6*4 homozigoto, a concentração de C_{max} foi menor em relação a média, já para a presença do CYP2D6*4 heterozito, a concentração de C_{max} foi mediana, e para os voluntários com ausência do polimorfismo, os valores de C_{max} foram maiores. Tal fato contradiz o esperado que seria obter as maiores C_{max} quando da presença do polimorfismo. Uma possível explicação para o resultado obtido seria a administração de uma única dose de medicamento.

Ainda foi observado:

Se há presença do polimorfismo CYP2D6*4 homozigoto, as ASC são menores em relação a média.

3-ECA

Essa variável está em quadrante oposto à C_{max} , significando que são inversamente proporcionais e a relação entre elas é muito forte.

Para voluntários com polimorfismo do gene da ECA genótipo II, foram verificadas as menores C_{max} , e para voluntários com polimorfismo do gene da ECA genótipo DD foram verificadas as maiores C_{max} .

Ainda foi observado:

Para voluntários com polimorfismo do gene da ECA genótipo II, foram verificadas menores T_{max} e menores ASC em relação a média.

4- Sexo

Essa variável foi inversamente proporcional a T_{max} e ASC. Mulheres tiveram T_{max} e ASC menores quando comparados aos homens.

5- Idade

Relação proporcional fraca em relação a C_{max} . Observou-se que quanto maior a idade, maior o C_{max} .

Para o medicamento teste, segue descrito na **Tabela 27** os autovalores para os três componentes principais.

Tabela 27: Autovetores dos três primeiros componentes principais

Variável	Componente 1	Componente 2	Componente 3
CYP2D6*4	0,0097	-0,2351	0,8161
ECA	0,2068	-0,1202	-0,2414
C_{max}	-0,5182	-0,1404	0,143
T_{max}	-0,0249	0,6374	0,2545
ASC _{0-t}	-0,557	0,0748	-0,0154
ASC _{0-∞}	-0,5575	0,0966	-0,0107
Idade	-0,2487	-0,4236	-0,3658
Sexo	0,0711	-0,5567	0,2373

Da mesma forma que obtido para o medicamento referência, o medicamento teste apresentou autovetores com valores positivos e negativos. Os autovetores positivos significam que esse componente aumenta ou diminui em relação direta com as variáveis originais. Já para os autovetores negativos, a relação é indireta.

Para os autovalores do medicamento teste, os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 28**.

Tabela 28: Autovalores e percentuais de variância explicados pelos componentes principais para o medicamento teste

	Autovalores	% Total da variância	Autovalor acumulado	Acumulada
Componente 1	3,0604	38,26	3,0604	38,26
Componente 2	1,5479	19,35	4,6083	57,60
Componente 3	1,0827	13,53	5,691	71,14
Componente 4	1,0118	12,65	6,7028	83,79
Componente 5	0,6421	8,03	7,345	91,81
Componente 6	0,555	6,94	7,899	98,75
Componente 7	0,0980	1,22	7,9979	99,97
Componente 8	0,0021	0,03	8	100,00

Analisando os autovalores dos componentes principais descritos na **Tabela 28** e **Figura 18**, observa-se que o primeiro componente pode explicar 38,26% da variância total, o segundo componente pode explicar 19,35% da variância total enquanto o terceiro componente pode explicar 13,53% da variância.

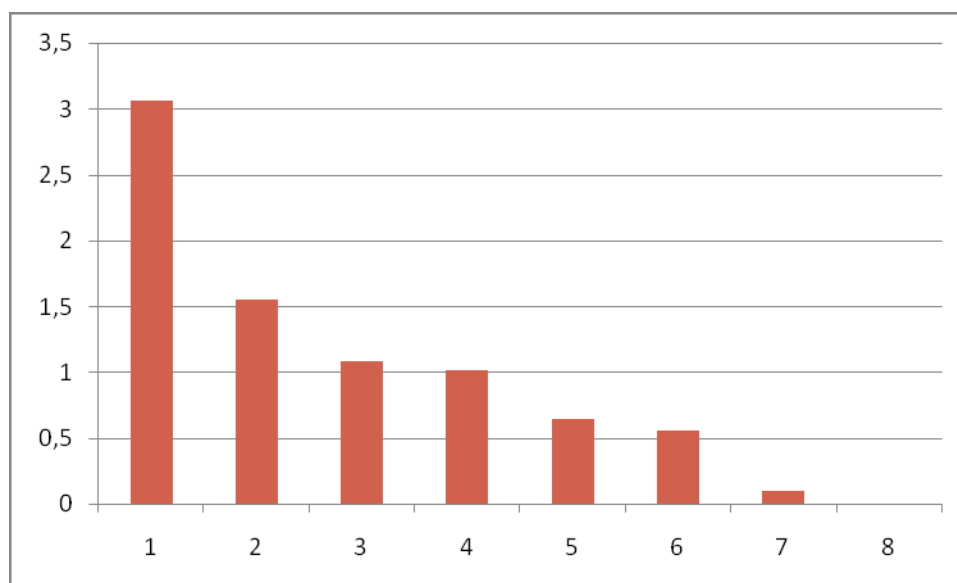


Figura 18 – Contribuição dos autovalores para os componentes principais do medicamento teste.

Semelhantemente ao medicamento referência, para avaliar o conjunto de dados por completo, foram usadas oito variáveis, CYP2D6*4, ECA, Cmax, Tmax, ASC_{0-t}, ASC_{0-∞}, idade e sexo para a construção do gráfico (**Figura 19**) para o medicamento teste. O *software* utilizado foi *Bioestat 4.0*.

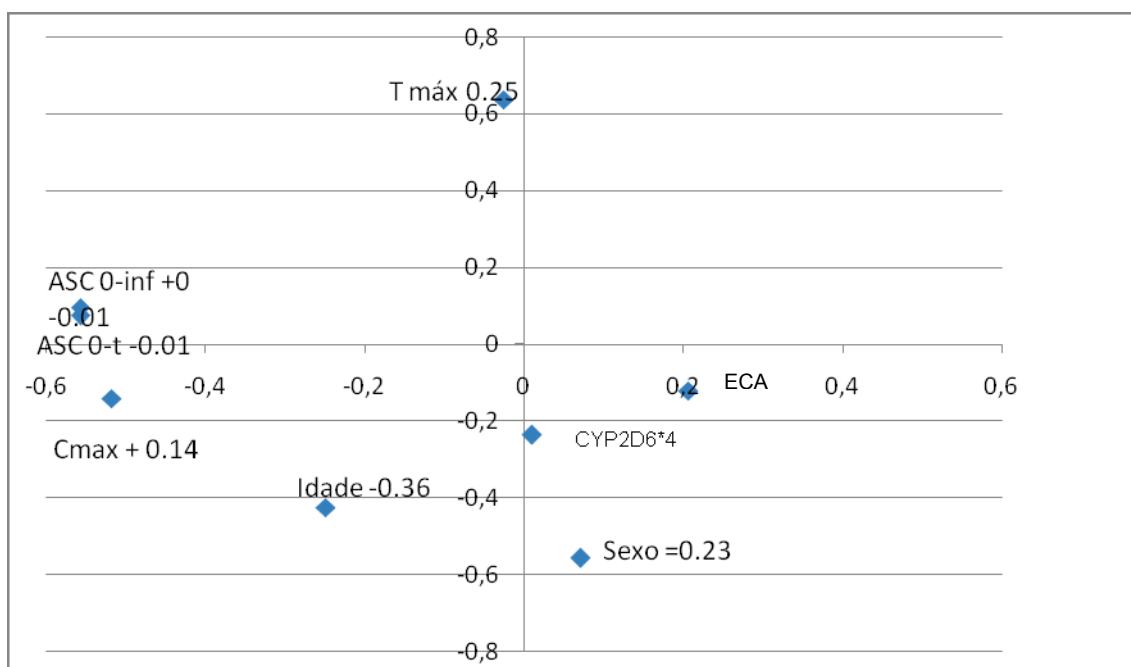


Figura 19 Contribuição das variáveis para o medicamento teste

Analisando o gráfico (**Figura 19**), pode-se fazer algumas considerações importantes:

1- ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$

Essas variáveis estão no mesmo quadrante do gráfico, indicando que são diretamente proporcionais. Ainda, pode-se verificar que as variáveis estão em mesma posição no plano e a distância euclidiana é muito pequena, logo a relação entre elas é muito similar.

2-CYP2D6*4

Essa variável está em quadrante oposto a C_{max} , porém, no mesmo plano, indicando que não há correlação do polimorfismo com os valores de C_{max} .

Ainda foi observado:

Se há presença do polimorfismo CYP2D6*4 homozigoto, as ASC são menores em relação a média.

3-ECA

Essa variável está em quadrante oposto a C_{max} , porém, no mesmo plano, indicando que não há correlação do polimorfismo com os valores de C_{max} .

Ainda foi observado:

Para voluntários com polimorfismo do gene da ECA genótipo II, foram verificadas menores Tmax e menores ASC em relação a média.

4- Sexo

Essa variável foi inversamente proporcional a Tmax e ASC. Mulheres tiveram Tmax e ASC menores quando comparados aos dos homens.

5- Idade

Relação proporcional fraca em relação a Cmax. Observou-se que quanto maior a idade, maior o Cmax.

5.8 Comparação entre medicamento referência e medicamento teste

Pode-se verificar a importância das variáveis para os três primeiros componentes principais tanto no medicamento referência, quanto no medicamento teste, conforme a representação dos autovetores em gráficos (Figura 20, 21 e 22).

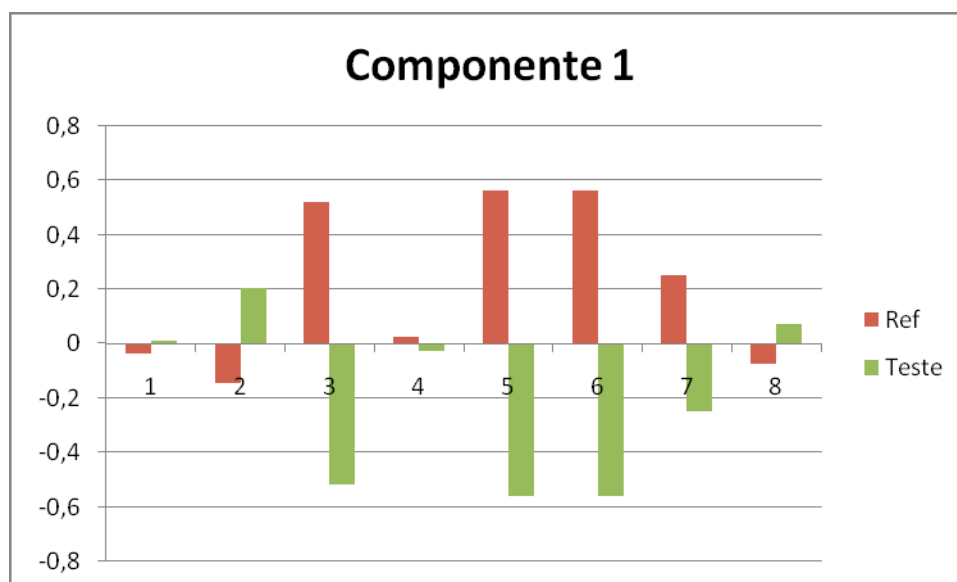


Figura 20: Comparação entre os autovetores das variáveis para o medicamento referência e medicamento teste para o primeiro componente principal.

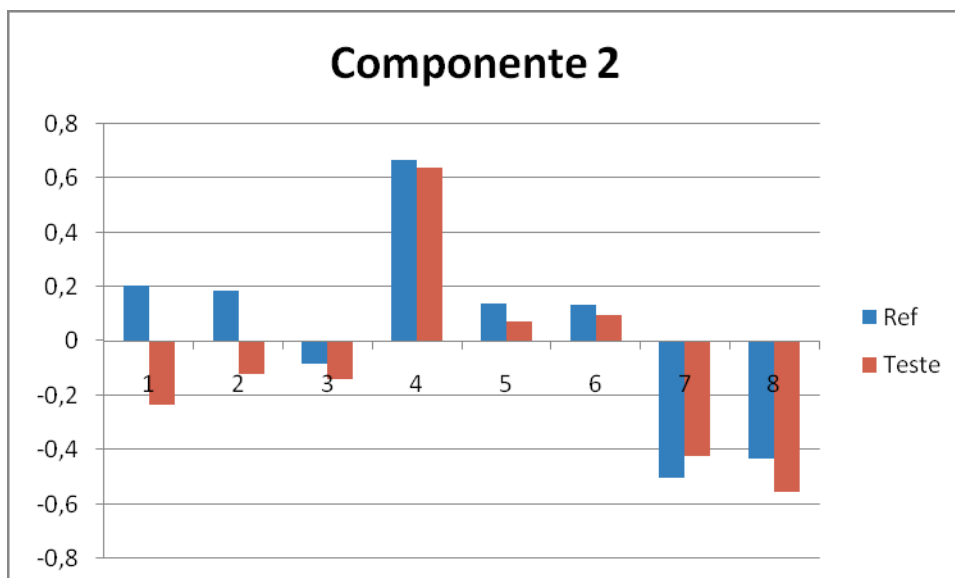


Figura 21: Comparação entre os autovetores das variáveis para o medicamento referência e medicamento teste para o segundo componente principal.

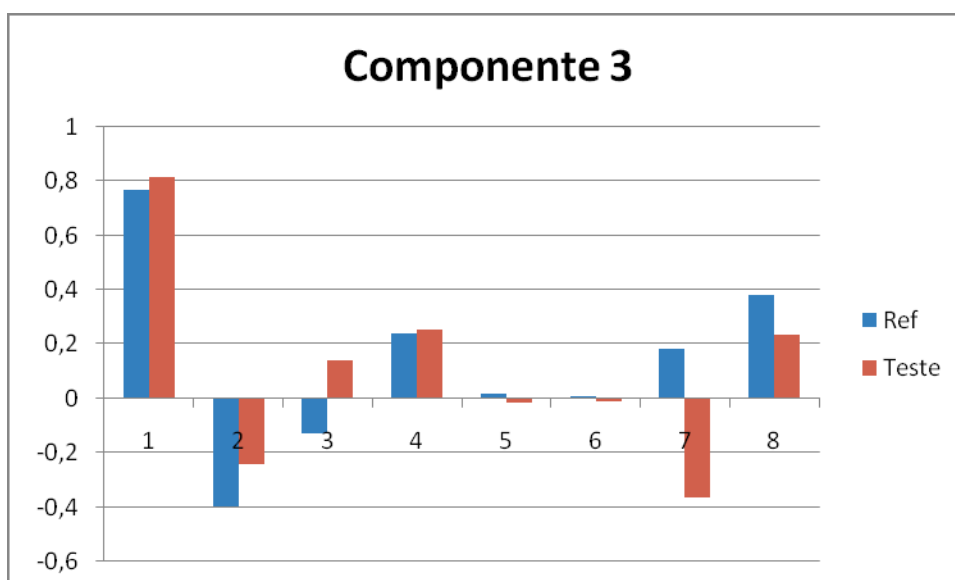


Figura 22: Comparação entre os autovetores das variáveis para o medicamento referência e medicamento teste para o terceiro componente principal.

Através da análise dos gráficos (**Figuras 20, 21 e 22**), pode-se verificar que existe diferença entre o medicamento referência e o medicamento teste quanto às variáveis que são mais importantes, principalmente, para o primeiro componente principal.

6 CONCLUSÕES

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas mostrou-se completamente adequada à bioanálise. O método bioanalítico desenvolvido e validado para a quantificação de atenolol em plasma humano demonstrou reprodutibilidade, sensibilidade, satisfatória recuperação e estabilidade, estando de acordo com os critérios estabelecidos pelo FDA e pela ANVISA.

De acordo com perfil farmacocinético obtido e, segundo os critérios estabelecidos pela ANVISA, pode-se concluir que há bioequivalência entre os medicamentos teste e referência.

A genotipagem dos polimorfos dos genes Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e metabolizador com atividade enzimática reduzida de CYP2D6 (CYP2D6*4) foi realizada em todos os voluntários envolvidos no estudo, sendo obtidos para ECA os respectivos percentuais, 51,6% para ID, 25,8% para DD e 22,6% para II. Já para o CYP2D6*4 foi obtida a prevalência de 12,9%.

Através de estudos estatísticos, pode-se concluir que existe uma diferença entre o medicamento teste e referência, porém essa diferença só pode ser identificada quando realizada a genotipagem dos voluntários. Embora verificada estatisticamente, a diferença entre medicamento teste e referência no estudo em questão, não comprometeu a conclusão pela bioequivalência entre os fármacos. A genotipagem do polimorfismo da ECA indica que há impacto na definição da bioequivalência entre os medicamentos teste e referência quando se separam os grupos por genótipos ID, DD e II. Esse fato não comprometeu o resultado da bioequivalência entre as duas formulações conforme mostra os relatórios estatísticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. R. P. de. Estudos de Farmacocinética Comparada em Voluntários Sadios. 154p. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2003.

AERT, M. M. L., HOGENBOOM, A. C., BRINKMAN, U. A.Th. J. Chromatography B, v.667, 1, 1995.

ANDERSON GD. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and pharmacogenetic target therapy of antiepileptic drugs. The drug monit. 2008.

BEDOR, D.C.G. Desenvolvimento e validação de metodologias bioanalíticas para estudo dosagem de antibióticos em plasma humano. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, 2007.

BIOLO, A.; ROHDE, L. E.; O impacto dos polimorfismos genéticos e da farmacogenética na avaliação e manejo da insuficiência cardíaca. Revista da sociedade de cardiologia do Rio Grande do Sul, 2004.

BOLAÑOS, R. Drogas de alta variabilidade farmacocinética e bioequivalência. Administração Nacional de Medicamentos e Tecnologia Médica (ANMAT), Buenos Aires, Argentina, 2004.

BRASIL. Resolução CNS nº 196, de 10 de outubro de 1996. Homologada, de 10 de outubro de 1996, nos termos do Decreto de Delegação de Competência de 12 de novembro de 1991.

BRASIL. Resolução RDC nº10, de 02 de janeiro de 2001. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Regulamento Técnico para medicamentos genéricos”. Diário Oficial da União, Brasília, 15 jan. 2001a.

BRASIL. On line. Disponível em <http://www.comciencia.br/>. Acesso em out. de 2001b.

BRASIL. Manual de Boas Práticas de Biodisponibilidade/Bioequivalência. Volume I. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2002a.

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

BRASIL. RE n° 896, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos”. Diário Oficial da União, Brasília, 07 novembro 2003a.

BRASIL. Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência. Volume II. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2002b.

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

BRASIL. On line. Dados sobre med genéricos, AIDS e pat de medicamentos. Disponível em: <http://www.medicamentogenerico.org.br/template>. 2003f.

BRASIL. Resolução RE n°897, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência”. Diário Oficial da União, Brasília, 16 novembro 2004a.

BRASIL. Resolução RE n°899, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 junho, 2003b.

BRASIL. Resolução RE nº898, de 29 de maio de 2003. A 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 junho, 2003c.

BRASIL. Resolução nº 397, de 12 de novembro de 2004. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência”. Diário Oficial da União, Brasília, 12 nov. 2004b.

BRASIL. On line. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos, Hotsite de genéricos. Abril 2005a.

BRASIL. On line. Pró Genéricos – História dos Medicamentos Genéricos. Disponível em: www.progenericos.org.br. 2005b.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.686, n.1, p.3-10,1996.

BROOKE, N., et al. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. *Mutat. Res.* 1997; 379: 53-59s, A.J. The essence of SNPs. *Gene.* 1999; 234(2): 177-86.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods. Viewpoint and discussion. *J. Chromatography B.*, v.689, p. 175-180, 1997.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia líquida de alto desempenho – HPLC, 1ª. Ed., Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1998.

COLLINS, C.H; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução à métodos cromatográficos. 6ª. Ed. Editora da UNICAMP, Campinas, 1995.

CONSIGLIERI, V. O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. Ver Bras. Cien. Farm., São Paulo, v.36 n.1, 2000.

CRAIG & STILZEL. Farmacologia Moderna com aplicações clínicas. 6^a ed., Guanabara Koogan, rio de Janeiro, 2005.

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 Guidance for Industry- ANDAs. Pharmaceutical Solid Polymorphism. Chemistry, manufacturing, and controls information. CDER. FDA. 2007.

GARDINER, J. S. & BEGG e. j. Pharmacogenetics, drug-metabolizing de enzimas, and clinical practice. Rev. Pharmacol 58:521-590, 2006.

GLEITER, C.H.; KLOTZ, U.; KUHLMANN, J.; BLUME, H.; STANISLAUS, F.; HARDER, S.; PAULUS, H.; POETHKO-MULLER,C.; HOLZ-SLOMCZYK, M. When are bioavailability studies required?: a German proposal. J. Clin Pharm, New York, v.38, n.10, p.904-911, 1998.

GONÇALVES, T. M. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para estudo farmacocinético comparativo de duas classes de fármacos (anti-retroviral e penicilínico em indivíduos sadios). Tese (Mestrado em Ciências Farmacêucias). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2005.

GOODMAN L. S. & GILMAN A. G. As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GREGHI C. M., Interações Medicamentosas. Hospital Universitário Regional do Norte do PR., Universidade Estadual de Londrina, Hospital São Jose/ Clínica de reabilitação biopsicossocial, 2002. Disponível em: www.psiquiatria.org.br.

GRIFFITHS A. J. F., et al., Introdução a Genética, 8 Ed, Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2006.

HERSBERGER M., MARTIN-Juan J., RENTSCH K., HANSELER E., Rapid Detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4 and CYP2D6*6 Alleles by Tetra-Primer PCR and of the CYP2D*5 Allele by long PCR. *Clinical Chemistry* 2000; 46(8):1072-1077.

HENION, J.; BREWER, E.; RULE, G. Sample preparation for LC-MS/MS: analyzing biological and environmental samples. *Anl Chem*, v. 70, p. 650-656, 1998.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE 2002. Disponível no sítio <http://www.ibge.org.br>.

KANO, E. K. Avaliação biofarmacêutica de formulações contendo cefadroxil: Estudos *in vitro* e *in vivo* (bioequivalência). 233p. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos). Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2002.

KIRKLAND, J. J.; HENDERSON, J. W.; MARTOSELLA, J. D.; BIDLINGMEYER, B.A.; VASTA-RUSSEL, J.; Adams Jr, B. A.; *LC-CG*, 1999, 17, 634.

KLINK, F. New sample preparation approaches to biological matrices for LC-MS. *LC-CG Europe*, v.6, p. 396-409, 2000.

LANÇAS, F. M., Avanços recentes em técnicas cromatográficas de análise. *Revista Analytica*, São Paulo, v1. p.38-47, 2002.

LANGERWERF, F.M.; VANDONGEN, W.D.; STEENVOORDEM, R.J.J.M.; HONING, M.; JONKMAN, J.H.G. Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS/MS. *Trends in analytical chemistry*, v. 19, n. 7, p.418-426, 2000.

LEITE, F. S.; CHIGNALIA, A. Z.; CARMONA, M. J. C.; JUNIOR, J. O. C. A.; SANTOS, S. R. C. J.; Disposição cinética do atenolol em pacientes coronarianos submetidos a revascularização do miocárdio. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n.2, 2006.

LIMA I. V. M., SOUGEY. E. B., VALADA FILHO H. P., Farmacogenética do tratamento da depressão: busca de marcadores moleculares de boa resposta aos antidepressivos. *Ver. Psiquiatr. Clín.*, 31(1): 40-43, 2004.

MASON, W.D.; WINER, N.; KOCHAK, G.; COHEN, I.; BELL,R. Kinetics and absolute bioavailability of atenolol. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v. 25, n.4, p.408-415, 1979.

METZGER, I. F. COSTA D. C. S., SANTOS, J. E. T., Farmacogenética: Princípios, aplicações e perspectivas. Simpósio Farmacogenética. *Medicina, Ribeirão Preto*, 39(4):515-21, 2006.

MINGOTI, S. A. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada. 1ed. Editora UFMG. Belo Horizonte, 2005.

MOITA NETO, J. M. Estatística multivariada: uma visão didática-metodológica. *Crítica*, maio/2004. www.criticanarede.com/cien_estatistica.html. Acesso em março/2010.

MOOSER, V. et al. Cardiovascular pharmacogenetics in the SNP era. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1398-402.

NASCIMENTO, T. G. Desenvolvimento e validação de métodos Bioanalíticos para a quantificação simultânea de fármacos em plasma humano. 254p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, 2004.

NASCIMENTO, D. F. do. Determinação de nimodipino em plasma humano através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS). Tese (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2005.

NICKELL C.D.; JIN, H.; HARTMAN Characterization and purification of phytotoxin produced by fusarium solani, the causal agent of soybean sudden death syndrome. The American Phytopathological Society, Vol 86 n°3, 1996.

NETO & NUNES, Cromatografia – Princípios básicos e técnicas afins. Interciência, Rio de Janeiro, 2003.

OLIVEIRA, C. H. de. Dosagem de concentrações plasmáticas de medicamentos através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (LC-MS-MS) e sua aplicação em estudo de bioequivalência. 136 p. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2002.

POOLSUP, N., et al. Pharmacogenetics and psychopharmacotherapy. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2000:25, 197-220.

QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. A.; LABA, R. F. Introducción a la HPLC aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro, Buenos Aires, 1992.

RIGAT, B.; HUBERT, C.; ALHENC-GELAS, E.; CAMBIEN, F.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. Na insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J. Clin. Invest., v. 86, p. 1343-1346, 1990.

ROSSIT, A., et al. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia.N°10, 2000.

ROUAN M. C.; BUFFET, C.; MARFIL, F.; HUMBERT, H.; MAURES, G. Plasma Desproteinization by precipitation and filtration in the 96-well Format. J. Pharm. Biomed. Anal., 25, p. 995-1000, 2001.

SANDRIN, V.C.; REZENDE, V.B.; SANTOS, J.E.T.; Farmacogenética Cardiovascular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

SCOTT and NOVOTHY, Smoking and cardiovascular disease. The American Journal of Medicine, Vol 93July, 1992.

SECKIN D., ILHAN N., OZBAY Y. The relationship between ACE insertion/deletion polymorphism and coronary artery disease with or without myocardial infarction. Clin. Biochem 39(1):50-4, 2006.

SIUZDAK, G.; HOLLENBECK, T.; BOTHNER, B. Preparative Mass Spectrometry with electrospray ionization, Journal of mass Spectrometry, v.34, p. 1087-1088, 1999.

SKOOG, D. A. *et al.*, Princípios de Análise Instrumental. 5ª. Ed, Bookman, Porto Alegre, 2002.

SOUSA, C. E. M., Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para quantificação de hidroclorotiazida e cimetidina em plasma humano e aplicação em estudos de farmacocinética comparada. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, 2008.

SHAH, V.P., MIDHA, K.K.; FINDLAY, J.W.A .; HILL, H.M.; HULSE, J.D.; MCGILVERAY, I.J.; MCKAY, G.; MILLER, K.J.; PATNAIK, R.N. POWELL, M.L.; TONELLI, A .; VISWANATHAN, C.T.; YACOBI, A .; Bioanalytical methos validation – A revist with a decade of progress. Pharmaceutical research, v. 17, p. 1551-1557, 2000.

SHARGEL, L. & YU, A. B. C. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 4a. Ed., satamford: Appleton & Lange, p.786, 1999.

SNIDER DA, ADDICKS W, OWENS W. Polymorphism in generic drug product development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004.

STAESSEN JA, WANG JG, GIONOCCHIO et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 15:1579-92.1997.

STAESSEN JA, WANG JG, BRAND E et al. Effects of three candidate genes on prevalence and incidence of hypertension in a caucasian population. *J Hypertens* 19:1349-58. 2001.

STEPHENS, J. C., SCHNEIDER J. A., TANGUAY D. A. CHOI J., ACHARYA T., STANLEY, S. E., *et al.*, Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313

THADANI, U. Role of nitrates in angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* 1992.

TOGNONI,G.; LAPORTE, J.R. Estudos de utilização de medicamentos e de farmacovigilância. In: (J.R. Laporte; G. Tognoni; S. Rozenfeld, (Org.) *Epidemiologia do medicamento: princípios gerais.* São Paulo: Hucitec/Abrasco, P.43-56, 1997.

TURNER ST, BOERWINKLE E. Genetics of hypertension, target-organ complications, and response to therapy. *Circulation* 102:IV 40-45, 2000.

XIE, H. G., KIM, R. B., WOOD, A. J., STEIN, C. M., Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41: 815-850, 2001.

WADWORTH, A.N.; MURDOCH, D.; BROGDEN, R.N. Atenolol: A reappraisal of its pharmacological proprieties and therapeutic use in cardiovascular disorders. *Drugs*, v. 42, n. 3, p. 468-510, 1991.

ANEXO A – Relatório Estatístico

ANEXO B – Relatório Estatístico para o grupo ID

ANEXO C – Relatório estatístico para o grupo DD

ANEXO D – Relatório estatístico para o grupo II

ANEXO E – Relatório estatístico para o grupo com ausência de CYP2D6*4