

Daniela Monteiro Braga

***Planejamento e análise de estudos de bioequivalência:
comparação de delineamentos do tipo cross-over***

Belo Horizonte – MG

Setembro/2008

Daniela Monteiro Braga

***Planejamento e análise de estudos de bioequivalência:
comparação de delineamentos do tipo cross-over***

Dissertação apresentada ao Departamento de Estatística do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito à obtenção do título de Mestre em Estatística.

Orientadora: Prof^a. Arminda Lucia Siqueira

MESTRADO EM ESTATÍSTICA
DEPARTAMENTO DE ESTATÍSTICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte – MG

Setembro/2008

Resumo

Para que a comercialização de um medicamento genérico seja liberada, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige a realização de testes de bioequivalência. Devem ser realizados seguindo uma metodologia específica e protocolo aprovado por um comitê de ética. Na maioria absoluta das vezes, os participantes são voluntários sadios que são confinados em uma ala hospitalar por um determinado período. A partir de amostras coletadas em líquido biológico, por exemplo, plasma, segundo um cronograma pré-estabelecido, é possível calcular medidas farmacocinéticas, tais como área sob a curva de concentração versus tempo (ASC) e pico de concentração máxima (C_{max}). Há três tipos de estudos de bioequivalência: média (o mais comum e exigido pela ANVISA), individual e populacional. Para que a bioequivalência média seja declarada, os intervalos com 90% de confiança para a diferença ou razão das médias de ASC e C_{max} devem estar dentro dos limites de bioequivalência. Os delineamentos *cross-over* são os mais utilizados, em especial o 2x2. Entretanto, para formulações com alta variabilidade (coeficiente de variação intra-individual superior a 30%), requer um número grande de voluntários sendo recomendada a utilização de delineamentos *cross-over* de ordem maior que 2x2. Os delineamentos do tipo *cross-over* comumente escolhidos são 2x2, 2x3, 2x4, 4x4 e 4x2 para comparação de duas formulações e 6x3 e 4x4 para comparação de três e quatro formulações, respectivamente. Neste trabalho é fornecida uma base fundamentada para escolha dentre estes delineamentos na avaliação de bioequivalência média. O poder do teste de bioequivalência, o número de voluntários e o número de medidas foram calculados e comparados para todos os delineamentos mencionados. Além disso, através de simulações de Monte Carlo foi obtido o percentual de conclusão de bioequivalência de cada delineamento em situações práticas. Ao simular a medida farmacocinética diretamente foi possível avaliar o efeito da utilização de um coeficiente de variação diferente do verdadeiro no cálculo do número de voluntários, da presença de observações atípicas e da possibilidade de desistências no percentual de conclusão de bioequivalência. Em todas as situações os delineamentos *cross-over* 4x4 e 2x4 apresentaram desempenho superior aos demais, seguidos do 2x3 e 2x2, sendo o 4x2 o delineamento com pior desempenho. A geração da curva de concentração individual possibilitou verificar que os percentuais de conclusões de bioequivalência para C_{max} em geral não são superiores aos percentuais para ASC . Isto pode ser consequência do fato de que C_{max} não é uma medida pura da velocidade de absorção, sofre influência da extensão de absorção da droga, além de ser dependente do cronograma de coleta. Os delineamentos *cross-over* 2x4 e 4x4 apresentaram os maiores percentuais de conclusão de bioequivalência nas diversas situações investigadas enquanto o 4x2 tem os piores resultados em todas as análises, enquanto que o 2x2 e o 2x3 apresentaram resultados intermediários. Nem sempre é necessário utilizar delineamentos complexos para realizar um estudo com qualidade, o importante é considerar as características de cada delineamento e das formulações envolvidas de forma a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

Agradecimentos

Aos meus pais, Heloisa e João, pelo apoio incondicional
em todos os momentos da minha vida.

Às minhas irmãs, Raquel, Isabela e Patrícia,
pelo companheirismo de sempre.

À Isabela, novamente, pelo auxílio
na elaboração das referências.

Ao Bruno pela compreensão, apoio, carinho e
principalmente pela paciência.

Aos familiares pela força e admiração.

Aos novos e velhos amigos, especialmente o *clã*,
por tornarem meus dias mais alegres.

À Paula Chellini pela ajuda, força e incentivo.

À minha orientadora Prof^a Arminda Lucia Siqueira
por acreditar no meu trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram
para realização deste projeto.

A Deus.

Sumário

1	Introdução.....	1
1.1	Conceitos fundamentais.....	3
1.1.1	Etapas de um estudo de bioequivalência.....	3
1.1.2	Medidas farmacocinéticas.....	4
1.2	Objetivo.....	6
1.2.1	Objetivo geral.....	6
1.2.2	Objetivos específicos.....	6
1.3	Tópicos do trabalho.....	6
2	Referencial teórico.....	8
2.1	Tipos de delineamentos.....	8
2.1.1	Paralelo.....	8
2.1.2	<i>Cross-over</i>	9
2.2	Modelo e inferência estatística para delineamentos <i>cross-over</i>	12
2.2.1	Modelo tradicional.....	12
2.2.2	Modelo de efeitos mistos.....	24
2.3	Escala original versus escala logarítmica.....	25
2.4	Tipos de estudos de bioequivalência.....	26
2.4.1	Bioequivalência Média.....	29
2.4.2	Bioequivalência Populacional.....	30
2.4.3	Bioequivalência Individual.....	32
2.5	Determinação do poder e número de voluntários.....	33
2.5.1	Bioequivalência Média.....	34
2.5.2	Bioequivalência Populacional e Individual.....	41
2.6	Identificação e tratamento de não conformidades.....	41
2.6.1	Dados faltantes.....	41
2.6.2	Observações atípicas (<i>Outliers</i>).....	42
2.7	Exemplos.....	45
2.8	Casos reais.....	47
2.9	Pacotes Estatísticos.....	51
3	Comparação dos Delineamentos.....	52
3.1	Número de voluntários.....	53
3.2	Poder do teste.....	57

3.3	Custo-Eficiência.....	61
3.4	Resumo do capítulo	64
4	Estudos de simulação	66
4.1	Simulação da medida farmacocinética.....	66
4.1.1	Conclusão de bioequivalência.....	67
4.1.2	Presença de observações atípicas	73
4.1.3	Incerteza na estimativa da variabilidade	76
4.1.4	Desistências.....	81
4.2	Simulação da curva de concentração individual	85
4.3	Resumo do capítulo	87
5	Conclusões.....	89
	Referências.....	92
	Anexo A - Número total de voluntários (N) obtido por meio de várias aproximações para os delineamentos <i>cross-over</i> 2x2, 4x2, 2x3 e 4x4	95
	Anexo B - Resultados das Simulações para Curva de Concentração.....	100

Lista de Figuras

Figura 1.1: Curva de concentração plasmática de um fármaco.....	5
Figura 2.1: Ilustração de três situações: (a) equivalência em média e variância; (b) equivalência em média, mas não em variância; (c) equivalência em variância, mas não em média.	27
Figura 2.2 Curva de concentrações médias ao longo do tempo (± 2 erros-padrão em torno das concentrações médias) para as três formulações líquidas comparadas à formulação em cápsula.....	49
Figura 2.3 Curva de concentrações médias ao longo do tempo (± 2 erros-padrão em torno das concentrações médias) do lansoprasole para as três formulações estudadas.....	50
Figura 3.1: Número total de voluntários (N) para vários delineamentos em função do CV (nível de significância = 5% e poder = 80%)	55
Figura 3.2: Poder do teste para vários delineamentos na ausência de efeito <i>carry-over</i> em função do CV ($N = 24$ e nível de significância = 5%): (a) $\theta\gamma = 0,00$, (b) $\theta\gamma = 0,05$	59
Figura 3.3: Poder do teste para vários delineamentos na presença de efeito <i>carry-over</i> em função do CV ($N = 24$ e nível de significância = 5%): (a) $\theta\gamma = 0,00$, (b) $\theta\gamma = 0,05$	60
Figura 3.4: Número total de medidas para vários delineamentos em função do CV (10 medidas por voluntário em cada período, nível de significância = 5%, poder = 8% e $\theta\gamma = 0,05$).....	61
Figura 4.1: Percentuais de bioequivalência em função do número total de voluntários (N).....	69
Figura 4.2: Percentuais de bioequivalência para vários delineamentos em função do número de medidas	70
Figura 4.3: Percentuais de bioequivalência para vários delineamentos em função da variabilidade intra-individual ($N = 24$, nível de significância = 5%, $\theta\gamma = 0,00$).....	72
Figura 4.4: Percentual de diminuição no percentual de bioequivalência com o aumento do número de <i>outliers</i> para os delineamentos 2x2, 2x3, 2x4 e 4x4: (a) $N=12$ e (b) $N=24$	75
Figura 4.5: Razão entre o número de voluntários calculado e o número de voluntários necessários em função do CV utilizado no cálculo: (a) CV real = 0,12; (b) CV real = 0,50.....	78
Figura 4.6: Percentuais de bioequivalência quando o valor de CV é mal especificado para os delineamentos <i>cross-over</i> 2x2, 2x3 e 2x4: (a) CV real = 0,12; (b) CV real = 0,20; (c) CV real = 0,50	80
Figura 4.7: Esquema usado na simulação das desistências para o <i>cross-over</i> 2x3	81
Figura 4.8: Percentuais de conclusão de bioequivalência para C_{max} e ASC_t para 6 casos selecionados	87

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Valores esperados das médias das seqüências por período para delineamentos com duas formulações	14
Tabela 2.2: Diferença das médias das duas formulações: Estimadores e Variâncias.....	17
Tabela 2.3: Valores esperados das médias das seqüências por período para delineamentos com mais de duas formulações.....	20
Tabela 2.4: Tabela de Análise de Variância para o delineamento <i>cross-over</i> 6x3.....	21
Tabela 2.5: Coeficientes (multiplicados por 24) para estimadores das formulações F_R , F_1 e F_2 no modelo de Williams com três formulações (com efeito <i>carry-over</i>)	22
Tabela 2.6: Coeficientes (multiplicados por 24) para o delineamento de Williams com três formulações ^c	22
Tabela 2.7: Coeficientes (multiplicados por 6) para o delineamento de Williams com três formulações	23
Tabela 2.8: Coeficientes (multiplicados por 40) para o delineamento de Williams com quatro formulações ^c	23
Tabela 2.9: Coeficientes (multiplicados por 10) para o delineamento de Williams com quatro formulações	24
Tabela 2.10: Intervalos de bioequivalência baseados na média aritmética ou média geométrica para a medida farmacocinética na escala original ou na escala logarítmica	29
Tabela 2.11: Resultados da avaliação dos três tipos de bioequivalência	46
Tabela 2.12: Número de voluntários necessários em bioequivalência individual e média para várias situações	47
Tabela 3.1: Número total de voluntários (N) obtido por meio de várias aproximações para o <i>cross-over</i> 2x4 em função da diferença das médias populacionais (θ_γ) e do coeficiente de variação (CV) (nível de significância = 5% e poder = 80%)	54
Tabela 3.2: Número total de voluntários (N) para vários delineamentos em função da diferença das médias populacionais (θ_γ) e do coeficiente de variação (CV) (nível de significância = 5% e poder = 80%)	56
Tabela 3.3: Poder do teste para vários delineamentos <i>cross-over</i> em função da diferença das médias populacionais (θ_γ) e do coeficiente de variação (CV) ($N = 24$ e nível de significância = 5%).....	58
Tabela 3.4: Número total de medidas para vários delineamentos em função da diferença das médias populacionais (θ_γ) e do coeficiente de variação (CV) (10 medidas por voluntário em cada período, nível de significância = 5% e poder = 80%)	62

Tabela 3.5: Resumo dos resultados dos cálculos de número total de voluntários (N), poder do teste e número total de medidas em função do coeficiente de variação (CV) e diferença entre as médias populacionais ($\theta\gamma$)	65
Tabela 4.1: Percentuais de conclusão de bioequivalência para vários delineamentos em função do número total de voluntários (N)	68
Tabela 4.2: Percentuais de conclusão de bioequivalência para vários delineamentos em função do número de medidas	70
Tabela 4.3: Percentuais de conclusão de bioequivalência para vários valores de σ_e^* e vários delineamentos em função do número total de voluntários (N).....	71
Tabela 4.4: Percentuais de conclusão de bioequivalência na presença de <i>outliers</i> utilizando o critério do <i>box-plot</i> para vários delineamentos em função do número total de voluntários (N).....	74
Tabela 4.5: Diferença entre o número total de voluntários (N) calculado quando o valor de CV é mal especificado e o valor correto para vários delineamentos (poder = 80%).....	77
Tabela 4.6: Percentuais de bioequivalência quando o valor de CV é mal especificado (poder = 80%)	79
Tabela 4.7: Percentual de bioequivalência e número total de voluntários segundo a probabilidade de desistência para o <i>cross-over</i> 2x2 (nível de significância = 5%, poder = 80%, $\theta_\gamma = 0,00$ e $\sigma_e^* = 0,19$)	82
Tabela 4.8: Percentual de bioequivalência e número total de voluntários segundo a probabilidade de desistência para o <i>cross-over</i> 2x3 (nível de significância = 5%, poder = 80%, $\theta_\gamma = 0,00$ e $\sigma_e^* = 0,19$)	83
Tabela 4.9: Percentual de bioequivalência e número total de voluntários segundo a probabilidade de desistência para o <i>cross-over</i> 2x4 (nível de significância = 5%, poder = 80%, $\theta_\gamma = 0,00$ e $\sigma_e^* = 0,19$)	84
Tabela 4.10: Parâmetros considerados na simulação para a constante de eliminação (Ke) e constante de absorção (Ka)	86

Lista de Quadros

Quadro 2.1: Graus de liberdade de acordo com a fonte de variação	13
Quadro 2.2: Graus de liberdade* de acordo com a fonte de variação.....	19
Quadro 2.3: Esquema das diferenças das respostas para dois indivíduos para as formulações teste (T) e referência (R).	28
Quadro 2.4: Graus de liberdade (v_d) e fator indicador de variabilidade (f_d) para vários delineamentos <i>cross-over</i>	35
Quadro 2.5: Comparação dos testes para detecção de observações atípicas apresentados em <i>Ramsay; Elkum</i> (2005).....	44
Quadro 2.6: Informações sobre casos reais de estudos de bioequivalência média com delineamento <i>cross-over</i> de ordem maior que 2x2	48
Quadro 4.1: Resumo dos resultados obtidos através das simulações para os delineamentos <i>cross-over</i> 2x2, 2x3, 2x4 e 4x4.	88

Lista de Abreviaturas/Notação

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC - Área sob a curva de concentração plasmática

C_{max} - Pico máximo de concentração plasmática

CV - Coeficiente de variação

CV* - Coeficiente de variação na escala logarítmica

D - Dose

e_{ijk} - Erro aleatório

ED - Diferença das estimativas

$F_{(j,k)}$ - Efeito fixo da formulação administrada na k -ésima seqüência e no j -ésimo período

FDA - *Food and Drug Administration*

h - Hora

K_a - Constante de absorção

K_e - Constante de eliminação

LD - Distância da verossimilhança

N - Número total de voluntários

n - Número de voluntários por seqüência

P_j - Efeito fixo do j -ésimo período

QM - Quadrado médio

R - Formulação Referência

$C_{(j-1,k)}$ - Efeito residual fixo da formulação na k -ésima seqüência e $(j - 1)$ -ésimo período

S_{ik} - Efeito do i -ésimo indivíduo na k -ésima seqüência

SQ - Soma dos quadrados

T - Formulação Teste

T_{max} - Tempo para atingir C_{max}

θ_l - Limite inferior de bioequivalência

θ_s - Limite superior de bioequivalência

θ - Diferença das médias dos medicamentos teste e referência

Vd - Volume de distribuição aparente

σ_e^2 - Variância intra-individual

σ_s^2 - Variância inter-individual

Y_{ijkl} - Variável resposta

1 Introdução

Para que um medicamento genérico possa ser comercializado, ele deve passar por testes de biodisponibilidade/bioequivalência. Biodisponibilidade é um termo farmacocinético que descreve a velocidade e o grau com que uma substância é absorvida a partir da ingestão de um fármaco e se torna disponível no local de ação. Um estudo de bioequivalência tem por objetivo comparar as biodisponibilidades de duas ou mais formulações de um mesmo fármaco consideradas equivalentes farmacêuticas e que tenham sido administradas na mesma dose molar de maneira que as formulações possam ser consideradas intercambiáveis. Em farmacologia a intercambialidade indica a possibilidade de substituição de um medicamento por outro equivalente terapêutico receitado pelo prescritor (Rumel et al, 2006).

Estudos de bioequivalência são geralmente realizados em voluntários sadios que são recrutados segundo critérios que garantam homogeneidade e são confinados sob condições padronizadas de alimentação, acomodações, etc. Durante o confinamento são coletadas amostras em algum líquido biológico segundo um cronograma pré-estabelecido por profissionais treinados para garantir as mesmas condições de coleta em todos os tempos e para todos os voluntários. A análise é feita considerando algumas medidas farmacocinéticas tais como, a área sob a curva da concentração da substância no plasma versus tempo (ASC) e a concentração máxima (C_{max}) atingida pela substância. Há três tipos de estudos de bioequivalência: média (a mais comum), individual e populacional que serão abordados durante o texto.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda e exige apenas assegurar bioequivalência utilizando o método de bioequivalência média. Este método considera apenas as médias das medidas farmacocinéticas estudadas para os medicamentos testados. Assim, segundo *Chow and Liu* (2000), não é possível assegurar a intercambialidade entre os medicamentos teste em termos de eficácia e segurança, ou seja, se dois medicamentos teste foram comparados com o mesmo medicamento referência através do método de bioequivalência média não podemos afirmar que estes dois medicamentos sejam intercambiáveis apesar de serem bioequivalentes ao referência.

Entre os delineamentos mais comuns em estudos clínicos temos o delineamento paralelo em que cada indivíduo recebe ao acaso somente uma das formulações e o *cross-over* em que cada indivíduo recebe mais de uma formulação de um mesmo medicamento em ocasiões (denominadas períodos) diferentes,

o que define uma determinada seqüência de formulações. Entre os períodos existe um período de eliminação, em inglês *washout*. Os delineamentos *cross-over* são os mais recomendados em estudos de bioequivalência, devido à grande variabilidade metabólica dos voluntários estudados. Eles possuem vantagens em termos de precisão estatística e custo quando comparados ao delineamento paralelo, pois cada indivíduo serve como o seu próprio controle.

Uma outra medida farmacocinética importante é a meia-vida do fármaco, que é o tempo necessário para que sua concentração plasmática seja reduzida pela metade. Quando o fármaco apresenta meia-vida muito longa, ou seja, a substância permanece no organismo por muito tempo e/ou é eliminada muito lentamente, o delineamento paralelo passa a ser o mais apropriado. Isso se deve ao fato do período de eliminação estar associado à meia-vida. De acordo com a ANVISA o *washout* deve ser no mínimo, sete meias-vidas de eliminação do fármaco. Por exemplo, se a meia-vida de um fármaco for igual a 10 dias, o período de *washout* deve ser de pelo menos 70 dias, o que pode ser inviável na prática.

O delineamento *cross-over* 2x2 é composto por duas seqüências e dois períodos e é o mais utilizado. Os voluntários são alocados aleatoriamente para receber o medicamento referência (R) ou teste (T) em cada período. Sua grande limitação é a impossibilidade de fornecer estimativas para a interação entre indivíduo e formulação. *Chellini* (2006) faz um estudo detalhado sobre este delineamento abordando várias situações através de estudos de simulação de Monte Carlo visando verificar o impacto no percentual de conclusão de bioequivalência com a utilização de um número de voluntários menor que o necessário e a ocorrência de observações atípicas, além de questões relacionadas ao cronograma de coleta das amostras.

Os delineamentos *cross-over* de ordem maior que 2x2 (frequentemente designados *cross-over* de ordem maior ou ainda *cross-over* replicado) permitem estimar as variabilidades inter e intra-individuais, assim como a interação entre indivíduo e formulação. Os delineamentos *cross-over* 2x3, 2x4, 4x4 e 4x2 são os mais utilizados.

Tais delineamentos são também recomendados para estudos de bioequivalência de formulações com dosagem de liberação modificada (cujas características de liberação do fármaco, no tempo e/ou local, são escolhidas, com objetivos terapêuticos não oferecidos pelas formas de dosagens convencionais, como soluções, cremes ou formas de dosagens prontamente dissolvidas), produtos de alta variabilidade (coeficiente de variação intra-individual superior a 30%), para avaliação de bioequivalência individual e para comparação de mais de duas formulações. *Willavize; Morgenthien* (2006) afirmam que utilizando um delineamento *cross-over* replicado obtemos um teste mais poderoso para avaliação de bioequivalência média.

Alguns estudos vêm sendo realizados a respeito dos vários delineamentos *cross-over* de ordem maior, suas aplicações e características. *Botter; Singer* (1991) apresentam os cálculos pra análise de variância pra um delineamento *cross-over* 6x3. Uma questão extremamente relevante na prática é sobre o número de voluntários a serem recrutados. Segundo *Julious* (2004), na comparação de dois medicamentos utilizando os delineamentos *cross-over* 2x3 e 2x4, há redução no tamanho da amostra em relação ao *cross-over* 2x2 de 25% e 50%, respectivamente.

Além do número de voluntários, é importante comparar os diversos delineamentos em termos de situações comuns na prática, como a perda de dados do estudo ou a presença de observações atípicas, sobretudo em coletas próximas ao ponto em que a formulação atinge sua concentração máxima (C_{max}).

Segundo a Resolução N° 1170 (ANVISA, 2006), no caso de voluntários que apresentem comportamento discrepante quanto às medidas farmacocinéticas, em relação aos demais voluntários, sua exclusão do estudo deverá ser justificada e deverão ser apresentados os resultados do estudo com e sem a inclusão de seus dados. Além disso, deve-se justificar qualquer perda de amostra e não é permitida a exclusão de mais de 5% dos voluntários que participaram do estudo até a sua conclusão ou a falta de mais de 10% dos valores das concentrações sanguíneas do fármaco provenientes da administração de cada medicamento por voluntário.

1.1 Conceitos fundamentais

1.1.1 Etapas de um estudo de bioequivalência

Os estudos de biodisponibilidade/bioequivalência são compostos pelas seguintes etapas:

- **Etapa Clínica:** triagem de voluntários saudáveis que fazem exames clínicos que comprovem sua aptidão para participação no estudo. Em seguida os voluntários são internados, recebendo sempre acompanhamento e tratamento padronizado e é feita a coleta das amostras em tempos pré-determinados.
- **Etapa Analítica:** análise das amostras coletadas na etapa clínica e quantificação do fármaco utilizando metodologia específica.
- **Etapa Estatística:** determinação do delineamento e número de voluntários que participarão do estudo de acordo com os métodos estatísticos apropriados, o poder exigido pela agência reguladora e a variabilidade do fármaco, além da análise dos dados obtidos na etapa analítica com o cálculo das medidas farmacocinéticas e avaliação de bioequivalência através de intervalos de confiança e testes de hipóteses.

1.1.2 Medidas farmacocinéticas

Para quantificar a biodisponibilidade de um medicamento em estudos de bioequivalência algumas medidas farmacocinéticas são utilizadas. A estimação destas medidas pode ser obtida a partir da concentração observada do fármaco em algum líquido biológico, geralmente sangue ou plasma e em alguns casos urina ou outros que são coletados na etapa clínica. A seguir descrevemos cada uma dessas medidas.

- C_{max} : é a maior concentração observada do fármaco e/ou metabólito nas amostras observadas;
- T_{max} : é o instante em que C_{max} é atingida;
- ASC_{0-t} : área sob a curva de concentração plasmática do medicamento desde o instante inicial até o último tempo quantificável;
- $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva de concentração plasmática do medicamento desde o instante inicial até o tempo relativo à completa eliminação do fármaco. É calculada como $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + C_t/K_e$, sendo C_t a última concentração medida e K_e é a constante de eliminação. A estimativa de K_e é obtida pelo coeficiente de inclinação da reta de regressão ajustada utilizando-se as últimas concentrações transformadas na escala logarítmica e multiplicada por $-2,303$;
- $t_{1/2}$: meia vida de eliminação do fármaco calculada como $\ln 2/K_e$, sendo K_e definido acima.

De acordo com a Resolução N° 1170 (ANVISA, 2006), em um estudo de bioequivalência devem ser determinados: a área sob a curva de concentração sangüínea versus tempo, calculada do tempo zero ao tempo t relativo à última concentração do fármaco determinada experimentalmente (ASC_{0-t}); a área sob a curva de concentração sangüínea versus tempo, calculada do tempo zero ao tempo infinito ($ASC_{0-\infty}$) e o pico de concentração máxima (C_{max}) do fármaco e/ou metabólito e o tempo para atingir este pico (T_{max}) que devem ser obtidos diretamente, sem interpolação dos dados. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) do fármaco e/ou metabólito também deve ser determinada, embora não haja necessidade de tratamento estatístico. A Figura 1.1 ilustra essas principais medidas farmacocinéticas.

A ANVISA determina que a coleta das amostras contemple um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou do metabólito, para garantir a adequada caracterização do perfil plasmático dos mesmos (concentração versus tempo). No caso de fármacos que apresentam meia-vida de eliminação longa (superior a 24 horas), poderá ser utilizado um cronograma de coletas alternativo, no mínimo de 72 horas, que possibilite a determinação da área sob a curva truncada (ASC_{0-72}), ou um delineamento paralelo.

Se a droga tem uma meia-vida longa ou se o intervalo entre os períodos é muito curto, o efeito da formulação, aquele observado durante o período no qual ela é administrada, pode persistir mesmo após

o período de coleta. Neste caso, é necessário distinguir a diferença entre o efeito direto da formulação e o efeito residual (*carry-over*).

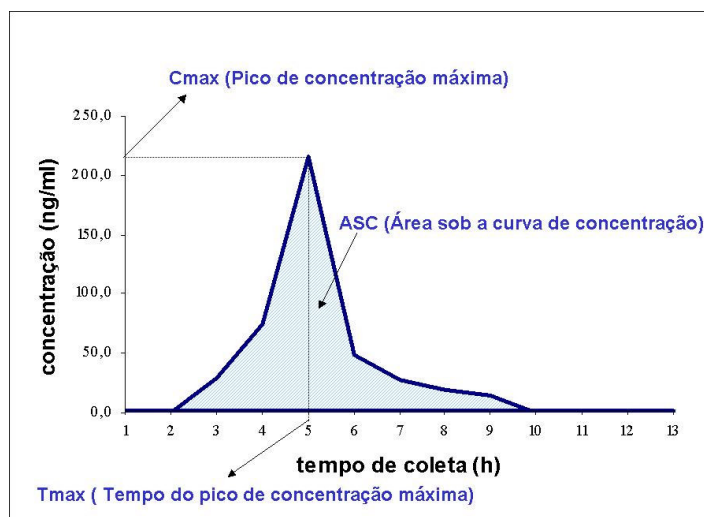


Figura 1.1: Curva de concentração plasmática de um fármaco

O efeito residual, em inglês *carry-over*, é o efeito do fármaco que eventualmente persiste depois do fim do período de dosagem. Jones; Kenward (2003) apresentaram algumas razões que podem contribuir para a presença de efeitos *carry-over*:

1. o verdadeiro efeito *carry-over* pode aparecer quando o período de *washout* entre dois períodos de tratamento não foi suficiente para os voluntários eliminarem os efeitos das formulações administradas no período anterior;
2. a interação entre formulação e período pode surgir quando o efeito da formulação depende do período em que foi administrada;
3. os grupos de voluntários das seqüências podem apresentar características, por exemplo idade ou sexo, as quais os tornam significativamente diferentes. Isto pode ocorrer quando o processo de aleatorização para a alocação dos voluntários nas seqüências não foi feito adequadamente.

A inexistência do efeito residual não implica necessariamente que tais efeitos sejam nulos, mas que se existirem, tem a mesma intensidade em ambas as seqüências de formulações.

A medida farmacocinética *ASC* depende da dose administrada, da fração absorvida (f) e da depuração do fármaco, que é a velocidade de eliminação a partir do volume de distribuição. Existe uma relação multiplicativa entre a quantidade do fármaco efetivamente absorvida e disponível para ser distribuída no organismo ($f \cdot dose$) e a depuração do fármaco, que é dada por

$$ASC = \frac{f * dose}{depuração}, \quad (1.1)$$

Com relação à análise estatística, a ANVISA recomenda o uso desta medida na escala logarítmica, resultando na seguinte relação aditiva

$$ASC = -\ln(depuração) + \ln(f) + \ln(dose). \quad (1.2)$$

Esta transformação é importante para simplificar o cálculo do poder e, além disso, em geral a distribuição dos dados transformados se aproxima mais a uma distribuição Normal em relação aos dados originais.

1.2 Objetivo

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é fornecer uma base fundamentada para escolha de delineamentos apropriados na avaliação de bioequivalência média, considerando a comparação de duas ou mais formulações.

1.2.2 Objetivos específicos

- Revisão do tema proposto: delineamentos e métodos estatísticos.
- Análise dos principais aspectos dos métodos estatísticos utilizados para avaliação de bioequivalência com enfoque em questões práticas.
- Aprofundamento no conhecimento do que diz respeito ao cálculo do número de voluntários e às consequências de um cálculo inapropriado.
- Avaliação do impacto de fatores que podem alterar a conclusão de bioequivalência, como uso do coeficiente de variação incorreto e a presença de observações atípicas.
- Estudo do impacto do aumento de desistências (*dropouts*) relacionado com o aumento no número de períodos.

1.3 Tópicos do trabalho

Foram comparados cinco delineamentos do tipo *cross-over* para comparação de duas formulações (2x2, 4x2, 2x3, 2x4 e 4x4) e dois delineamentos usados para comparação de mais de duas formulações (6x3 e 4x4) no intuito de verificar o efeito do aumento do número de seqüências e/ou períodos na conclusão de bioequivalência.

Foram avaliados o poder do teste utilizado para comparação das formulações, o número de voluntários necessários no estudo e o número de medidas realizadas em cada voluntário. Além disso, foi realizado um estudo de simulação para verificar o efeito da utilização de um coeficiente de variação errado no cálculo do número de voluntários, o efeito da presença de observações atípicas, a probabilidade de duas formulações que são de fato bioequivalentes serem consideradas bioequivalentes no estudo para diversas situações e o impacto das desistências na conclusão de bioequivalência.

Também foram descritas situações em que são aplicados os métodos de bioequivalência individual e populacional, destacando suas vantagens e desvantagens em relação ao método de bioequivalência média.

No Capítulo 2 é feita uma consideração geral sobre os métodos e critérios de avaliação de bioequivalência, além de apresentados os delineamentos que serão estudados no decorrer do texto e alguns exemplos práticos de estudos de bioequivalência. O Capítulo 3 apresenta a comparação dos delineamentos através e relação ao número de voluntários, poder do teste, número de medidas e custo do estudo. O Capítulo 4 mostra os resultados dos estudos de simulação e a forma como foram realizadas. Por último, o Capítulo 5 apresenta as conclusões e considerações finais além de algumas sugestões para trabalhos futuros.

2 Referencial teórico

2.1 Tipos de delineamentos

A escolha dos delineamentos e aplicação apropriada dos métodos estatísticos para análise dos dados são dois aspectos relevantes em estudos de bioequivalência, por isso, é importante conhecer as vantagens e desvantagens de cada delineamento e/ou método para otimizar os gastos e garantir a confiabilidade do estudo.

Cada delineamento apresenta vantagens e desvantagens dependendo da circunstância. A escolha do delineamento apropriado depende de muitos fatores que são resumidos a seguir:

1. O número de formulações que serão comparadas;
2. As características do medicamento;
3. O objetivo do estudo;
4. O número de voluntários disponíveis;
5. As variabilidades inter e intra-individuais;
6. A duração do estudo ou o número aceitável de períodos;
7. O custo de adicionar voluntários relativo ao de adicionar períodos;
8. Taxa de desistência (*dropout*).

2.1.1 Paralelo

Conforme mencionado anteriormente, o delineamento paralelo é uma boa alternativa para estudos de bioequivalência para fármacos que apresentam meia-vida longa impossibilitando estabelecer um período de *washout* viável para realização de um estudo com delineamento *cross-over*.

O delineamento paralelo não permite estimar as variabilidades intra-individuais para as duas formulações independentemente. Assim, a avaliação de bioequivalência é feita com base na variabilidade total, o que inclui as variabilidades intra e inter-individuais (Chow; Wang, 2001).

É completamente aleatorizado e cada voluntário recebe apenas uma das formulações em estudo. O delineamento paralelo mais simples é aquele com apenas dois grupos, que compara duas formulações.

Normalmente os grupos possuem o mesmo número de voluntários. O esquema a seguir representa a idéia do delineamento paralelo.



2.1.2 *Cross-over*

A principal diferença do delineamento *cross-over* para o delineamento paralelo é que cada voluntário recebe mais de uma formulação em períodos diferentes. O esquema a seguir representa o delineamento *cross-over* mais simples com duas seqüências e dois períodos para comparação de duas formulações.



A vantagem do delineamento *cross-over* em relação ao paralelo, é que cada indivíduo serve de controle para ele mesmo. Assim, é possível remover a variabilidade inter-individual da comparação entre as formulações e são necessários menos voluntários para fornecer a mesma precisão. Além disso, com uma aleatorização adequada dos indivíduos nas seqüências é possível obter um estimador ótimo não viciado para a razão e/ou diferença entre as médias das formulações.

Apesar das vantagens apresentadas para o delineamento *cross-over*, existem algumas raras ocasiões em que a utilização do delineamento paralelo se faz necessária, ou é preferível. São elas:

- a variabilidade inter-individual é relativamente menor comparada à variabilidade intra-individual;
- a formulação é altamente tóxica ou apresenta meia-vida muito longa.

De acordo com a ANVISA, pode ser utilizado delineamento paralelo, quando se fizer necessário (Resolução N° 1170, ANVISA, 2006).

Primeiramente apresentaremos os cinco principais delineamentos *cross-over* para comparação de duas formulações utilizados na avaliação de bioequivalência média e em seguida os delineamentos de Williams para comparação de três e quatro formulações baseado em *Chow; Liu (2002)*.

Os quadros a seguir apresentam possíveis esquemas para os delineamentos *cross-over* 2x2, 4x2, 2x3, 2x4 e 4x4, respectivamente.

Delineamento <i>cross-over</i> 2x2		
Seqüência	Período	
	1°	2°
1	R	T
2	T	R

Delineamento <i>cross-over</i> 4x2		
Seqüência	Período	
	1°	2°
1	T	T
2	R	R
3	R	T
4	T	R

Delineamento <i>cross-over</i> 2x3			
Seqüência	Período		
	1°	2°	3°
1	T	R	R
2	R	T	T

Delineamento <i>cross-over</i> 2x4				
Seqüência	Período			
	1°	2°	3°	4°
1	T	R	R	T
2	R	T	T	R

Delineamento <i>cross-over</i> 4x4				
Seqüência	Período			
	1°	2°	3°	4°
1	T	T	R	R
2	R	R	T	T
3	T	R	R	T
4	R	T	T	R

Além da diferença existente entre os delineamentos em relação ao número de períodos e/ou seqüências deve-se considerar que os delineamentos possuem objetivos diferentes. Os delineamentos de Williams, por exemplo, tem por objetivo a comparação de mais e duas formulações enquanto os demais delineamentos que serão apresentados foram planejados para comparar apenas duas. Em alguns estudos pode-se querer não apenas realizar o teste para avaliação de bioequivalência mas também verificar se a variabilidade da formulação testada é menor que a da formulação referência, isso não é possível no *cross-over* 2x2, mas pode ser feito com o 2x4, por exemplo.

No delineamento *cross-over* 4x2, também chamado delineamento de Ballam, indivíduos nas seqüências 1 e 2 recebem a mesma formulação duas vezes o que permite estimar as variabilidades intra-individuais. Se as seqüências 1 e 2 forem retiradas, o delineamento de Balaam reduz-se ao *cross-over* 2x2.

O delineamento *cross-over* 2x3 é balanceado no sentido que cada formulação segue outra formulação, inclusive ela mesma, o mesmo número de vezes. Retirando o terceiro período tem-se o delineamento *cross-over* 2x2.

Os delineamentos *cross-over* 2x3, 2x4 e 4x4, também permitem calcular a variabilidade intra-individual porque cada indivíduo recebe pelo menos uma das formulações duas vezes, seja ela teste ou referência. Podem ainda ser usados para avaliar bioequivalência média na presença do efeito residual (*carry-over*), que não é confundido com o efeito de seqüência nestes delineamentos.

Existem ocasiões em que se deseja comparar mais de duas formulações em um estudo de bioequivalência, como por exemplo, formulações com liberação modificada, que devem ser investigadas sob condições aceleradas e não aceleradas, estudos de dosagem linear onde uma dose pré-definida serve de referência e outras dosagens servem como teste ou ainda quando dois ou mais laboratórios se unem para avaliar suas formulações com uma mesma formulação de referência.

A análise de bioequivalência torna-se mais complexa devido ao fato de termos vários pares de efeitos de formulações para serem comparados e as variâncias destes efeitos podem ser diferentes umas das outras. O delineamento de William é o mais utilizado na comparação de mais de duas formulações (Williams, 1949; Jones; Kenward, 2003).

No delineamento de William para comparar três formulações há seis seqüências e três períodos, já o delineamento de Williams para comparar quatro formulações, composto de quatro seqüências e quatro períodos, conforme apresentado a seguir.

3 formulações				4 formulações				
Seqüência	Período			Seqüência	Período			
	1°	2°	3°		1°	2°	3°	4°
1	R	T ₂	T ₁	1	R	T ₃	T ₁	T ₂
2	T ₁	R	T ₂	2	T ₁	R	T ₂	T ₃
3	T ₂	T ₁	R	3	T ₂	T ₁	T ₃	R
4	T ₁	T ₂	R	4	T ₃	T ₂	R	T ₁
5	T ₂	R	T ₁					
6	R	T ₁	T ₂					

2.2 Modelo e inferência estatística para delineamentos *cross-over*

2.2.1 Modelo tradicional

O delineamento *cross-over* mais utilizado em estudos de bioequivalência é o *cross-over* 2x2 que assume que não existe interação entre o indivíduo e a formulação. Deve-se observar que esta suposição não implica que não exista efeito aleatório do indivíduo. Ao contrário, a inexistência de interação entre a formulação e o indivíduo é uma indicação de que o efeito aleatório do indivíduo é o mesmo para as duas formulações. Assim, o modelo aplicado para delineamentos *cross-over* replicados é o mesmo daquele aplicado para o delineamento *cross-over* 2x2.

Para L formulações, J períodos, K seqüências e n_k voluntários em cada seqüência, o modelo tradicional de análise de variância é dado por:

$$Y_{ijkl} = \mu_l + G_{kl} + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijkl} \quad (2.1)$$

Os índices i , j , k e l são respectivamente para indivíduo ($i=1,2,\dots,n_k$), período ($j=1,2,\dots,J$), seqüência ($k=1,2,\dots,K$) e formulação ($l=1,2,\dots,L$) e os termos do modelo são:

- Y_{ijkl} : resposta (ASC ou C_{max}) do i -ésimo indivíduo, no j -ésimo período na k -ésima seqüência, para a l -ésima formulação;
- μ_l : média geral para a l -ésima formulação;
- G_{kl} : efeito fixo da k -ésima seqüência para a l -ésima formulação (para o delineamento *cross-over* 2x2 $G_{kl} = 0$);
- S_{ik} : efeito aleatório do i -ésimo indivíduo na k -ésima seqüência;
- P_j : efeito fixo do j -ésimo período;
- $F_{(j,k)}$: efeito fixo direto da formulação na k -ésima seqüência que é administrada no j -ésimo período, com a restrição de que $\sum F_{(j,k)} = 0$;

- $C_{(j-1,k)}$: efeito residual fixo (*carry-over*) de primeira ordem da formulação na k -ésima seqüência que é administrada no $(j-1)$ -ésimo período, tal que $C_{(0,k)} = 0$ e $\sum C_{(j-1,k)} = 0$;
- e_{ijkl} : erro aleatório intra-individual relativo à observação Y_{ijkl} .

Assume-se que as variáveis S_{ik} são independentes e identicamente distribuídas com média zero e variâncias σ_s^2 e e_{ijkl} são independentemente distribuídos com média zero e variância σ_l^2 . Assume-se ainda que S_{ik} e e_{ijkl} são mutuamente independentes. Normalmente σ_s^2 é utilizado para explicar a variabilidade inter-individual e os σ_l^2 são utilizados para explicar as variabilidades intra-individuais para a l -ésima formulação. Para o caso particular de duas formulações ($L=2$), denota-se as variabilidades intra-individuais por σ_{WT}^2 e σ_{WR}^2 para a formulação teste e referência, respectivamente, em geral assume-se que $\sigma_e^2 = \sigma_{WT}^2 = \sigma_{WR}^2$.

2.2.1.1 Delineamentos *cross-over* para duas formulações

Os graus de liberdade de acordo com a fonte de variação para os delineamentos *cross-over* 4x2, 2x3, 2x4 e 4x4 estão no Quadro 2.1. Para o delineamento *cross-over* 2x2 ver *Chellini* (2007).

Quadro 2.1: Graus de liberdade de acordo com a fonte de variação

Fonte de Variação	Delineamento <i>cross-over</i>			
	4x2	2x3	2x4	4x4
<i>Inter-Individual</i>	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 1$	$n_1 + n_2 - 1$	$n_1 + n_2 - 1$	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 1$
Efeito da seqüência	3	1	1	3
Residual	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 4$	$n_1 + n_2 - 2$	$n_1 + n_2 - 2$	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 4$
<i>Intra-Individual</i>	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4$	$2(n_1 + n_2)$	$3(n_1 + n_2)$	$3(n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$
Efeito de período	1	2	3	3
Efeito da formulação	1	1	1	1
Efeito <i>carry-over</i>	1	1	1	1
Residual	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 3$	$2(n_1 + n_2) - 2$	$3(n_1 + n_2) - 5$	$3(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) - 5$
Total	$2(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) - 1$	$3(n_1 + n_2) - 1$	$4(n_1 + n_2) - 1$	$4(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) - 1$

A Tabela 2.1 apresenta os valores esperados das médias das seqüências por período, ou seja, $\bar{Y}_{.jk} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} Y_{ijk}$, $j=1, \dots, J$ e $k=1, \dots, K$, para os delineamentos *cross-over* 2x2 ($J=2$ e $K=2$), 4x2 ($J=2$ e $K=4$), 2x3 ($J=3$ e $K=2$), 2x4 ($J=4$ e $K=2$) e 4x4 ($J=4$ e $K=4$), respectivamente.

Tabela 2.1: Valores esperados das médias das seqüências por período para delineamentos com duas formulações

(a) Delineamento <i>cross-over</i> 2x2			
Seqüência	Período		
	1°	2°	
1 (RT)	$\mu + P_1 + F_R$	$\mu + P_2 + F_T + C_T$	
2 (TR)	$\mu + P_1 + F_T$	$\mu + P_2 + F_R + C_T$	

(b) Delineamento <i>cross-over</i> 4x2		
Seqüência	Período	
	1°	2°
1 (TT)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_T + C_T$
2 (RR)	$\mu + G_2 + P_1 + F_R$	$\mu + G_2 + P_2 + F_R + C_R$
3 (RT)	$\mu + G_3 + P_1 + F_R$	$\mu + G_3 + P_2 + F_T + C_R$
4 (TR)	$\mu + G_4 + P_1 + F_T$	$\mu + G_4 + P_2 + F_R + C_T$

(c) Delineamento <i>cross-over</i> 2x3			
Seqüência	Período		
	1°	2°	3°
1 (TRR)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_1 + P_3 + F_R + C_R$
2 (RTT)	$\mu + G_2 + P_1 + F_R$	$\mu + G_2 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_2 + P_3 + F_T + C_T$

(d) Delineamento <i>cross-over</i> 2x4				
Seqüência	Período			
	1°	2°	3°	4°
1 (TRRT)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_1 + P_3 + F_R + C_R$	$\mu + G_1 + P_4 + F_T + C_R$
2 (RTTR)	$\mu + G_2 + P_1 + F_R$	$\mu + G_2 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_2 + P_3 + F_T + C_T$	$\mu + G_2 + P_4 + F_R + C_T$

(e) Delineamento <i>cross-over</i> 4x4				
Seqüência	Período			
	1°	2°	3°	4°
1 (TTTR)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_T + C_T$	$\mu + G_1 + P_3 + F_R + C_T$	$\mu + G_1 + P_4 + F_R + C_R$
2 (RRTT)	$\mu + G_2 + P_1 + F_R$	$\mu + G_2 + P_2 + F_R + C_R$	$\mu + G_2 + P_3 + F_T + C_R$	$\mu + G_2 + P_4 + F_T + C_T$
3 (TRRT)	$\mu + G_3 + P_1 + F_T$	$\mu + G_3 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_3 + P_3 + F_R + C_R$	$\mu + G_3 + P_4 + F_T + C_R$
4 (RTTR)	$\mu + G_4 + P_1 + F_R$	$\mu + G_4 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_4 + P_3 + F_T + C_T$	$\mu + G_4 + P_4 + F_R + C_T$

Para avaliar bioequivalência média considere $\theta = \mu_T - \mu_R$ a diferença das médias das duas formulações. Considerando apenas o delineamento *cross-over* 2x2, seja a diferença entre os períodos

$$d_{ik} = \frac{1}{2}(Y_{i2k} - Y_{i1k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k \text{ e } k = 1, 2. \quad (2.2)$$

Supondo homocedasticidade, o valor esperado e a variância para esta medida são dados por

$$E(d_{ik}) = \begin{cases} \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + C_R], & \text{para } k = 1 \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_R - F_T) + C_T], & \text{para } k = 2 \end{cases} \quad (2.3)$$

$$Var(d_{ik}) = \sigma_d^2 = \sigma_e^2 / 2 \quad (2.4)$$

Percebe-se que a variância das diferenças dos períodos envolve apenas a variabilidade intra-individual, o que reflete a utilidade do delineamento *cross-over* na comparação do efeito das formulações. Entretanto, os valores esperados de d_{ik} dependem dos efeitos de período, formulação e *carry-over*.

O efeito de período é dado por $P = P_2 - P_1$ e o efeito de formulação por $F = F_T - F_R$ (que é equivalente a $\theta = \mu_T - \mu_R$). Para fazer inferências sobre o efeito de formulação, considere a medida

$$\bar{d}_{ik} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} d_{ik}, \quad k = 1, 2. \quad (2.5)$$

A diferença entre as seqüências $(\bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2})$ é um estimador viciado para F (ou equivalentemente para θ) a menos que exista igualdade dos efeitos *carry-over*, ou seja $C_R = C_T$.

$$E(\bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}) = (F_T - F_R) + (C_R - C_T)/2 = F - C/2, \text{ onde } C = C_R - C_T.$$

Assim, se $C_R \neq C_T$, não existe estimador não viciado para θ baseado na diferença dos períodos. Por outro lado, se $C_R = C_T$, então

$$\hat{F} = \hat{\theta} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2} = \frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.12})] = \bar{Y}_T - \bar{Y}_R \quad (2.6)$$

é o estimador não viciado de variância mínima (MVUE) de θ , onde $\bar{Y}_R = \frac{1}{2}(\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.22})$ e

$$\bar{Y}_T = \frac{1}{2}(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.12}).$$

A variância de $\hat{\theta}$ é dada por

$$Var(\hat{\theta}) = \frac{\sigma_e^2}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right). \quad (2.7)$$

$$\text{Quando } n_1 = n_2 = n, \mathbf{Var}(\hat{\theta}) = \sigma_e^2 / n. \quad (2.8)$$

Agora para o delineamento *cross-over* 4x2 d_{ik} é definida de forma similar ao *cross-over* 2x2. Assumindo homocedasticidade, os valores esperados e as variâncias das médias amostrais das diferenças d_{ik} são dados por

$$E(\bar{d}_{.k}) = \begin{cases} \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + C_T], k = 1 \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + C_R], k = 2 \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + C_R], k = 3 \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) - (F_T - F_R) + C_T], k = 4 \end{cases} \quad (2.9)$$

$$\text{e } \mathbf{Var}(\bar{d}_{.k}) = \frac{1}{2n_k} \sigma_e^2. \quad (2.10)$$

$$\text{Segue que } E(\bar{d}_{.3} - \bar{d}_{.4}) = F_T - F_R + \frac{1}{2}(C_R - C_T) \text{ e } E(\bar{d}_{.2} - \bar{d}_{.1}) = \frac{1}{2}(C_R - C_T).$$

$$\text{Conseqüentemente, } E[(\bar{d}_{.3} - \bar{d}_{.4}) - (\bar{d}_{.2} - \bar{d}_{.1})] = F_T - F_R = F.$$

Assim, o melhor estimador linear não viciado para o efeito direto da formulação F (equivalentemente para θ) após o ajuste do efeito *carry-over* é dado por:

$$\hat{F} | C = (\bar{d}_{.3} - \bar{d}_{.4}) - (\bar{d}_{.2} - \bar{d}_{.1}) = \frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.23} - \bar{Y}_{.13}) - (\bar{Y}_{.24} - \bar{Y}_{.14}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.12}) + (\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11})] \quad (2.11)$$

Como as diferenças d_{ik} são independentes umas das outras, a variância de $\hat{F} | C$ é dada por

$$\mathbf{Var}(\hat{F} | C) = \frac{1}{2} \sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right). \quad (2.12)$$

$$\text{Quando } n_1 = n_2 = n, \mathbf{Var}(\hat{F} | C) = 2\sigma_e^2 / n. \quad (2.13)$$

Na ausência de efeito residual, ou seja, $C_R = C_T$ o estimador de F ou θ pode ser obtido baseado apenas nas duas últimas seqüências como mostrado a seguir.

$$\hat{\theta} = \bar{d}_{.3} - \bar{d}_{.4} = \frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.23} - \bar{Y}_{.13}) - (\bar{Y}_{.24} - \bar{Y}_{.14})] \quad (2.14)$$

Neste caso, a variância de $\hat{\theta}$ é dada por

$$\mathbf{Var}(\hat{\theta}) = \frac{1}{2} \sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right). \quad (2.15)$$

$$\text{Quando } n_3=n_4=n, \text{Var}(\hat{\theta}) = \sigma_e^2/n. \quad (2.16)$$

Os cálculos para os demais delineamentos podem ser obtidos de forma similar ao apresentado ou ainda *Chow; Liu (2000)* pode ser consultado.

A Tabela 2.2 apresenta de forma resumida os estimadores para a diferença das médias das duas formulações e suas respectivas variâncias para todos os delineamentos *cross-over* já apresentados.

Tabela 2.2: Diferença das médias das duas formulações: Estimadores e Variâncias

Delineamento <i>cross-over</i>	Estimador*	Variância	Variância**
2x2	$\frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.12})]$	$\frac{\sigma_e^2}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$	σ_e^2/n
4x2	$\frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.23} - \bar{Y}_{.13}) - (\bar{Y}_{.24} - \bar{Y}_{.14})]$	$\frac{1}{2}\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right)$	σ_e^2/n
4x2 ^c	$\frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.23} - \bar{Y}_{.13}) - (\bar{Y}_{.24} - \bar{Y}_{.14}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.12}) + (\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11})]$	$\frac{1}{2}\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right)$	$2\sigma_e^2/n$
2x3 ou 2x3 ^c	$\frac{1}{4}[(2\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31}) - (2\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32})]$	$\frac{3}{8}\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$	$3\sigma_e^2/4n$
2x4	$\frac{1}{4}[(\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31} + \bar{Y}_{.41}) - (\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32} + \bar{Y}_{.42})]$	$\frac{1}{4}\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$	$\sigma_e^2/2n$
2x4 ^c	$\frac{1}{20}[(6\bar{Y}_{.11} - 3\bar{Y}_{.21} - 7\bar{Y}_{.31} + 4\bar{Y}_{.41}) - (6\bar{Y}_{.12} - 3\bar{Y}_{.22} - 7\bar{Y}_{.32} + 4\bar{Y}_{.42})]$	$\frac{11}{40}\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$	$\frac{11}{20} \frac{\sigma_e^2}{n}$
4x4 ou 4x4 ^c	$\frac{1}{8}[(\bar{Y}_{.11} + \bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31} - \bar{Y}_{.41}) - (\bar{Y}_{.12} + \bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32} - \bar{Y}_{.42}) + (\bar{Y}_{.13} - \bar{Y}_{.23} - \bar{Y}_{.33} + \bar{Y}_{.43}) - (\bar{Y}_{.14} - \bar{Y}_{.24} - \bar{Y}_{.34} + \bar{Y}_{.44})]$	$\frac{1}{16}\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right)$	$\sigma_e^2/4n$

^c na presença de efeito residual (*carry-over*)

* $\hat{\theta}$ quando não há efeito residual e $\hat{\theta} | C$ quando há efeito residual.

** Considerando que $n_k = n$, para $k = 1, \dots, K$.

2.2.1.2 Delineamentos *cross-over* para mais de duas formulações

Para avaliar bioequivalência média para mais de duas formulações sob o modelo (2.1), os parâmetros de interesse são:

- as médias desconhecidas das formulações: $\mu_l = \mu + F_l$, $l = 1, 2, \dots, L$;
- o efeito direto da formulação: $\theta_{ll'} = F_l - F_{l'}$, $1 \leq l \neq l' < L$;
- o efeito *carry-over* de primeira ordem: $\lambda_{ll'} = C_l - C_{l'}$, $1 \leq l \neq l' < L$.

Estimadores não viciados para $\theta_{ll'}$ e $\lambda_{ll'}$ podem ser obtidos através do método de mínimos quadrados ordinários. Estes estimadores não viciados podem ser expressados como um contraste linear das médias das seqüências por período dado por

$$\ell_a = \sum_{k=1}^K \sum_{j=1}^J C_{ajk} \bar{Y}_{.jk}, \text{ onde } a = 1, 2, \dots, \frac{L!}{2!(L-2)!} \text{ e } \sum_{j=1}^J C_{ajk} = \sum_{k=1}^K C_{ajk} = 0. \quad (2.17)$$

sob a suposição de normalidade e homocedasticidade, para $l = 1, 2, \dots, L$, a variância de ℓ_a é dada por

$$\text{Var}(\ell_a) = \sigma_e^2 \sum_{k=1}^K \left[\frac{1}{n_k} \right] \sum_{j=1}^J C_{ajk}^2. \quad (2.18)$$

Note que quando $n_k = n$ para todo k , a variância dada em (2.18) é reduzida a

$$\text{Var}(\ell_a) = \frac{\sigma_e^2}{n} \sum_{k=1}^K \sum_{j=1}^J C_{ajk}^2. \quad (2.19)$$

O intervalo com $100(1 - 2\alpha)\%$ de confiança e o procedimento de teste de Schuirmann (Schuirmann, 1981, 1987) são utilizados na avaliação de bioequivalência média entre as formulações duas a duas, ou seja, a l -ésima formulação e a l' -ésima formulação ($l \neq l'$).

Um estimador não viciado da média geral da seqüência por período é dado por $\hat{\mu} = \frac{1}{JK} \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K \bar{Y}_{.jk}$.

Para a l -ésima formulação, seja \hat{F}_l o estimador não viciado de mínimos quadrados de F_l . Então, a média populacional μ_l , $l = 1, 2, \dots, L$, pode ser estimada, sem vício, por $\hat{\mu}_l = \hat{\mu} + \hat{F}_l$.

Os estimadores não viciados de mínimos quadrados para $\theta_{ll'}$ são então dados por

$$\hat{\theta}_{ll'} = \hat{\mu}_l - \hat{\mu}_{l'} = \hat{F}_l - \hat{F}_{l'} \quad 1 \leq l \neq l' \leq L. \quad (2.20)$$

Conseqüentemente, o intervalo com $100(1 - 2\alpha)\%$ de confiança para $\theta_{ll'}$ é dado por

$$IC_{\theta_{ll'}}(1 - 2\alpha) = \hat{\theta}_{ll'} \pm t(\alpha, v) \left[\hat{\sigma}_e^2 \sum_{k=1}^K \frac{1}{n_k} \sum_{j=1}^J C_{ajk}^2 \right]^{1/2}. \quad (2.21)$$

onde $\hat{\sigma}_e^2$ é o estimador da variabilidade intra-individual (σ_e^2) obtido da tabela de análise de variância e v representa os graus de liberdade. Concluimos que há bioequivalência média entre a l -ésima formulação e a l' -ésima formulação se $IC_{\theta_{ll'}}(1 - 2\alpha)$ está dentro do intervalo de bioequivalência $(\theta_l, \theta_{l'})$.

Pelo procedimento de teste de Schuirman, conclui-se bioequivalência média, com $\alpha\%$ de significância se

$$T^+ = \frac{\hat{\theta}_{ll'} - \theta_l}{\left[\hat{\sigma}_e^2 \sum_{k=1}^K \frac{1}{n_k} \sum_{j=1}^J C_{ajk}^2 \right]^{1/2}} > t(\alpha, v) \text{ e } T^- = \frac{\hat{\theta}_{ll'} - \theta_{l'}}{\left[\hat{\sigma}_e^2 \sum_{k=1}^K \frac{1}{n_k} \sum_{j=1}^J C_{ajk}^2 \right]^{1/2}} < -t(\alpha, v) \quad (2.22)$$

Os graus de liberdade para os delineamentos de Williams com três e quatro formulações estão no Quadro 2.2.

Quadro 2.2: Graus de liberdade* de acordo com a fonte de variação

Fonte de variação	Delineamento cross-over	
	6x3	4x4
<i>Inter-individual</i>	$N^{**} - 1$	$N^{***} - 1$
Efeito da seqüência	5	3
Residual	$N - 6$	$N - 4$
<i>Intra-individual</i>	$2N$	$3N$
Efeito de período	2	3
Efeito da Formulação	2	3
<i>Carry-over</i>	2	3
Residual	$2(N - 3)$	$3(N - 3)$
Total	$3N - 1$	$4N - 1$

* Se não há efeito *carry-over*, graus de liberdade para o resíduo intra-individual é $2(N - 2)$ para 6x3 e $3(N - 2)$ para 4x4.

** $N = n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5 + n_6$

*** $N = n_1 + n_2 + n_3 + n_4$

A Tabela 2.3 apresenta os valores esperados das médias das seqüências por período para os delineamentos de Williams com três e quatro formulações.

Tabela 2.3: Valores esperados das médias das seqüências por período para delineamentos com mais de duas formulações

(a) Delineamento <i>cross-over</i> 6x3			
Seqüência	Período		
	1°	2°	3°
1 (RT ₂ T ₁)	$\mu + G_1 + P_1 + F_R$	$\mu + G_1 + P_2 + F_2 + C_R$	$\mu + G_1 + P_3 + F_1 + C_2$
2 (T ₁ RT ₂)	$\mu + G_2 + P_1 + F_1$	$\mu + G_2 + P_2 + F_R + C_1$	$\mu + G_2 + P_3 + F_2 + C_R$
3 (T ₂ T ₁ R)	$\mu + G_3 + P_1 + F_2$	$\mu + G_3 + P_2 + F_1 + C_2$	$\mu + G_3 + P_3 + F_R + C_1$
4 (T ₁ T ₂ R)	$\mu + G_4 + P_1 + F_1$	$\mu + G_4 + P_2 + F_2 + C_1$	$\mu + G_4 + P_3 + F_R + C_2$
5 (T ₂ RT ₁)	$\mu + G_5 + P_1 + F_2$	$\mu + G_5 + P_2 + F_R + C_2$	$\mu + G_5 + P_3 + F_1 + C_R$
6 (RT ₁ T ₂)	$\mu + G_6 + P_1 + F_R$	$\mu + G_6 + P_2 + F_1 + C_R$	$\mu + G_6 + P_3 + F_2 + C_1$

(b) Delineamento <i>cross-over</i> 4x4				
Seqüência	Período			
	1°	2°	3°	4°
1 (RT ₃ T ₁ T ₂)	$\mu + G_1 + P_1 + F_R$	$\mu + G_1 + P_2 + F_3 + C_R$	$\mu + G_1 + P_3 + F_1 + C_3$	$\mu + G_1 + P_4 + F_2 + C_1$
2 (T ₁ RT ₂ T ₃)	$\mu + G_2 + P_1 + F_1$	$\mu + G_2 + P_2 + F_R + C_1$	$\mu + G_2 + P_3 + F_2 + C_R$	$\mu + G_2 + P_4 + F_3 + C_2$
3 (T ₂ T ₁ T ₃ R)	$\mu + G_3 + P_1 + F_2$	$\mu + G_3 + P_2 + F_1 + C_2$	$\mu + G_3 + P_3 + F_3 + C_1$	$\mu + G_3 + P_4 + F_R + C_3$
4 (T ₃ T ₂ RT ₁)	$\mu + G_4 + P_1 + F_3$	$\mu + G_4 + P_2 + F_2 + C_3$	$\mu + G_4 + P_3 + F_R + C_2$	$\mu + G_4 + P_4 + F_1 + C_R$

Botter; Singer (1991) desenvolveram as fórmulas usadas na elaboração da tabela ANOVA para comparação de 3 formulações em um delineamento com 3 períodos e 6 seqüências. Apenas o efeito residual de primeira ordem é considerado. O modelo linear para a situação apresentada é o mesmo apresentado em (2.1). Adaptando para a notação adotada neste texto, os estimadores de mínimos quadrados para os parâmetros do modelo acima são dados por:

- $\mu = y_{..}/18n$
- $F_1 = (5T_1 + 3R_1 + y_{..4} + y_{..6} + y_{.1.} - 3y_{...})/24n$
- $F_2 = (5T_2 + 3R_2 + y_{..2} + y_{..5} + y_{.1.} - 3y_{...})/24n$
- $F_3 = (5T_3 + 3R_3 + y_{..1} + y_{..3} + y_{.1.} - 3y_{...})/24n$
- $C_1 = (9R_1 + 3T_1 + 3y_{..4} + 3y_{..6} + 3y_{.1.} - 5y_{...})/24n$
- $C_2 = (9R_2 + 3T_2 + 3y_{..2} + 3y_{..5} + 3y_{.1.} - 5y_{...})/24n$
- $C_3 = (9R_3 + 3T_3 + 3y_{..1} + 3y_{..3} + 3y_{.1.} - 5y_{...})/24n$
- $P_1 = (3y_{.1.} - y_{...})/18n$
- $P_2 = (3y_{.2.} - y_{...})/18n$
- $P_3 = (3y_{.3.} - y_{...})/18n$

- $S_{ik} = y_{i\cdot k}/3 + (T_3 + 3R_3 + y_{\cdot\cdot 1} + y_{\cdot\cdot 3} + y_{\cdot 1} - 3y_{\cdot\cdot\cdot})/24n, i=1,3$
- $S_{ik} = y_{i\cdot k}/3 + (T_2 + 3R_2 + y_{\cdot\cdot 2} + y_{\cdot\cdot 5} + y_{\cdot 1} - 3y_{\cdot\cdot\cdot})/24n, i=2,5$
- $S_{ik} = y_{i\cdot k}/3 + (T_1 + 3R_1 + y_{\cdot\cdot 4} + y_{\cdot\cdot 6} + y_{\cdot 1} - 3y_{\cdot\cdot\cdot})/24n, i=4,6$

onde,

- $T_1 = \sum_{i=1}^n (y_{i11} + y_{i12} + y_{i23} + y_{i34} + y_{i25} + y_{i36})$
- $T_2 = \sum_{i=1}^n (y_{i21} + y_{i32} + y_{i13} + y_{i14} + y_{i35} + y_{i26})$
- $T_3 = y_{\cdot\cdot\cdot} - T_1 - T_2$
- $R_1 = \sum_{i=1}^n (y_{i12} + y_{i22} + y_{i33} + y_{i35})$
- $R_2 = \sum_{i=1}^n (y_{i31} + y_{i23} + y_{i24} + y_{i36})$
- $R_3 = y_{\cdot\cdot\cdot} - y_{\cdot 1} - R_1 - R_2$
- $y_{\cdot\cdot\cdot} = \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^6 \sum_{i=1}^n y_{ijk}$ e $y_{\cdot 1} = \sum_{k=1}^6 \sum_{i=1}^n y_{i1k}$

A Tabela 2.4 apresenta a tabela de análise de variância para o delineamento *cross-over* 6x3.

Tabela 2.4: Tabela de Análise de Variância para o delineamento *cross-over* 6x3

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados
Voluntários	$6n-1$	$SQV = 3 \sum_{k=1}^6 \sum_{i=1}^n S_{ik}^2$
Formulação	2	$SQF = \frac{24n}{5} \sum_{b=1}^3 F_b^2$
Efeito Residual (intra)	2	$SQI = \frac{8n}{3} \sum_{b=1}^3 C_b^2$
Período	2	$SQP = 6n \sum_{j=1}^3 P_j^2$
Erro (intra)	$12n-6$	SQE^*
Total (intra)	$18n-1$	$SQT = 3 \sum_{k=1}^6 \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^3 y_{ijk}^2 - \frac{y_{\cdot\cdot\cdot}^2}{18n}$

$$\begin{aligned}
 * SQE &= SQT - SQP + \frac{5}{4} SQF + SQV + \frac{3}{2} SQI - 2 \sum_{b=1}^3 F_b T_b - 2 \sum_{b=1}^3 C_b R_b \\
 &- 2C_1 \sum_{i=1}^n S_{i4} S_{i6} - 2C_2 \sum_{i=1}^n S_{i2} S_{i5} - 2C_3 \sum_{i=1}^n S_{i1} S_{i3} - 4n \sum_{b=1}^3 C_b F_b - 2 \sum_{k=1}^6 \sum_{i=1}^n S_{ik} y_{i\cdot k}
 \end{aligned}$$

Para estimar os três efeitos de formulação presentes no delineamento *cross-over* 6x3, F_l , $l = 1,2,3$, é necessário encontrar os coeficientes C_{ajk} que estão apresentados na Tabela 2.5 para os estimadores não viciados de mínimos quadrados ordinários de F_l , $l = 1,2,3$.

Tabela 2.5: Coeficientes (multiplicados por 24) para estimadores das formulações F_R , F_1 e F_2 no modelo de Williams com três formulações (com efeito *carry-over*)

Seqüência	F_R Período			F_1 Período			F_2 Período		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
1	3	0	-3	-1	-2	3	-2	2	0
2	-2	2	0	3	0	-3	-1	-2	3
3	-1	-2	3	-2	2	0	3	0	-3
4	-1	-2	3	3	0	-3	-2	2	0
5	-2	0	0	-1	2	3	3	0	-3
6	3	2	-3	-2	-2	0	-1	-2	3

As Tabelas 2.6 e 2.7 listam os coeficientes usados para estimar $\theta_{ll'}$ através do método dos mínimos quadrados ordinários na presença e ausência de efeito residual, respectivamente. Baseado nesses coeficientes, o intervalo de confiança e o procedimento de teste de Schuirmann podem ser encontrados.

Tabela 2.6: Coeficientes (multiplicados por 24) para o delineamento de Williams com três formulações^c

Seqüência	$\theta_{1R} = F_1 - F_R$				$\theta_{2R} = F_2 - F_R$				$\theta_{21} = F_2 - F_1$			
	Período				Período				Período			
	1º	2º	3º	$\sum_j C_{ajk}^2$	1º	2º	3º	$\sum_j C_{ajk}^2$	1º	2º	3º	$\sum_j C_{ajk}^2$
1	-4	-2	6	$56/(24)^2$	-5	2	3	$38/(24)^2$	-1	4	-3	$26/(24)^2$
2	5	-2	-3	$38/(24)^2$	1	-4	3	$26/(24)^2$	-4	-2	6	$56/(24)^2$
3	-1	4	-3	$26/(24)^2$	4	2	-6	$56/(24)^2$	5	-2	-3	$38/(24)^2$
4	4	2	-6	$56/(24)^2$	-1	4	-3	$26/(24)^2$	-5	2	3	$56/(24)^2$
5	1	-4	3	$26/(24)^2$	5	-2	-3	$38/(24)^2$	4	2	-6	$56/(24)^2$
6	-5	2	3	$38/(24)^2$	-4	-2	6	$56/(24)^2$	1	-4	3	$26/(24)^2$
Variância*				$\frac{5}{12n} \sigma_e^2$				$\frac{5}{12n} \sigma_e^2$				$\frac{5}{12n} \sigma_e^2$

*variância quando $n=n_k$ para $1 \leq k \leq 6$,^c com efeito residual (*carry-over*)

Tabela 2.7: Coeficientes (multiplicados por 6) para o delineamento de Williams com três formulações

Seqüência	$\theta_{1R} = F_1 - F_R$				$\theta_{2R} = F_2 - F_R$				$\theta_{21} = F_2 - F_1$			
	Período				Período				Período			
	1º	2º	3º	$\sum_j C_{ajk}^2$	1º	2º	3º	$\sum_j C_{ajk}^2$	1º	2º	3º	$\sum_j C_{ajk}^2$
1	-1	0	1	1/18	-1	1	0	1/18	0	1	-1	1/18
2	1	-1	0	1/18	0	-1	1	1/18	-1	0	1	1/18
3	0	1	-1	1/18	1	0	-1	1/18	1	-1	0	1/18
4	1	0	-1	1/18	0	1	-1	1/18	-1	1	0	1/18
5	0	-1	1	1/18	1	-1	0	1/18	1	0	-1	1/18
6	-1	1	0	1/18	-1	0	1	1/18	0	-1	1	1/18
Variância*				$\frac{1}{3n} \sigma_e^2$				$\frac{1}{3n} \sigma_e^2$				$\frac{1}{3n} \sigma_e^2$

* variância quando $n=n_k$ para $1 \leq k \leq 6$.

Os coeficientes usados para estimar F_l através do método de mínimos quadrados ordinários para o delineamento *cross-over* 4x4, são dados nas Tabelas 2.8 e 2.9. O modelo de Williams com três formulações compara três pares de formulações, já no modelo com quatro formulações há um total de seis pares de formulações a serem comparados.

Tabela 2.8: Coeficientes (multiplicados por 40) para o delineamento de Williams com quatro formulações^c

Seqüência	$\theta_{1R} = F_1 - F_R$					$\theta_{2R} = F_2 - F_R$					$\theta_{3R} = F_3 - F_R$				
	Período					Período					Período				
	1º	2º	3º	4º	$\sum_j C_{ajk}^2$	1º	2º	3º	4º	$\sum_j C_{ajk}^2$	1º	2º	3º	4º	$\sum_j C_{ajk}^2$
1	-11	-4	11	4	$274/(40)^2$	-10	-3	1	12	$254/(40)^2$	-11	7	4	0	$186/(40)^2$
2	11	-7	-4	0	$186/(40)^2$	0	-11	7	4	$186/(40)^2$	1	-10	-3	12	$254/(40)^2$
3	-1	10	3	-12	$254/(40)^2$	10	3	-1	-12	$254/(40)^2$	-1	-1	10	-8	$166/(40)^2$
4	1	1	-10	8	$166/(40)^2$	0	11	7	-4	$186/(40)^2$	11	4	-11	-4	$274/(40)^2$
Variância*					$\frac{11}{20n} \sigma_e^2$					$\frac{11}{20n} \sigma_e^2$					$\frac{11}{20n} \sigma_e^2$

Seqüência	$\theta_{21} = F_2 - F_1$					$\theta_{31} = F_3 - F_1$					$\theta_{32} = F_3 - F_2$				
	Período					Período					Período				
	1º	2º	3º	4º	$\sum_j C_{ajk}^2$	1º	2º	3º	4º	$\sum_j C_{ajk}^2$	1º	2º	3º	4º	$\sum_j C_{ajk}^2$
1	1	1	-10	8	$166/(40)^2$	0	11	-7	-4	$186/(40)^2$	-1	10	3	-12	$254/(40)^2$
2	-11	-4	11	4	$274/(40)^2$	-10	-3	1	12	$254/(40)^2$	1	1	-10	8	$166/(40)^2$
3	11	-7	-4	0	$186/(40)^2$	0	-11	7	4	$186/(40)^2$	-11	-4	11	4	$274/(40)^2$
4	-1	10	3	-12	$254/(40)^2$	10	3	-1	-12	$254/(40)^2$	11	-7	-4	0	$186/(40)^2$
Variância*					$\frac{11}{20n} \sigma_e^2$					$\frac{11}{20n} \sigma_e^2$					$\frac{11}{20n} \sigma_e^2$

* variância quando $n=n_k$, para $1 \leq k \leq 4$, ^c com efeito residual (*carry-over*).

Tabela 2.9: Coeficientes (multiplicados por 10) para o delineamento de Williams com quatro formulações

Seqüência	$\theta_{1R} = F_1 - F_R$					$\theta_{2R} = F_2 - F_R$					$\theta_{3R} = F_3 - F_R$				
	Período				$\sum_j C_{ajk}^2$	Período				$\sum_j C_{ajk}^2$	Período				$\sum_j C_{ajk}^2$
	1°	2°	3°	4°		1°	2°	3°	4°		1°	2°	3°	4°	
1	-1	0	1	0	1/8	-1	0	0	1	1/8	-1	1	0	0	1/8
2	1	-1	0	0	1/8	0	-1	1	0	1/8	0	-1	0	1	1/8
3	0	1	0	-1	1/8	1	0	0	-1	1/8	0	0	1	-1	1/8
4	0	0	-1	1	1/8	0	1	-1	0	1/8	1	0	-1	0	1/8
Variância*					$\frac{1}{2n} \sigma_e^2$					$\frac{1}{2n} \sigma_e^2$					$\frac{1}{2n} \sigma_e^2$

Seqüência	$\theta_{21} = F_2 - F_1$					$\theta_{31} = F_3 - F_1$					$\theta_{32} = F_3 - F_2$				
	Período				$\sum_j C_{ajk}^2$	Período				$\sum_j C_{ajk}^2$	Período				$\sum_j C_{ajk}^2$
	1°	2°	3°	4°		1°	2°	3°	4°		1°	2°	3°	4°	
1	0	0	-1	1	1/8	0	1	-1	0	1/8	0	1	0	-1	1/8
2	-1	0	1	0	1/8	-1	0	0	1	1/8	0	0	-1	1	1/8
3	1	-1	0	0	1/8	0	-1	1	0	1/8	-1	0	1	0	1/8
4	0	1	0	-1	1/8	1	0	0	-1	1/8	1	-1	0	0	1/8
Variância*					$\frac{1}{2n} \sigma_e^2$					$\frac{1}{2n} \sigma_e^2$					$\frac{1}{2n} \sigma_e^2$

* variância quando $n = n_k$, para $1 \leq k \leq 4$.

2.2.2 Modelo de efeitos mistos

O modelo tradicional de análise de variância ignora o efeito da variabilidade devido à interação do indivíduo com a formulação. A interação do indivíduo com a formulação tem um importante papel na avaliação da bioequivalência individual, que pode ser contemplada no modelo de efeitos mistos. Willavize; Morgenthien (2006) comparam quatro modelos de efeitos mistos através de estudos de simulação. Um deles é o modelo proposto pelo *Food and Drug Administration* (FDA) descrito a seguir.

$$Y_{ijkl} = \mu_l + G_{kl} + S_{ikl} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijkl} \quad (2.23)$$

Os índices i, j, k e l são respectivamente para indivíduo ($i=1,2,\dots,n_k$), período ($j=1,2,\dots,J$), seqüência ($k=1,2,\dots,K$) e formulação ($l=1,2,\dots,L$) e os termos do modelos são:

- S_{ikl} : efeito aleatório do i -ésimo indivíduo na k -ésima seqüência para a l -ésima formulação;
- $Y_{ijkl}, \mu_l, G_{kl}, P_j, F_{(j,k)}, C_{(j-1,k)}$ e e_{ijkl} são os mesmos definidos em (2.1).

Assume-se que S_{ikl} são independentes e identicamente distribuídos com média zero e matriz de variâncias e covariâncias dada por Σ . Para a comparação de duas formulações, teste e referência,

$\Sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{BT}^2 & \rho\sigma_{BT}\sigma_{BR} \\ \rho\sigma_{BT}\sigma_{BR} & \sigma_{BR}^2 \end{pmatrix}$, onde σ_{BT}^2 e σ_{BR}^2 são as variâncias inter-individuais para a formulação teste e referência, respectivamente e ρ é o coeficiente de correlação inter-individual entre S_{ikT} e S_{ikR} .

Os termos e_{ijkl} são independentemente distribuídos com média zero e variância σ_l^2 , onde $l = 1, 2, \dots, L$. Essas últimas variâncias (σ_l^2) são utilizadas para explicar as variabilidades intra-individuais para a l -ésima formulação. No caso particular de duas formulações, denotamos as variabilidades intra-individuais por σ_{WT}^2 e σ_{WR}^2 para a formulação teste e referência, respectivamente. Além disso, $\sigma_e^2 = \sigma_{WT}^2 = \sigma_{WR}^2$. A variabilidade devido à interação entre indivíduo e formulação é dada por $\sigma_D^2 = \sigma_{BT}^2 + \sigma_{BR}^2 - 2\rho\sigma_{BT}\sigma_{BR}$.

2.3 Escala original versus escala logarítmica

Em estudos de bioequivalência, é comum utilizar os dados na escala logarítmica. Existem justificativas em relação tanto ao tratamento de dados como também ao comportamento farmacocinético, como discutido em Chellini (2007).

Os parâmetros na escala logarítmica serão denotados pelo símbolo *. Se $Y \sim \text{log-normal}(\mu, \sigma^2)$ então $Y^* = \ln Y \sim \text{Normal}(\mu^*, \sigma^{2*})$. Podemos escrever o coeficiente de variação na escala original em função da variância na escala logarítmica, para isso é preciso definir as seguintes relações entre as médias e variâncias na escala original e na escala logarítmica:

- $\mu = E(Y) = \exp\left\{\mu^* + \frac{\sigma^{2*}}{2}\right\}$
- $\text{Var}(Y) = \exp\{2\mu^* + 2\sigma^{2*}\} - \exp\{2\mu^* + \sigma^{2*}\} = \exp\{2\mu^* + \sigma^{2*}\}(\exp\{\sigma^{2*}\} - 1)$

Então, é fácil mostrar que o CV na escala original é dado por $CV = \sqrt{\exp\{\sigma^{2*}\} - 1}$.

A partir das relações descritas acima é possível verificar a relação entre coeficiente de variação na escala logarítmica (CV^*) e o coeficiente de variação na escala original (CV) que é dada por

$$CV^* = \frac{\sqrt{\ln(1 + (CV)^2)}}{\mu^*}.$$

2.4 Tipos de estudos de bioequivalência

O conceito estatístico de bioequivalência refere-se à investigação a respeito da similaridade das distribuições marginais das medidas farmacocinéticas de interesse para as formulações comparadas. Neste contexto, três tipos de estudos de bioequivalência podem ser realizados: média, individual e populacional.

O tipo de estudo mais utilizado é o de bioequivalência média que avalia se as formulações são em média semelhantes. Avaliar bioequivalência populacional significa verificar que as distribuições da biodisponibilidade das formulações são suficientemente próximas. Já bioequivalência individual avalia se uma grande proporção de indivíduos terá comportamento suficientemente similar para as formulações.

As agências reguladoras de vários países, incluindo a brasileira (ANVISA), exigem apenas a avaliação de bioequivalência média para liberação de medicamentos genéricos no mercado. Entretanto, este método apresenta algumas limitações, já que, por exemplo, nem sempre permite avaliar a intercambialidade entre as formulações teste. Com o objetivo de superar estas limitações foram desenvolvidos os métodos de bioequivalência populacional e individual.

Hauck;Anderson (1994) avaliam as condições para que um estudo realizado através do método de bioequivalência média seja suficiente para avaliar intercambialidade. Segundo os autores, é necessário estabelecer limites para as variabilidades intra e inter-individuais e para a interação do indivíduo com a formulação.

Baseado no fato de que a distribuição de algumas variáveis aleatórias, como a Normal, é completamente determinada por seus momentos, a equivalência entre as duas distribuições marginais pode ser avaliada através dos dois primeiros momentos (média e variância). A comparação das médias das distribuições da medida farmacocinética para duas formulações refere-se à comparação da *biodisponibilidade média*, enquanto a comparação das variâncias refere-se à *variabilidade da biodisponibilidade*.

A Figura 2.1 ilustra os conceitos de *biodisponibilidade média* e *variabilidade da biodisponibilidade*. O painel (a) apresenta duas distribuições equivalentes em média e variância, (b) apresenta equivalência em média, mas não em variância e finalmente o (c) apresenta equivalência em variância, mas não em média.

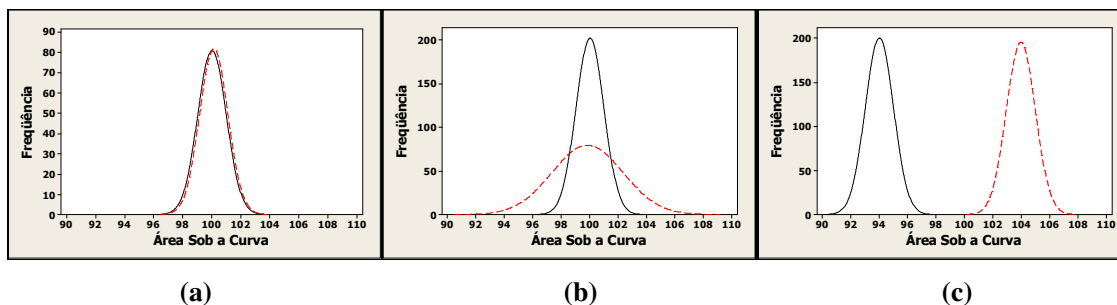


Figura 2.1: Ilustração de três situações: (a) equivalência em média e variância; (b) equivalência em média, mas não em variância; (c) equivalência em variância, mas não em média.

Como o nome indica, a **bioequivalência média** é o método que estabelece equivalência em média das distribuições marginais das duas formulações comparadas. Já a **bioequivalência populacional** avalia a equivalência em média e em variância para as distribuições marginais. Entretanto, em geral, a equivalência dos dois primeiros momentos não garante equivalência entre duas formulações (Chow; Liu, 2000). Na avaliação da **bioequivalência individual** são comparadas as distribuições marginais das respostas farmacocinéticas obtidas através da administração repetida das formulações teste e referência para um mesmo indivíduo.







A bioequivalência média não garante equivalência das variabilidades intra-individuais e similaridade das distribuições marginais das formulações teste e referência. Assim, ao utilizar este método para avaliar bioequivalência, é ignorada a comparação destas variabilidades. Esta comparação é importante para verificar o pressuposto de homocedasticidade que é uma das suposições para realização do teste de Schuirmann. Apesar disso, as variabilidades intra-individuais tem influencia direta no teste de Schuirmann por ser baseado em hipóteses intervalares e não pontuais.

Chow; Liu (2000) apresentam representações gráficas para três características (diferença entre as respostas médias, interação do indivíduo com a formulação e diferença entre as variâncias intra-individuais) avaliadas em dois indivíduos. Seis situações diferentes (A, B, C, D, E, F) são consideradas, conforme pode ser visto no Quadro 2.3.

A coluna A representa o caso raro em que as duas formulações são idênticas. Esta é a situação ideal quando não existe diferença entre as médias populacionais, nem variabilidade intra-individual e também não há interação do indivíduo com a formulação. Ocorre muito raramente, mesmo quando se compara a formulação referência com ela mesma. A coluna B apresenta uma situação em que existe uma diferença entre as médias populacionais, mas não existe diferença entre as variâncias intra-individuais e não há interação do indivíduo com a formulação. A diferença das médias populacionais na coluna C é negativa para o indivíduo 1 e positiva para o indivíduo 2. Entretanto, as médias populacionais e as variabilidades intra-individuais são as mesmas para as duas formulações. Esta é a

típica situação em que mesmo que não exista diferença das médias populacionais e das variâncias intra-individuais, a interação do indivíduo com a formulação pode existir.

Quadro 2.3: Esquema das diferenças das respostas para dois indivíduos para as formulações teste (T) e referência (R).

	A	B	C	D	E	F
	R T	R T	R T	R T	R T	R T
						
$(\mu_T - \mu_R)^2$	0	+	0	0	0	+
σ_D^2	0	0	+	+	+	+
$\sigma_{WT}^2 - \sigma_{WR}^2$	0	0	0	+	-	-
Bioequivalência Média	✓	✗	✓	✓	✓	✗
Bioequivalência Individual	✓	✗	✗	✗	✗	✗

$\mu_T - \mu_R$: diferença entre as respostas médias; σ_D^2 : interação do indivíduo com a formulação; $\sigma_{WT}^2 - \sigma_{WR}^2$: diferença entre as variâncias intra-individuais; fontes de variação: ausentes (0), positivas (+) ou negativas (-); conclusão de bioequivalência: bioequivalentes (✓), não bioequivalentes (✗).

As colunas D e E ilustram a situação em que não existe diferença para as médias populacionais, mas existe interação entre indivíduo e formulação, assim como diferença entre as variâncias intra-individuais. A coluna F apresenta o pior cenário em que existe diferença das médias populacionais, das variâncias intra-individuais e interação do indivíduo com a formulação.

Os métodos de avaliação de bioequivalência individual e populacional podem ser baseados em momentos ou em probabilidade. O método baseado em momentos considera a diferença entre as médias das formulações teste e referência, a interação da formulação com o indivíduo e as variabilidades intra-individuais. Este método é avaliado através dos critérios denominados agregado e desagregado. O critério agregado avalia bioequivalência através de uma medida composta por uma combinação da diferença entre as médias das formulações teste e referência, da interação da formulação com o indivíduo e das variabilidades intra-individuais. Já o método desagregado avalia cada uma dessas medidas separadamente. O segundo método avalia a probabilidade de que a diferença em biodisponibilidade de um indivíduo que recebe formulação referência em um período e teste em outro está dentro de um limite definido por critérios apropriados.

No critério agregado baseado em momentos, muitas vezes a distribuição do estimador resultante é muito complicada ou intratável matematicamente, e então nem sempre é possível encontrar soluções analíticas para o teste de hipóteses. Uma possibilidade é a utilização do método *bootstrap*, que é uma

técnica de reamostragem em que a partir de uma amostra coletada na população são obtidas diversas amostras que são utilizadas para estimar parâmetros e construir intervalos de confiança.

A seguir serão resumidas as principais informações técnicas sobre cada tipo de avaliação de bioequivalência. Mais detalhes podem ser encontrados em *Chow; Liu (2000)*, *Hauschke et al. (2007)* e no Volume 19, do periódico *Statistics in Medicine* de 2000, que é dedicado a artigos relacionados à bioequivalência individual.

2.4.1 Bioequivalência Média

A análise estatística para ASC e C_{max} é em geral baseada em procedimentos paramétricos. Quando clinicamente relevante T_{max} também deve ser considerado e será analisado através da construção de um intervalo de confiança, utilizando-se um método não paramétrico. A decisão a respeito da bioequivalência média pode ser avaliada através de intervalo de confiança ou teste de hipóteses (há equivalência entre os dois procedimentos), como comentado a seguir.

Intervalo de confiança

Se um intervalo com $100(1 - 2\alpha)\%$ de confiança para a diferença ($\mu_T - \mu_R$) ou para a razão (μ_T/μ_R) está dentro dos limites de bioequivalência estabelecidos, então a conclusão é que as formulações são bioequivalentes. O nível de confiança utilizado normalmente é de 90%.

Os limites de bioequivalência para a diferença e para a razão das médias na escala original e logarítmica são mostrados na Tabela 2.10, onde μ representa a média aritmética e $\tilde{\mu}$ a média geométrica.

Tabela 2.10: Intervalos de bioequivalência baseados na média aritmética ou média geométrica para a medida farmacocinética na escala original ou na escala logarítmica

Escala	Variável	Diferença	Razão
		$\theta_l < \mu_T - \mu_R < \theta_s$	$\delta_l < \mu_T / \mu_R < \delta_s$
Original	Y	$-0,2\bar{y}_R < \mu_T - \mu_R < 0,2\bar{y}_R$	$0,80 < \mu_T / \mu_R < 1,20$
			$0,80 < \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R < 1,25$
Logarítmica	$Y^* = \ln(Y)$	$-0,2231 < \mu_T^* - \mu_R^* < 0,2231$	

Teste de Schuirmann

Seguindo *Schuirmann* (1981,1987) o teste de bioequivalência é baseado em duas hipóteses unilaterais:

$$\begin{aligned} H_0^+ : \mu_T - \mu_R \leq \theta_I \quad \text{vs} \quad H_a^+ : \mu_T - \mu_R > \theta_I \\ H_0^- : \mu_T - \mu_R \geq \theta_S \quad \text{vs} \quad H_a^- : \mu_T - \mu_R < \theta_S \end{aligned} \quad (2.24)$$

onde θ_I e θ_S são os limites inferior e superior de bioequivalência, respectivamente. Concluímos pela bioequivalência média quando as duas hipóteses nulas são rejeitadas.

Teste Não-Paramétrico

Os critérios apresentados acima só são válidos sob a suposição de normalidade dos dados na escala logarítmica ou equivalentemente que os dados na escala original tenham distribuição log-normal. Se esta suposição é violada é recomendado o uso do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney descrito em *Chow; Liu* (2000).

2.4.2 Bioequivalência Populacional

Critério agregado baseado em momentos

Para avaliar bioequivalência populacional utilizando o critério agregado baseado em momentos, considere o parâmetro

$$\Theta_{mon} = \frac{E(Y_R - Y_T)^2 - E(Y_R - Y_R')^2}{\max\{\sigma_0^2, \sigma^2\}}, \quad (2.25)$$

onde Y_T, Y_R e Y_R' denotam as biodisponibilidades para a formulação teste administrada uma vez e para a formulação referência administrada duas vezes em um delineamento replicado, $\sigma^2 = E(Y_R - Y_R')/2$. O FDA estabelece o valor de σ_0^2 em 0,04.

Como na avaliação de bioequivalência populacional $Y_R - Y_T$ e $Y_R - Y_R'$ referem-se às diferenças inter-individuais, Y_T, Y_R e Y_R' podem ser considerados independentes. Então,

$$\begin{aligned} E(Y_R - Y_T)^2 &= E(Y_R^2) - 2E(Y_R Y_T) + E(Y_T^2) \\ &= (E(Y_R^2) - \mu_R^2) + (E(Y_T^2) - \mu_T^2) - 2E(Y_R Y_T) + \mu_R^2 + \mu_T^2 \\ &= \sigma_{BR}^2 + \sigma_{WR}^2 + \sigma_{BT}^2 + \sigma_{WT}^2 - 2\mu_R \mu_T + \mu_R^2 + \mu_T^2 \\ &= (\mu_R - \mu_T)^2 + \sigma_R^2 + \sigma_T^2 \end{aligned} \quad (2.26)$$

$$e \ E(Y_R - Y'_R)^2 = 2\sigma_R^2 \quad (2.27)$$

Observe que $\sigma_R^2 = \sigma_{BR}^2 + \sigma_{WR}^2$ e $\sigma_T^2 = \sigma_{BT}^2 + \sigma_{WT}^2$ denotam a variância total para as formulações referência e teste, respectivamente.

As seguintes hipóteses devem ser testadas:

$$H_0 : \Theta_{mon}^{pop} \geq \theta_{mon}^{pop} \text{ versus } H_1 : \Theta_{mon}^{pop} < \theta_{mon}^{pop}. \quad (2.28)$$

Dizemos que existe bioequivalência populacional entre as formulações teste e referência se

$$\hat{\Theta}_{mon}^{pop} = \frac{(\hat{\mu}_R - \hat{\mu}_T)^2 + \hat{\sigma}_R^2 - \hat{\sigma}_T^2}{\max\{\sigma_0^2, \hat{\sigma}_R^2\}} < \theta_{mon}^{pop}. \quad (2.29)$$

O parâmetro Θ_{mon}^{pop} é uma função não linear de $\mu_R - \mu_T$ e os componentes de variância e θ_{mon}^{pop} representa o limite superior pré-determinado para avaliar bioequivalência populacional. O FDA estabelece em 0,02 o valor máximo para a diferença das variâncias das formulações teste e referência, ou seja, $\sigma_R^2 - \sigma_T^2$.

Em geral, o nível de significância para o teste é de 5%, correspondendo a um intervalo bilateral com 90% de confiança ou a um intervalo unilateral com 95% de confiança para Θ_{mon}^{pop} . A hipótese nula é rejeitada se o limite superior é menor que θ_{mon}^{pop} . Como $\hat{\Theta}_{mon}^{pop}$ é uma medida não linear, é difícil obter sua distribuição exata analiticamente. Assim, procedimentos como o método de *bootstrap* são normalmente utilizados para construção destes intervalos de confiança.

Alguns autores sugerem ainda um procedimento paramétrico baseado na construção de intervalos de confiança aproximados para uma função linear dos componentes de variância. Este procedimento é baseado na desigualdade

$$(\hat{\mu}_R - \hat{\mu}_T)^2 + \hat{\sigma}_R^2 + \hat{\sigma}_T^2 - \hat{\sigma}_R^2 \theta_{mon}^{pop} < 0, \quad (2.30)$$

que pode ser reescrita como

$$\eta_{mon.ref}^{pop} = \delta^2 + \sigma_{UT}^2 + 0,5\sigma_{VT}^2 - (1 + \theta_{mon}^{pop})(\sigma_{UT}^2 + 0,5\sigma_{VT}^2) < 0, \quad (2.31)$$

onde $\delta^2 = \hat{\mu}_R - \hat{\mu}_T$, $\sigma_{Ul}^2 = 0,5(\sigma_l^2 + \text{cov}(Y_{1l}, Y_{2l}))$, $\sigma_{VT}^2 = \hat{\sigma}_l^2 - \text{cov}(Y_{1l}, Y_{2l})$, $l=R, T$. Y_{1l}, Y_{2l} denotam a biodisponibilidade do primeiro e segundo períodos em que a formulação l foi administrada.

Definimos então as hipóteses

$$H_0 : \eta_{mon.ref}^{pop} \geq 0 \text{ versus } H_0 : \eta_{mon.ref}^{pop} < 0. \quad (2.32)$$

Conclui-se que há bioequivalência populacional se a hipótese nula é rejeitada com 100 α % de significância.

2.4.3 Bioequivalência Individual

Critério agregado baseado em momentos

Para avaliar bioequivalência individual utilizando o critério baseado em momentos considere novamente o parâmetro em (2.4). Assumindo um delineamento *cross-over* replicado e o modelo de efeitos mistos em (2.23) tal que $\sigma^2 = E(Y_R - Y_T)^2$ denota a variância da formulação referência. Aqui Y_T , Y_R e Y_R' não podem ser assumidos como independentes e os termos de variância se tornam mais complexos. Denotamos por $\sigma_D^2 = \sigma_{BT}^2 + \sigma_{BR}^2 - 2\rho\sigma_{BT}\sigma_{BR}$ a interação do indivíduo com a formulação. Então,

$$\begin{aligned} E(Y_R - Y_T)^2 &= \text{Var}(Y_R - Y_T) + (E(Y_R - Y_T))^2 \\ &= \text{Var}(Y_R) + \text{Var}(Y_T) - 2\text{Cov}(Y_R, Y_T) + (\mu_R - \mu_T)^2 \\ &= (\mu_R - \mu_T)^2 + \sigma_{BR}^2 + \sigma_{WR}^2 + \sigma_{BT}^2 + \sigma_{WT}^2 - 2\rho\sigma_{BR}\sigma_{BT} \\ &= (\mu_R - \mu_T)^2 + \sigma_{WR}^2 + \sigma_{WT}^2 + \sigma_D^2 \end{aligned} \quad (2.33)$$

$$\text{e } E(Y_R - Y_R')^2 = 2\sigma_{WR}^2 \quad (2.34)$$

As seguintes hipóteses devem ser testadas:

$$H_0 : \Theta_{mon}^{ind} \geq \theta_{mon}^{ind} \text{ versus } H_1 : \Theta_{mon}^{ind} < \theta_{mon}^{ind}. \quad (2.35)$$

Logo, podemos dizer que existe bioequivalência individual entre as formulações teste e referência se

$$\hat{\Theta}_{mon}^{ind} = \frac{(\hat{\mu}_R - \hat{\mu}_T)^2 + \hat{\sigma}_D^2 + \hat{\sigma}_{WR}^2 + \hat{\sigma}_{WT}^2}{\max\{\sigma_{W0}^2, \hat{\sigma}_{WR}^2\}} < \theta_{mon}^{ind} \quad (2.36)$$

onde θ_{mon}^{ind} representa o limite superior de bioequivalência individual.

Em geral, o nível de significância para o teste é 5%, correspondendo a um intervalo bilateral com 90% de confiança ou a um intervalo unilateral com 95% de confiança para Θ_{mon}^{ind} . A hipótese nula é rejeitada se o limite superior é menor que θ_{mon}^{ind} . Como $\hat{\Theta}_{mon}^{ind}$ é uma medida não linear, é difícil obter sua distribuição exata analiticamente. Assim, procedimentos como o método de *bootstrap* são normalmente utilizados para construção destes intervalos de confiança.

Para avaliação da bioequivalência individual também foram propostos procedimentos paramétricos aproximados, que são baseados na desigualdade

$$(\hat{\mu}_R - \hat{\mu}_T)^2 + \hat{\sigma}_D^2 + \hat{\sigma}_{WR}^2 + \hat{\sigma}_{WT}^2 - \hat{\sigma}_{WR}^2 \theta_{mon}^{ind} < 0, \quad (2.37)$$

que pode ser reescrita como

$$\eta_{mon.ref}^{ind} = \delta^2 + \sigma_I^2 + 0,5\sigma_{WT}^2 - (1,5 + \theta_{mon}^{ind})\sigma_{WT}^2 < 0, \quad (2.38)$$

com $\delta^2 = \mu_R - \mu_T$ e $\sigma_I^2 = \hat{\sigma}_D^2 + 0,5\hat{\sigma}_{WT}^2 + \hat{\sigma}_{WR}^2$.

Definimos então as hipóteses

$$H_0 : \eta_{mon.ref}^{ind} \geq 0 \text{ versus } H_0 : \eta_{mon.ref}^{ind} < 0. \quad (2.39)$$

que podem ser testadas através da construção de intervalo de confiança para $\eta_{mon.ref}^{ind}$.

2.5 Determinação do poder e número de voluntários

A determinação do número de voluntários apropriado é uma parte crucial do projeto do estudo. Um estudo com poucos voluntários pode produzir resultados não conclusivos. Por outro lado, utilizar um número de voluntários muito grande seria usar recursos desnecessários.

O número de voluntários em um estudo de bioequivalência depende basicamente do poder do teste, do nível de significância e da variabilidade do fármaco. A Resolução N° 1170 (ANVISA, 2006) regulamenta que não é permitida a utilização de um número de voluntários inferior a 12. No entanto, é importante lembrar que o protocolo deverá também conter um número suficiente de voluntários, prevendo inclusive eventuais desistências durante a realização do experimento (*dropouts*). O número de voluntários pode ser obtido através do coeficiente de variação (CV) de estudo piloto ou estudos anteriores encontrados na literatura de forma que garanta a confiabilidade necessária na análise dos

resultados. Na falta de dados relativos ao coeficiente de variação do fármaco, a ANVISA determina que sejam recrutados pelo menos 24 voluntários.

Vários autores desenvolveram trabalhos a respeito do cálculo do número de voluntários necessários para delineamentos *cross-over*. *Siqueira et al.* (2005) comparam nove métodos para cálculo do número de voluntários para delineamentos *cross-over* 2x2. O critério para avaliar bioequivalência foi baseado no procedimento de teste de Schuirmann (ou equivalentemente no uso de intervalo de confiança para a diferença das médias na escala logarítmica) e em três distribuições de probabilidade: t de Student não central, t de Student central e Normal. No presente trabalho, apresentaremos um estudo semelhante para delineamentos *cross-over* de ordem maior que 2x2.

Considerando a comparação de duas formulações, *Chen et al.* (1997) desenvolvem fórmulas aproximadas para o cálculo do número de voluntários baseado no procedimento de teste de Schuirmann para os dados na escala original e na escala logarítmica. Neste estudo é utilizada a distribuição t de Student central e são considerados quatro delineamentos diferentes. *Wang; Chow* (2002) demonstram o cálculo do poder para estudos de bioequivalência média baseados no procedimento de teste de Schuirmann com delineamento *cross-over* 2x2m, quando $m = 1$ significa *cross-over* 2x2, $m = 2$ *cross-over* 2x4 e assim por diante. É feita uma comparação entre o cálculo do poder baseado no modelo de análise de variância tradicional e no modelo de efeitos mistos. Foram utilizadas a distribuição t de Student não central e a aproximação através da distribuição Normal. *Zhou et al.* (2005) apresentam uma macro desenvolvida no pacote estatístico SAS para calcular o poder empírico para delineamento *cross-over* de ordem maior que 2x2 em estudos de bioequivalência usando simulação de Monte Carlo.

Na comparação de mais de duas formulações, *Qu; Zheng* (2003) fornecem duas formas aproximadas que permitem dimensionar a amostra utilizando os métodos e pacotes estatísticos disponíveis para o cálculo do número de voluntários para delineamentos *cross-over* 2x2, como o nQuery Advisor®.

É importante lembrar que um estudo de bioequivalência leva em consideração pelo menos duas medidas farmacocinéticas (ASC e C_{max}). Assim, o cálculo do número de voluntários deve ser feito para cada medida e o número de voluntários deve ser o maior deles (em geral baseado em C_{max}).

2.5.1 Bioequivalência Média

Chow; Wang (2002) consideram um delineamento *cross-over* 2x2m para estudar o efeito do aumento do número de períodos em um delineamento *cross-over* para avaliação de bioequivalência média. Desenvolveram fórmulas e aproximações para o cálculo do poder do teste de Schuirmann e do número de voluntários necessário no estudo. Nesta Seção é apresentada uma ampliação do estudo realizado

por *Chow; Wang* (2002) para os delineamentos apresentados na Seção 2.1.2. Para isso, são considerados os delineamentos (d), os graus de liberdade do teste de Schuirmann correspondentes (v_d) e o fator que determina a variância de cada delineamento (f_d) apresentados no Quadro 2.4. Além disso, os desenvolvimentos serão restritos ao caso especial de estudos balanceados, isto é, com o mesmo número de voluntários (n) para todas as seqüências em todos os delineamentos.

Quadro 2.4: Graus de liberdade (v_d) e fator indicador de variabilidade (f_d) para vários delineamentos *cross-over*

Número de formulações	Delineamento (d)	<i>Cross-over</i>	v_d	f_d
2	1	2x2	$2n-2$	1
2	2	4x2	$2n-2$	1
2	3	4x2 ^c	$4n-3$	2
2	4	2x3	$4n-4$	3/4
2	5	2x4	$6n-4$	1/2
2	6	2x4 ^c	$6n-5$	11/20
2	7	4x4	$12n-5$	1/4
3	8	6x3	$12n-4$	1/3
3	9	6x3 ^c	$12n-6$	5/12
4	10	4x4	$12n-6$	1/2
4	11	4x4 ^c	$12n-9$	11/20

Subscrito c significa presença de efeito residual (*carry-over*)

Para cada delineamento existe um grau de liberdade associado, diferentemente do que foi descrito em *Chow; Wang* (2002). Lá todos os delineamentos apresentavam grau de liberdade $2n - 2$ que é uma aproximação comumente utilizada na prática. Aqui, utilizaremos os valores exatos para os desenvolvimentos a seguir.

Para $d = 1, 2, \dots, 11$, o intervalo de confiança clássico com $100(1-2\alpha)\%$ de confiança para $\theta = \mu_T - \mu_R$, é dado por:

$$IC_{\theta}(1-2\alpha)_d = \hat{\theta} \pm t(\alpha, v_d) \sqrt{f_d \hat{\sigma}_e^2 / n}, \quad (2.40)$$

Em (2.40), $\hat{\theta}$ é o estimador da diferença das médias das formulações comparadas, $t(\alpha, v_d)$ o α -ésimo percentil da distribuição t de Student central com v_d graus de liberdade, f_d o fator que determina a variância do estimador $\hat{\theta}$, $\hat{\sigma}_e$ é o estimador da variabilidade inter-individual obtido na tabela de análise de variância e n o número de voluntários por seqüência.

Dizemos que as duas formulações são bioequivalentes se o $IC_{\theta}(1-2\alpha)_d$ está completamente dentro dos limites de bioequivalência (θ_l, θ_s) ou , de acordo com o procedimento de teste de Schuirmann, se

$$T_d^+ = \frac{\hat{\theta} - \theta_l}{\hat{\sigma}_e \sqrt{f_d/n}} > t(\alpha, \nu_d) \text{ e } T_d^- = \frac{\hat{\theta} - \theta_s}{\hat{\sigma}_e \sqrt{f_d/n}} < -t(\alpha, \nu_d) \quad (2.41)$$

Se o intervalo de bioequivalência é simétrico, ou seja $\theta_l = -\theta_s = \theta_\varepsilon$, então

$$T_d^+ = \frac{\hat{\theta} + \theta_\varepsilon}{\hat{\sigma}_e \sqrt{f_d/n}} > t(\alpha, \nu_d) \text{ e } T_d^- = \frac{\hat{\theta} - \theta_\varepsilon}{\hat{\sigma}_e \sqrt{f_d/n}} < -t(\alpha, \nu_d). \quad (2.42)$$

Sob a hipótese alternativa de que $|\mu_T - \mu_R| < \theta_\varepsilon$, tanto $\sqrt{n}(\hat{\theta} - \theta_\varepsilon)/\sqrt{f_d}\hat{\sigma}_e$ quanto $\sqrt{n}(\hat{\theta} + \theta_\varepsilon)/\sqrt{f_d}\hat{\sigma}_e$ seguem uma distribuição t não central com parâmetros de não centralidade

$$\text{dados respectivamente por } \delta_d^- = \frac{\sqrt{n}(\theta - \theta_\varepsilon)}{\sqrt{f_d}\sigma_e} \text{ e } \delta_d^+ = \frac{\sqrt{n}(\theta + \theta_\varepsilon)}{\sqrt{f_d}\sigma_e}.$$

Por definição, o poder para os dois testes t unilaterais de Schuirmann é

$$\text{Poder} = P(\text{Rejeitar } H_0^+ \text{ e } H_0^- \mid \theta) = P(\text{Concluir bioequivalência} \mid \theta)$$

Esta probabilidade pode ser calculada para qualquer valor de θ . Escolhendo θ_γ tal que $\theta_l < \theta_\gamma < \theta_s$, ou seja, θ_γ pertence à hipótese alternativa, o poder é

$$\begin{aligned} \text{Poder}_d &= P\left(\frac{\sqrt{n}(\theta_\gamma - \theta_\varepsilon)}{\sqrt{f_d}\hat{\sigma}_e} < -t_{\alpha, \nu_d} \text{ e } \frac{\sqrt{n}(\theta_\gamma + \theta_\varepsilon)}{\sqrt{f_d}\hat{\sigma}_e} > t_{\alpha, \nu_d}\right) \\ &= P\left(\frac{\sqrt{n}(\theta_\gamma - \theta_\varepsilon)}{\sqrt{f_d}\hat{\sigma}_e} < -t_{\alpha, \nu_d}\right) - P\left(\frac{\sqrt{n}(\theta_\gamma + \theta_\varepsilon)}{\sqrt{f_d}\hat{\sigma}_e} < t_{\alpha, \nu_d}\right) \\ &\quad + P\left(\frac{\sqrt{n}(\theta_\gamma - \theta_\varepsilon)}{\sqrt{f_d}\hat{\sigma}_e} > -t_{\alpha, \nu_d} \text{ e } \frac{\sqrt{n}(\theta_\gamma + \theta_\varepsilon)}{\sqrt{f_d}\hat{\sigma}_e} < t_{\alpha, \nu_d}\right) \end{aligned} \quad (2.43)$$

O último termo da probabilidade acima, pode ser reescrito como

$$\begin{aligned} &P\left(\frac{\sqrt{n}(\theta_\gamma - \theta_\varepsilon)}{\sqrt{f_d}\hat{\sigma}_e} > -t_{\alpha, \nu_d} \text{ e } \frac{\sqrt{n}(\theta_\gamma + \theta_\varepsilon)}{\sqrt{f_d}\hat{\sigma}_e} < t_{\alpha, \nu_d}\right) = \\ &= \left(\theta_\varepsilon - \frac{t_{\alpha, \nu_d}\hat{\sigma}_e}{\sqrt{n/f_d}} < \theta_\gamma < \frac{t_{\alpha, \nu_d}\hat{\sigma}_e}{\sqrt{n/f_d}} - \theta_\varepsilon\right) \end{aligned} \quad (2.44)$$

que é relativamente pequeno. Ignorando então, esta pequena probabilidade, o poder é aproximadamente

$$1 - \tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon - \theta_\gamma)}{\sqrt{f_d} \sigma_e} \right. \right) - \tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon + \theta_\gamma)}{\sqrt{f_d} \sigma_e} \right. \right) \quad (2.45)$$

onde $\tau_{v_d}(\cdot | \delta_d)$ representa a distribuição acumulada da função t não central com v_d graus de liberdade e parâmetro de não centralidade δ_d .

O número de voluntários necessários para atingir um poder de $1 - \beta$ pode ser obtido resolvendo a seguinte equação

$$1 - \tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon - \theta_\gamma)}{\sqrt{f_d} \sigma_e} \right. \right) - \tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon + \theta_\gamma)}{\sqrt{f_d} \sigma_e} \right. \right) \geq 1 - \beta \quad (2.46)$$

Observe que o lado esquerdo da equação acima é maior ou igual a

$$1 - 2\tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon - |\theta_\gamma|)}{\sqrt{f_d} \sigma_e} \right. \right) \quad (2.47)$$

$$\text{Assim, } 1 - 2\tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon - |\theta_\gamma|)}{\sqrt{f_d} \sigma_e} \right. \right) \geq 1 - \beta \quad (2.48)$$

$$\text{Então, } 2\tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon - |\theta_\gamma|)}{\sqrt{f_d} \sigma_e} \right. \right) \geq \beta \quad (2.49)$$

Então, uma aproximação conservadora para n pode ser obtida resolvendo

$$\tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon - |\theta_\gamma|)}{\sqrt{f_d} \sigma_e} \right. \right) \geq \frac{\beta}{2} \quad (2.50)$$

Entretanto, quando $\theta \neq 0$, a fórmula acima pode ser muito conservadora, pois quando $\theta \neq 0$,

$$\tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon - |\theta_\gamma|)}{\sqrt{f_d} \sigma_e} \right. \right) \quad (2.51)$$

é muito maior que $\tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon + |\theta_\gamma|)}{\sqrt{f_d} \sigma_\varepsilon} \right. \right)$. (2.52)

Alternativamente, o poder pode ser aproximado por

$$\tau_{v_d} \left(t_{\alpha, v_d} \left| \frac{\sqrt{n}(\theta_\varepsilon - |\theta_\gamma|)}{\sqrt{f_d} \sigma_\varepsilon} \right. \right) \geq \beta \quad (2.53)$$

Podemos calcular o número de voluntários de forma aproximada utilizando distribuições tais como a t de Student central e a normal.

A função de distribuição acumulada da distribuição t de Student não central pode ser aproximada pela função de distribuição acumulada da distribuição t de Student central da seguinte forma

$$\tau_{v_d}(x | \delta_d) \cong T_{v_d} \left(x \sqrt{1 + \frac{\delta_d^2}{v_d}} - \delta_d \sqrt{1 + \frac{x^2}{v_d}} \right), \quad (2.54)$$

onde v_d são os graus de liberdade e T a função de distribuição acumulada da distribuição t central.

Além disso, quando v_d é grande, o poder pode ser aproximado por

$$1 - T_{v_d}(t_{\alpha, v_d} - \delta_d^-) - T_{v_d}(t_{\alpha, v_d} - \delta_d^+). \quad (2.55)$$

A aproximação pra a distribuição Normal é dada por

$$\tau_{v_d}(x | \delta_d) \cong \Phi \left(\frac{x - \delta_d}{\sqrt{1 + x^2/2v_d}} \right), \quad (2.56)$$

onde Φ é a função de distribuição acumulada da distribuição Normal padrão.

Então, quando v_d é grande, o poder também pode ser aproximado por

$$1 - \Phi(z_\alpha - \delta_d^-) - \Phi(z_\alpha - \delta_d^+). \quad (2.57)$$

Como já foi dito, estas aproximações permitem obter fórmulas para o cálculo do número de voluntários.

Utilizando a distribuição t de Student central temos

$$n_d \geq f_d \sigma_e^2 \left(\frac{t_{v_d,0}(\alpha) + t_{v_d,0}(\beta/2)}{\theta_\varepsilon - |\theta_\gamma|} \right)^2, \text{ para a aproximação conservadora e} \quad (2.58)$$

$$n_d \geq f_d \sigma_e^2 \left(\frac{t_{v_d,0}(\alpha) + t_{v_d,0}(\beta)}{\theta_\varepsilon - |\theta_\gamma|} \right)^2, \text{ para a aproximação não conservadora} \quad (2.59)$$

Para a distribuição Normal o número de voluntários é dado por

$$n_d \geq f_d \frac{(z_\alpha + z_{\beta/2})^2 \sigma_e^2}{(\theta_\varepsilon - |\theta_\gamma|)^2}, \text{ para a aproximação conservadora e} \quad (2.60)$$

$$n_d \geq f_d \frac{(z_\alpha + z_\beta)^2 \sigma_e^2}{(\theta_\varepsilon - |\theta_\gamma|)^2}, \text{ para a aproximação não conservadora} \quad (2.61)$$

2.5.1.1 Aproximação para os delineamentos de Williams

Qu (2003) apresenta dois métodos conservadores para o cálculo aproximado do número de voluntários para os delineamentos de Williams, assumindo que não existe efeito residual (*carry-over*), para os dados na escala logarítmica. Apresentamos a seguir os principais pontos abordados no artigo para a determinação do número de voluntários por seqüência (n), em um estudo realizado em J períodos e K seqüências, tal que $N = Kn$ é o número total de voluntários.

Seja θ a diferença entre as médias populacionais de duas formulações utilizada para o cálculo do número de voluntários, θ_l e θ_s os limites de bioequivalência e σ_e^2 a variância intra-individual.

Seja $\hat{\theta}$ o estimador de mínimos quadrados de θ , α o nível de significância, $t_{\alpha,v}$ o α -ésimo percentil da distribuição t de Student com v graus de liberdade, e χ_v^2 o α -ésimo percentil da distribuição qui-quadrado com v graus de liberdade.

O poder do teste para demonstrar bioequivalência média é igual a

$$P \left[\frac{\hat{\theta} - \theta_l}{\sigma_e \sqrt{2/N}} / \sqrt{\chi_v^2/v} > t_{\alpha,v}, \frac{\hat{\theta} - \theta_s}{\sigma_e \sqrt{2/N}} / \sqrt{\chi_v^2/v} < -t_{\alpha,v} \mid \theta, \sigma_e \right] \quad (2.62)$$

Para um delineamento *cross-over* 2x2, $v = (N-2)$ e o cálculo do número de voluntários pode ser feito usando por exemplo o pacote estatístico *nQuery Advisor*. Para delineamentos *cross-over* de ordem maior, *Qu* (2003) apresenta as duas seguintes aproximações conservadoras para o cálculo do número de voluntários baseado naquele para o *cross-over* 2x2.

Aproximação σ^*

Seja $N^* = (J-1)N - 2(J-2)$ e $\sigma^* = \sigma_e \sqrt{J-1}$. Como $\sqrt{N^*/N} = \sqrt{J-1}$, a equação (2.62) é aproximadamente:

$$P \left[\frac{\hat{\theta} - \theta_l}{\sigma^* \sqrt{2/N^*}} / \sqrt{\chi_{N^*-2}^2 / (N^* - 2)} > t_{\alpha, N^*-2}, \frac{\hat{\theta} - \theta_s}{\sigma^* \sqrt{2/N^*}} / \sqrt{\chi_{N^*-2}^2 / (N^* - 2)} < -t_{\alpha, N^*-2} \mid \theta, \sigma_e \right] \quad (2.63)$$

que tem a mesma forma do poder para o delineamento *cross-over* 2x2.

Resultados existentes em tabelas e/ou pacotes estatísticos podem ser usados para encontrar N^* e em seguida o número de voluntários requerido $N = [N^* + 2(J-2)] / (J-1)$.

Esta aproximação transforma σ_e em σ^* através da multiplicação do fator $\sqrt{J-1}$. Quando o valor de σ_e não é pequeno, σ^* pode estar fora dos valores utilizados nos resultados encontrados em tabelas que abrange normalmente valores entre 0,05 e 0,30. Quando isto acontece, a aproximação N^* a seguir, pode ser utilizada.

Aproximação N^*

Esta aproximação ignora a diferença dos graus de liberdade entre um delineamento 2x2 e um delineamento de ordem maior e substitui N^* por N , ou seja, substitui v por $N-2$ na equação (2.62). Embora introduzido formalmente em *Qu* (2003), este método sempre foi utilizado na prática. Como $t_{\alpha, N-2} \geq t_{\alpha, v}$ e $E[\chi_{N-2}^2 / (N-2)] = E[\chi_v^2 / v] = 1$ isto leva a uma probabilidade menor. Então o número de voluntários resultante é uma aproximação conservadora. Intuitivamente, substituindo N^* ($>N$) por N para ignorar os graus de liberdade extras resultante da ordem maior que 2 temos uma perda de informação.

O número de voluntários é sempre superestimado em 2 ou 3 indivíduos por seqüência. Com 4 ou mais indivíduos por seqüência a aproximação funciona bem.

2.5.2 Bioequivalência Populacional e Individual

Baseado em análise assintótica, *Chow et al.* (2003) obtiveram a seguinte fórmula para o número de voluntários para avaliação de bioequivalência populacional assumindo *cross-over* 2x2 balanceado ($n_1 = n_2 = n$):

$$n = \frac{\xi(z_{0,05} + z_{\beta})^2}{\lambda^2}, \text{ onde}$$

- $\lambda = \delta^2 + \sigma_{TT}^2 - \sigma_{TR}^2 - \theta_{PBE} \max\{\sigma_0^2, \sigma_{TR}^2\}$,
- θ_{PBE} é uma constante especificada pelo FDA,
- $\delta = (\bar{y}_{11} - \bar{y}_{12} + \bar{y}_{21} + \bar{y}_{22})/2$,
- $\xi = 2\delta^2 \sigma_{1,1}^2 + \sigma_{TT}^4 + (1-a)^2 \sigma_{TR}^4 - 2(1+a)\rho^2 \sigma_{BT}^2 \sigma_{BR}^2$,
- $\sigma_{1,1}^2 = \sigma_D^2 + \sigma_{WT}^2 + \sigma_{WR}^2$.

$\delta, \sigma_{1,1}^2, \sigma_{TT}^2, \sigma_{TR}^2, \sigma_{BT}^2, \sigma_{BR}^2$ e ρ são os valores iniciais, $a = \theta_{PBE}$ se $\hat{\sigma}_{TR}^2 \geq \sigma_0^2$ e $a = 0$ se $\hat{\sigma}_{TR}^2 < \sigma_0^2$.

O número de voluntários para o método de bioequivalência individual é obtido através de métodos interativos que podem ser obtidos em *Chow et al.* (2003).

2.6 Identificação e tratamento de não conformidades

2.6.1 Dados faltantes

Algumas vezes pode ocorrer perda de dados em estudos de bioequivalência, por exemplo, quando a pessoa responsável pela coleta da amostra sanguínea de um voluntário não consegue coletar em determinado tempo de coleta devido a problemas operacionais como perda da veia, ou ainda o material pode ser perdido durante o armazenamento ou análise em laboratório, por quebra de tubos ou acondicionamento inadequado.

Quando isto ocorre é preciso utilizar ferramentas adequadas para analisar os dados para não inviabilizar o estudo e ao mesmo tempo garantir qualidade dos resultados apresentados.

De acordo com o Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência (ANVISA,2002) a curva de concentração sanguínea deve ser obtida sem a interpolação do ponto faltante, o que não compromete a obtenção das medidas farmacocinéticas como área sob a curva de zero ao último tempo

de coleta, e a área sob a curva de zero a infinito. Por outro lado, a presença de uma amostra faltante próxima à concentração máxima pode vir a comprometer a realidade desta variável (C_{max}). De qualquer forma, devem sempre ser considerados os valores que de fato foram quantificados, não devendo existir nenhum tipo de procedimento para a estimação dos valores faltantes.

A Resolução N° 1170 (ANVISA, 2006) regulamenta que se deve justificar qualquer perda de amostra e que não será permitida a exclusão de mais de 5% dos voluntários que participaram do estudo até a sua conclusão ou a falta de mais de 10% dos valores das concentrações sanguíneas do fármaco provenientes da administração de cada medicamento por voluntário.

Donner et al (2005) analisam o impacto de dados faltantes na curva de concentração versus tempo em estudos de bioequivalência média com delineamento *cross-over* 2x2. Primeiro pesquisaram o nível de cobertura do intervalo bilateral de 90% de confiança para a razão das médias geométricas. Depois foi examinado o efeito de perfis incompletos na probabilidade de se concluir bioequivalência usando dois testes t unilaterais. Os perfis incompletos apresentados em *Doner et al* (2005) são:

1. Aleatório: perda completamente aleatória, isto é, que ocorre por razões não relacionadas à biodisponibilidade, ou de forma mais geral, a nenhum aspecto do delineamento do estudo;
2. Início: perda nos primeiros m pontos, t_1, t_2, \dots, t_m ;
3. Centro: perda nos pontos próximos ao T_{max} e nos $(m - 1)/2$ valores de t imediatamente antes e depois deste ponto;
4. Final: perda nos últimos m pontos, $t_k, t_{k+1}, \dots, t_{k-m+1}$.

Em estudo de simulação *Doner et al* (2005) constataram que o impacto de dados faltantes no intervalo com 90% de confiança pode ser problemático mesmo para poucos dados faltantes, principalmente se os pontos estiverem próximos ao final do cronograma de coleta.

2.6.2 Observações atípicas (Outliers)

De acordo com o Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência (ANVISA,2002) existem basicamente três possíveis tipos de *outliers* nos estudos de bioequivalência:

1. Valores inesperados na curva de concentração plasmática versus tempo, para determinados tempos de coleta.

Rodda (1986) indicou que este tipo de *outlier* normalmente tem um efeito pequeno sobre o cálculo de ASC.

2. Valores extremamente altos ou baixos para determinada formulação (teste ou referência) em um mesmo voluntário.

Significa que a distância entre os valores da medida farmacocinética para o medicamento teste e o medicamento referência de um determinado indivíduo é muito grande. Tem um grande impacto na avaliação de bioequivalência média, pelo fato da média ser um estimador muito sensível à presença de valores extremos.

3. Indivíduos incomuns que exibem biodisponibilidade muito inferior ou muito superior aos demais, ou seja, uma diferença muito grande para o comportamento da curva nas duas formulações, implicando em valores diferenciados para todas as medidas farmacocinéticas avaliadas.

Este último pode vir a anular a conclusão de bioequivalência do estudo. A constatação de biodisponibilidades extremamente baixas, ou extremamente altas entre os voluntários, pode vir a indicar que a variabilidade da resposta a alguma das formulações não é homogênea.

A regulação brasileira preconiza que no caso de voluntários que apresentem comportamento discrepante nos parâmetros farmacocinéticos, em relação aos demais voluntários, sua exclusão do estudo deverá ser justificada. Deverão ser apresentados os resultados do estudo com e sem a inclusão de seus dados (Resolução N^o 1170, ANVISA, 2006). Isso significa que a retirada do voluntário deve ser muito bem avaliada. A evidência estatística de que as medidas apresentadas são discrepantes não é argumento suficiente uma vez que essa discrepância pode ser resultado de fracasso da formulação testada e não um desvio de protocolo como resultado de erros laboratoriais, erros de transcrição, ou outras causas não relacionadas à bioequivalência. Os estudos de bioequivalência média não são desenhados para distinguir as diferenças dos produtos em cada indivíduo e sim para comparar as médias das formulações (Patterson; Jones, 2006).

Existem diversos métodos para verificar a presença de observações atípicas em um estudo de bioequivalência. Um método gráfico utilizado é a plotagem dos valores da medida farmacocinética (ASC ou C_{max}) da formulação teste versus referência para cada indivíduo. Se apresentar um grande desvio em relação à reta $y = x$ o voluntário é provavelmente um *outlier*, ou as formulações testadas não são bioequivalentes. Outro método visual bastante utilizado é o gráfico do tipo *box-plot*.

Chow; Liu (2000) apresentam outras técnicas para detecção de dados discrepantes em estudos de bioequivalência: teste de distância da verossimilhança, teste da distância das estimativas e teste T^2 de Hotelling. *Ramsay; Elkum* (2005) comparam os três métodos apresentados acima e um quarto método desenvolvido por *Wang; Chow* (2003). Os quatro testes são apresentados de forma resumida no Quadro 2.5.

Quadro 2.5: Comparação dos testes para detecção de observações atípicas apresentados em Ramsay; Elkum (2005)

Teste	Referência* (ano)	Suposições	Estatística de teste	Condição para ser outlier
Distância da verossimilhança	<i>Chow e Tse</i> (1990)	Efeitos de período e formulação nulos.	$LD_i(\hat{\theta}) = 2[L(\hat{\theta}) - L(\hat{\theta}_{-i})]$, onde $\theta = (\mu, \sigma_e^2, \sigma_s^2 + f\sigma_s^2)$ e $L(\cdot)$ é a função de verossimilhança.	$LD_i(\hat{\theta}) > \chi_3^2(\alpha)$
Distância das estimativas	<i>Chow e Tse</i> (1990)	Efeitos de período e formulação nulos.	$ED_i(\hat{\theta}) = f^2(\hat{\theta} - \hat{\theta}_{-i})' \hat{\Sigma}^{-1}(\hat{\theta} - \hat{\theta}_{-i})$, onde f é o número de formulações e $\hat{\Sigma}^{-1}$ é o EMV da matriz de variância $\Sigma = \begin{bmatrix} \frac{\theta_3}{n} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{2\theta_3^2}{(n-1)} & 0 \\ 0 & 0 & 2\theta_3^2 \end{bmatrix}$	$ED_i(\hat{\theta}) > \chi_3^2(\alpha)$ $\chi_3^2(\alpha)$ é o $(1-\alpha)$ -ésimo percentil da distribuição χ_3^2 com 3 graus de liberdade.
T² de Hotelling	<i>Liu e Wang</i> (1991)	Não há efeito de período, estrutura de covariância esférica, existe apenas um outlier.	$T_i^2 = \frac{(n-2)D_i^2}{(n-1) - D_i^2}$, onde $D_i^2 = (Y_i - \bar{Y})' A^{-1}(Y_i - \bar{Y})$ e \bar{Y} e A são a média amostral e a matriz da soma de quadrados e produtos cruzados obtidas de $Y_1 \dots Y_n$.	$T_i^2 = \max_j(T_j^2) > T_{(\alpha)}^2$ $T_{(\alpha)}^2$ é o $(1-\alpha)$ -ésimo percentil da distribuição do máximo de T_i^2 .
Mean-Shift Test	<i>Wang e Chow</i> (2003)	Modificação do teste de distância da verossimilhança, em que λ_j representa o efeito que desloca a média no modelo $y_{ij} = \mu + S_i + F_j + \lambda_j \delta_{ij} + e_{ij}$	$D_i = nT_{1n} + nT_{2n}$, onde $T_{1n} = \frac{(e_i - \bar{e}_i 1)'(e_i - \bar{e}_i 1)}{\sum_s (e_s - \bar{e}_s 1)'(e_s - \bar{e}_s 1)}$ e $T_{2n} = \frac{\bar{e}_i^2}{\sum_s \bar{e}_s^2}$	Baseado na soma de duas distribuições Beta.

* Fonte de todas as referências: Ramsay; Elkum (2005).

Detalhes sobre os métodos e o estudo realizado podem ser obtidos em *Ramsay; Elkum (2005)* que concluíram, após estudos de simulação, que o teste da distância das estimativas para a detecção de observações atípicas é notavelmente superior aos outros três testes em estudos de bioequivalência média com delineamento *cross-over 2x2*.

2.7 Exemplos

Nesta seção serão apresentados exemplos que ilustram a avaliação de bioequivalência média, populacional e individual para delineamentos do tipo *cross-over* de ordem maior que 2×2 .

Exemplo 1 – Avaliação de bioequivalência média, populacional e individual.

Hauschke et al (2007) descrevem um estudo sobre anti-hipertensivos cujo delineamento foi um *cross-over* com quatro períodos e duas seqüências e que teve a participação de 37 voluntários. O delineamento e o número de voluntários por seqüência estão indicados a seguir.

Seqüência	Número de voluntários	Período			
		1°	2°	3°	4°
1	18	T	R	R	T
2	19	R	T	T	R

Será ilustrada a aplicação do método baseado em momentos que é recomendado pelo FDA para avaliação de bioequivalência populacional e individual, além da tradicional bioequivalência média.

A análise foi feita na escala logarítmica e a Tabela 2.11 resume os resultados já re-transformados usando a função exponencial. A conclusão é que existe bioequivalência média em relação à *ASC* pois o intervalo com 90% de confiança para a razão das médias está dentro do intervalo de bioequivalência (0,80; 1,25). Já em relação ao C_{max} , o intervalo com 90% de confiança não está completamente dentro dos limites de bioequivalência pois o limite inferior do intervalo é menor que o limite de bioequivalência 0,80.

Para avaliar bioequivalência populacional e individual temos apenas o limite superior, uma vez que, de acordo com o critério linear, concluímos por bioequivalência populacional e individual se os correspondentes limites superiores são menores que zero. Assim, para este conjunto de dados podemos concluir que existe bioequivalência populacional para as duas medidas, pois o limite superior é menor que zero nos dois casos. Já os limites superiores utilizados na avaliação de bioequivalência individual, tanto para *ASC* quanto para C_{max} , são maiores que zero. Portanto não podemos concluir que existe

bioequivalência individual para as duas formulações. Isto provavelmente se deve à grande interação do indivíduo com a formulação ($\sigma_D^2 > 0,15$), constatada no conjunto de dados.

Tabela 2.11: Resultados da avaliação dos três tipos de bioequivalência

Bioequivalência	Característica farmacocinética	Estimação pontual	Limites de 90% de confiança		Conclusão sobre bioequivalência
			Inferior	Superior	
Média	ASC	0,959	0,867	1,061	Sim
	C _{max}	0,900	0,796	1,017	Não
Populacional	ASC	-0,687		-0,271	Sim
	C _{max}	-0,997		-0,434	Sim
Individual	ASC	-0,085		0,271	Não
	C _{max}	-0,199		0,407	Não

Exemplo 2 – Comparação do número de voluntários necessários para um delineamento *cross-over* 2x4 e para o delineamento *cross-over* padrão 2x2

Chen *et al.* (1999) comparam o número de voluntários necessários para o delineamento *cross-over* 2x4 para avaliação de bioequivalência individual e o *cross-over* 2x2 na avaliação de bioequivalência média. O delineamento *cross-over* 2x4 é o (TRTR/RTRT) e o delineamento *cross-over* 2x2 é o (RT/TR). Variabilidade intra-individual é o desvio padrão na escala logarítmica, assumindo $\sigma_{WT} = \sigma_{WR}$, CV é o coeficiente de variação intra-individual na escala original e θ_{mon}^{ind} é aproximadamente 2,5.

Foram considerados poder de 80% e 90% e nível de significância 5%. O número de voluntários foi calculado para comparação de duas formulações com diferença entre as médias populacionais de 0,05. As variabilidades intra-individuais foram consideradas as mesmas para as duas formulações e não foi considerada a interação do indivíduo com a formulação. Foi considerado $\sigma_0^2 = 0,04$.

Os resultados foram resumidos em Chow; Liu (2000) e estão na Tabela 2.12.

Como esperado, o número de voluntários aumenta com o aumento da variabilidade intra-individual tanto para avaliação de bioequivalência média quanto individual. O número de voluntários necessários para avaliação de bioequivalência média continua aumentando com o aumento da variabilidade intra-individual. Por outro lado, o número de voluntários para avaliação de bioequivalência individual

atinge um limite quando a variabilidade intra-individual é 0,30. Isto ocorre provavelmente devido ao fato de $\hat{\Theta}_{mon}^{ind}$ ser uma função decrescente em relação à variabilidade intra-individual. O número de administrações necessárias para o delineamento *cross-over* 2x4 na avaliação de bioequivalência individual é mais de duas vezes aquele necessário para o delineamento *cross-over* 2x2 na avaliação de bioequivalência média quando o valor real da variabilidade intra-individual é menor ou igual a 0,30. Entretanto, a avaliação de bioequivalência individual parece considerar um número menor de voluntários para formulações com variabilidade intra-individual maior que 0,30.

Tabela 2.12: Número de voluntários necessários em bioequivalência individual e média para várias situações

Variabilidade intra-individual	CV	$\hat{\Theta}_{mon}^{ind}$	Poder	Bioequivalência individual	Bioequivalência média
0,15	15	0,106	80%	12	12
			90%	12	16
0,23	23	0,045	80%	24	24
			90%	32	32
0,30	31	0,026	80%	32	40
			90%	40 – 48	54
$\geq 0,50$	≥ 53	$\leq 0,0095$	80%	36	≥ 108
			90%	40 – 48	144

Fonte: *Chow;Liu* (2000)

2.8 Casos reais

O Quadro 2.6 apresenta o resumo de alguns estudos reais de bioequivalência com delineamentos de ordem maior que 2x2. Alguns deles serão apresentados a seguir com informações ainda mais detalhadas. Notamos que predomina a presença de voluntários do sexo masculino, o número de coletas varia entre 11 e 20 e o intervalo de coleta tem limite superior variando de 10 a 72h devido a meia vida variada das formulações estudadas. O intervalo entre os períodos (*washout*) quando informado, varia de 6 dias a 2 semanas.

Quadro 2.6: Informações sobre casos reais de estudos de bioequivalência média com delineamento *cross-over* de ordem maior que 2x2

Referência	Formulações	Voluntários	Cross-over	Nº de coletas (período)	Washout	Alguns resultados
<i>Meyer et al, 2000</i>	2 formulações Methylphenidate 20 mg	20 homens	4x4	13 (0 a 10h)	não informado	As formulações teste e referência são bioequivalentes.
<i>Dhawan et al, 2006</i>	4 formulações Glipizide 5mg	12 homens	4x4	11 (0 a 24h)	7 dias	Para a formulação com liberação imediata <i>C_{max}</i> foi maior ($p < 0,05$) que para as formulações com liberação estendida.
<i>Six et al, 2005</i>	4 formulações Itraconazol	4 homens e 4 mulheres	4x4	14 (0 a 72h)	2 semanas	A média da ASC após administração oral das formulações Sporanox® e HPMC foram semelhantes, já para as formulações Eudragit E100 e Eudragit E100-PVPVA64 a medida foi menor.
<i>Abdel-Rahman et al, 2003</i>	4 formulações Nizatidina	24 voluntários (homens e mulheres)	4x4	20 (0 a 24h)	não informado	As formulações líquidas de nizatidina demonstram farmacocinética similar à da cápsula.
<i>Gerloff et al, 1996</i>	3 formulações Lansoprasole	12 homens	2x3	20 (0 a 24h)	6 dias	Todos os voluntários completaram o estudo; não houve <i>dropouts</i> .

Caso 1 – Comparação da formulação de Nizatidina em cápsula com três formulações líquidas (*Abdel-Rahman et al, 2003*)

a) Formulações comparadas:

- Nizatidina oral 15-mg/mL (Lyne Laboratories Inc., Brockton, MA);
- Solução de nizatidina em suco de maçã (1,2 mg/mL), preparada com o conteúdo da cápsula de 150-mg de nizatidina (Axid Pulvule®) em 125 mL de suco de maçã;
- Suspensão de nizatidina em formulação infantil (15 mg/mL), preparada com o conteúdo da cápsula de 150-mg de nizatidina (Axid Pulvule®) em 10 mL de uma formulação infantil (Enfamil®)
- Cápsula de Axid® 150 mg.

b) Voluntários: Vinte e quatro voluntários adultos, homens e mulheres; idade: média = 31,2 anos e desvio-padrão = 7,5 anos; peso: média = 71,1 kg e desvio-padrão = 11,8 kg).

c) Delineamento: *Cross-over* 4x4.

d) Cronograma de coleta: Amostras foram obtidas nos tempos 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 horas após a administração do medicamento.

- e) *Washout*: não informado.
- f) Resultados: A nova formulação oral líquida de nizatidina demonstra uma farmacocinética similar à da cápsula. Isto poderá expandir a utilidade deste medicamento para pacientes com dificuldade de ingestão de sólidos. A Figura 2.2 apresenta a curva de concentrações médias ao longo do tempo (além da variação de ± 2 erros-padrão em torno das concentrações médias) para as três formulações líquidas comparadas à formulação em cápsula.

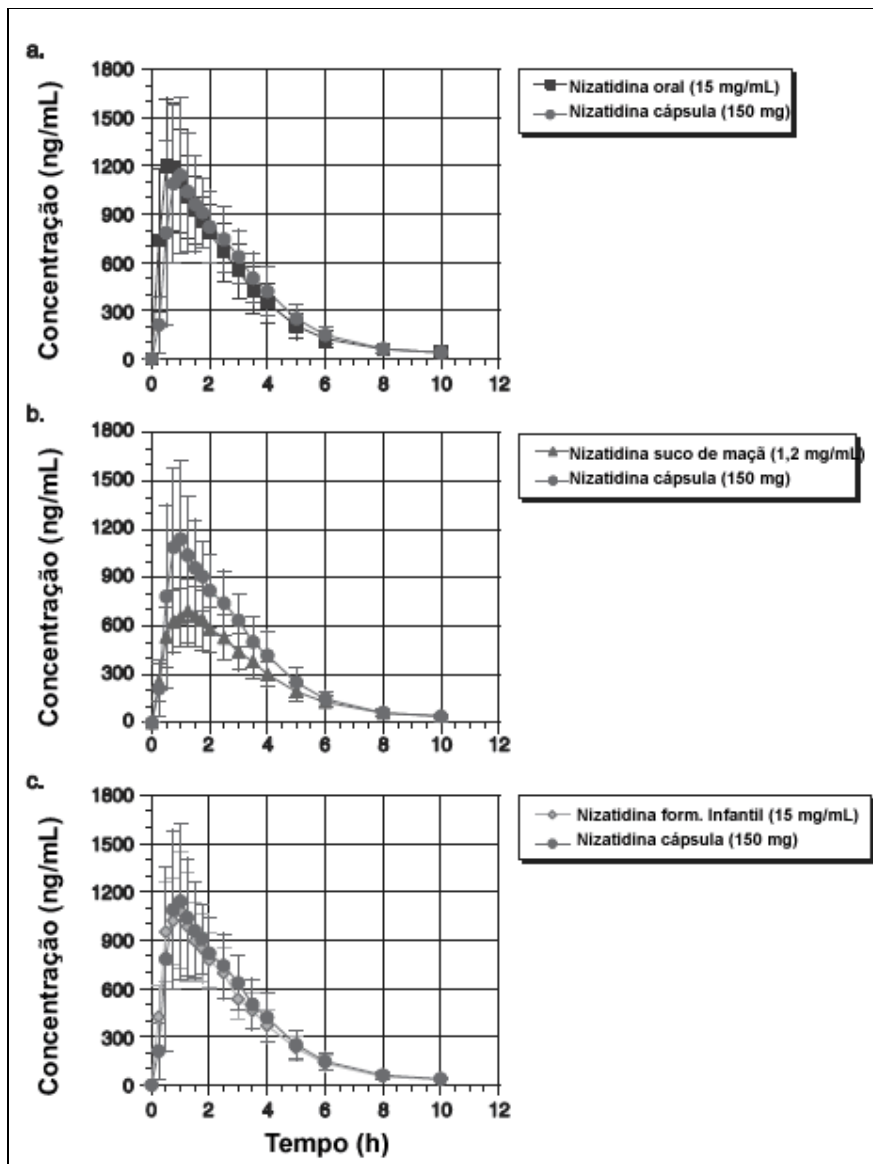


Figura 2.2 Curva de concentrações médias ao longo do tempo (± 2 erros-padrão em torno das concentrações médias) para as três formulações líquidas comparadas à formulação em cápsula.

Caso 2 – Farmacocinética e biodisponibilidade absoluta de três formulações de lansoprasole (*Gerloff et al*, 1996).

a) Formulações comparadas:

- Lansoprasole oral 15 mg;
- Lansoprasole oral 30 mg;
- Lansoprasole injetável 15 mg.

b) Voluntários:

- Não foi possível realizar cálculo do número de voluntários, pois não existiam dados disponíveis sobre a farmacocinética do lansoprasole.
- 12 voluntários sadios do sexo masculino, com idade entre 26 a 48 anos, peso entre 67 e 97 kg e altura entre 162 e 187 cm.
- Todos os voluntários completaram o estudo; não houve *dropouts*.

c) Delineamento: *Cross-over 2x3*.

d) Cronograma de coleta: 0, 5, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 105 minutos e 0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 e 24 horas após o início da infusão e na administração oral 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165 minutos e 0, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8, 10, 12 e 24 horas após a administração.

e) *Washout*: 6 dias.

f) Resultados: A Figura 2.3 apresenta a curva de concentrações médias (além da variação ± 2 erros-padrão em torno das concentrações médias) do lansoprasole para as três formulações estudadas.

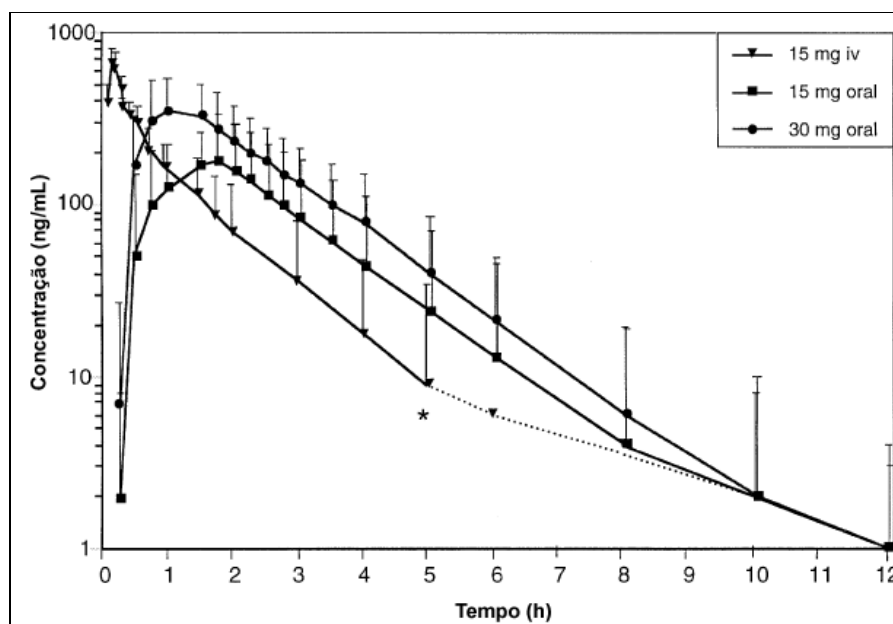


Figura 2.3 Curva de concentrações médias ao longo do tempo (± 2 erros-padrão em torno das concentrações médias) do lansoprasole para as três formulações estudadas.

2.9 Pacotes Estatísticos

Existem alguns pacotes estatísticos específicos para a análise de medidas farmacocinéticas e teste de bioequivalência. Nesta seção é feita uma breve descrição dos principais destacando suas características e limitações.

O pacote estatístico nQueryAdvisor® permite determinar o número de voluntários necessários para vários tipos de estudos, incluindo estudo de bioequivalência, fixado um poder ou ainda determinar o poder do teste correspondente a um número de voluntários fixado. Sua limitação é que os cálculos são realizados apenas para um delineamento *cross-over* 2x2.

O EquivTest™ é um pacote que fornece ao usuário ferramentas para análise de medidas farmacocinéticas, tais como construção da curva de concentração das respostas farmacocinéticas versus tempo de coleta, cálculo da área sob a curva referida, interpolação de dados faltantes, entre outras. Testes e intervalos de confiança para avaliar equivalência também podem ser obtidos. A limitação deste pacote estatístico é que não realiza análise para estudos de bioequivalência de ordem maior que 2x2.

Para realizar estudos de bioequivalência com delineamento *cross-over* de ordem maior que 2x2, existe no mercado o pacote WinNonLin®. Com ele é possível analisar estudos de bioequivalência com delineamentos *cross-over* replicados segundo os métodos de bioequivalência média, populacional e individual. Possui uma grande flexibilidade em relação à importação e exportação para outros pacotes estatísticos como SAS e SPLUS®.

3 Comparação dos Delineamentos

No intuito de comparar os delineamentos apresentados na Seção 2.1.2 foram calculados o número de voluntários, o poder do teste e o número de medidas para cada delineamento.

Foram fixados a diferença das médias populacionais das formulações, $\theta\gamma = 0,00, 0,05$ e $0,10$, o coeficiente de variação intra-individual, $CV = 0,10$ a $0,40$, poder de 80% e nível de significância de 5% . A variabilidade intra-individual (σ_e^*) na escala logarítmica foi calculada através da fórmula $\sigma_e^{2*} = \ln(CV^2 + 1)$. Os graus de liberdade e a variância dos estimadores são os apresentados no Quadro 2.4, onde podemos verificar que em relação à variância do estimador do efeito de formulação (θ) para comparação de duas formulações, temos, em ordem decrescente, os delineamentos:

1. *cross-over* 4x4,
2. *cross-over* 2x4,
3. *cross-over* 2x4 com *carry-over*,
4. *cross-over* 2x3,
5. *cross-over* 2x2,
6. *cross-over* 4x2,
7. *cross-over* 4x2 com *carry-over*.

Já em relação aos graus de liberdade para comparação de duas formulações, temos, em ordem decrescente, os delineamentos:

1. *cross-over* 2x2, *cross-over* 4x2 e *cross-over* 2x3,
2. *cross-over* 4x2 com *carry-over* e *cross-over* 2x4 com *carry-over*,
3. *cross-over* 2x4,
4. *cross-over* 4x4.

Para os delineamentos *cross-over* 2x3 e 4x4 a presença de efeito *carry-over* não modifica o cálculo do poder nem do número de voluntários uma vez que o efeito de formulação e o efeito *carry-over* são independentes. Já para os delineamentos *cross-over* 4x2 e 2x4 não há independência, assim, é possível calcular o poder e o número de voluntários de duas formas, com ou sem efeito *carry-over*. A diferença está nos graus de liberdade e na variância do estimador do efeito de formulação (θ). Além disso, para o

delineamento *cross-over* 2x2 não existe um estimador não viciado para o efeito de formulação na presença do efeito *carry-over* (que será denotado com o subscrito c).

Para comparação de três e quatro formulações apresentamos os delineamentos de Williams *cross-over* 6x3 e 4x4 que denotaremos por 4x4(4F) para diferenciar do delineamento utilizado na comparação de duas formulações apenas.

3.1 Número de voluntários

Com o objetivo de verificar a qualidade das aproximações conservadora e não conservadora e também as aproximações através das distribuições t de Student central e Normal definidas na seção 2.5.1, apresentamos na Tabela 3.1 o número total de voluntários (N) necessários em um estudo de bioequivalência média realizado com delineamento *cross-over* 2x4 considerando, além do método completo, as aproximações conservadora e não conservadora, assim como as distribuições t de Student não central, t de Student central e Normal. Foram fixados os valores para a diferença das médias populacionais das formulações (θ_γ), coeficiente de variação intra-individual CV , nível de significância de 5% e poder do teste que avalia a bioequivalência de 80%. O número total de voluntários (N) foi dividido igualmente entre as seqüências em todos os delineamentos.

Como esperado, à medida que θ_γ e a variabilidade aumentam, N também aumenta. Percebe-se que há variações entre os métodos: sistematicamente $N^1 \leq N^2 \leq N^3$ (1 = aproximação não conservadora, 2 = método completo e 3 = aproximação conservadora), bem como entre as distribuições (Normal \leq t de Student não central \leq t de Student central). Nota-se que quando $\theta_\gamma = 0,00$ a aproximação conservadora produz melhores estimativas que a não conservadora, principalmente com o aumento da variabilidade. Com o aumento de θ_γ a aproximação não conservadora torna-se mais adequada.

Comparados com a distribuição t de Student não central, os cálculos baseados na distribuição t de Student central e na distribuição Normal tendem a serem superestimados e subestimados, respectivamente. Estas diferenças são de no máximo um voluntário por seqüência.

Os resultados para os demais delineamentos demonstram o mesmo comportamento em relação às aproximações e podem ser vistos nas tabelas que encontram-se no ANEXO A.

Tabela 3.1: Número total de voluntários (N) obtido por meio de várias aproximações para o *cross-over* 2x4 em função da diferença das médias populacionais (θ_γ) e do coeficiente de variação (CV) (nível de significância = 5% e poder = 80%)

θ_γ	CV	σ_e^*	Distribuição								
			t não central			t central			Normal		
			N_{nc}^1	N_{nc}^2	N_{nc}^3	N_c^1	N_c^2	N_c^3	N_z^1	N_z^2	N_z^3
0,00	0,10	0,10	4	4	4	4	4	4	2	2	2
	0,12	0,12	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	0,14	0,14	6	6	4	6	6	4	4	4	4
	0,16	0,16	6	6	4	6	6	4	6	6	4
	0,18	0,18	8	8	6	8	8	6	6	6	4
	0,20	0,20	8	8	6	8	8	6	8	8	6
	0,22	0,22	10	10	8	10	10	8	10	10	6
	0,24	0,24	12	12	8	12	12	8	10	10	8
	0,26	0,26	12	12	10	12	12	10	12	12	10
	0,28	0,27	14	14	10	14	14	10	14	14	10
	0,30	0,29	16	16	12	16	16	12	16	16	12
	0,32	0,31	18	18	14	18	18	14	18	18	14
	0,34	0,33	20	20	16	20	20	16	20	20	14
	0,36	0,35	22	22	16	22	22	16	22	22	16
0,38	0,37	24	24	18	24	24	18	24	24	18	
0,40	0,39	28	28	20	28	28	20	26	26	20	
0,05	0,10	0,10	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	0,12	0,12	6	4	4	6	4	4	6	4	4
	0,14	0,14	8	6	6	8	6	6	6	6	6
	0,16	0,16	8	6	6	8	8	6	8	6	6
	0,18	0,18	10	8	8	10	8	8	10	8	8
	0,20	0,20	12	10	10	12	10	10	12	10	10
	0,22	0,22	16	12	12	16	12	12	14	12	10
	0,24	0,24	18	14	14	18	14	14	18	12	12
	0,26	0,26	20	16	14	20	16	16	20	14	14
	0,28	0,27	24	18	18	24	18	18	22	18	16
	0,30	0,29	26	20	20	26	20	20	26	20	18
	0,32	0,31	30	22	22	30	22	22	28	22	22
	0,34	0,33	32	24	24	32	24	24	32	24	24
	0,36	0,35	36	28	26	36	28	26	36	26	26
0,38	0,37	40	30	30	40	30	30	40	30	28	
0,40	0,39	44	32	32	44	34	32	44	32	32	
0,10	0,10	0,10	8	6	6	8	6	6	6	6	6
	0,12	0,12	10	8	8	10	8	8	10	6	6
	0,14	0,14	12	10	10	12	10	10	12	8	8
	0,16	0,16	16	12	12	16	12	12	16	12	12
	0,18	0,18	20	14	14	20	14	14	20	14	14
	0,20	0,20	24	18	18	24	18	18	24	18	18
	0,22	0,22	28	20	20	28	20	20	28	20	20
	0,24	0,24	34	24	24	34	24	24	32	24	24
	0,26	0,26	38	28	28	38	28	28	38	28	28
	0,28	0,27	44	32	32	44	32	32	44	32	32
	0,30	0,29	50	36	36	50	36	36	50	36	36
	0,32	0,31	56	42	42	56	42	42	56	40	40
	0,34	0,33	64	46	46	64	46	46	62	46	46
	0,36	0,35	70	52	52	70	52	52	70	50	50
0,38	0,37	78	56	56	78	56	56	78	56	56	
0,40	0,39	86	62	62	86	62	62	84	62	62	

1 - Aproximação conservadora, 2 - Método completo, 3 - Aproximação não conservadora

θ_γ = diferença das médias populacionais das formulações

CV = coeficiente de variação intra-individual (escala original)

σ_e^* = variabilidade intra-individual (escala logarítmica).

A Tabela 3.2 apresenta a comparação do número total de voluntários (N) necessários em um estudo de bioequivalência média para vários delineamentos considerando o método completo e a distribuição t de Student não central. O delineamento que exige maior número de voluntários para o poder fixo de 80% é o *cross-over* 4x2 que requer o dobro do número de voluntários do *cross-over* 2x2 e quatro vezes o número de voluntários do 2x4 ($\theta_7=0,05$ e $CV=0,38$). A diferença existente entre o número de voluntários para os diversos delineamentos aumenta com o aumento da variabilidade (CV). O delineamento *cross-over* 4x4(4F) requer menos voluntários que o 2x2 e mais que o 6x3.

Os cálculos feitos considerando a presença de efeito *carry-over* levam sempre a números de voluntários maiores em relação aos casos em que este efeito não é detectado. A diferença pode ser nula ($\theta_7=0,00$ e $CV \leq 0,24$), pequena em alguns casos (apenas 2 voluntários para o 2x4 quando $\theta_7=0,00$), mas pode quase dobrar (*cross-over* 4x2, $\theta_7=0,10$). É importante ressaltar que o efeito residual só poderá ser detectado após a realização do estudo. Se o estudo é bem planejado, com um período de eliminação (*washout*) adequado, é provável que este efeito seja nulo e portanto não seria necessário considerá-lo nos cálculos, por outro lado, considerar uma possível presença de efeito *carry-over* pode ser uma forma conservadora de conduzir o cálculo do número de voluntários.

A Figura 3.1 permite visualizar a diferença do número de voluntários necessários para diversos valores de CV (intra-individual) considerando que não há efeito residual. Os resultados para o *cross-over* 4x2 foram omitidos por apresentarem valores muito acima dos demais. Os delineamentos que apresentam o menor número de voluntários total (N) são o 2x4 e 4x4, seguidos do 2x3. A diferença do 2x4 em relação ao 4x4 é de no máximo 4 voluntários.

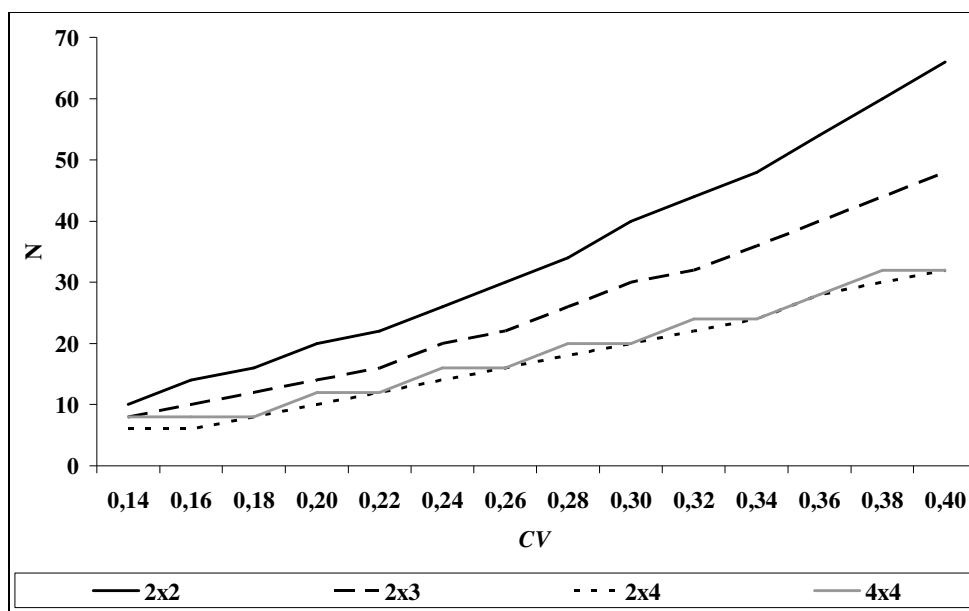


Figura 3.1: Número total de voluntários (N) para vários delineamentos em função do CV (nível de significância = 5% e poder = 80%)

Tabela 3.2: Número total de voluntários (N) para vários delineamentos em função da diferença das médias populacionais (θ_γ) e do coeficiente de variação (CV) (nível de significância = 5% e poder = 80%)

		Delineamento <i>cross-over</i>											
θ_γ	CV	σ_{e^*}	2x2	4x2	4x2 ^c	2x3	2x4	2x4 ^c	4x4	6x3	6x3 ^c	4x4(4F)	4x4(4F) ^c
0,00	0,10	0,10	6	12	16	4	4	4	8	12	12	8	8
	0,12	0,12	8	16	24	6	4	4	8	12	12	8	8
	0,14	0,14	10	20	32	8	6	6	8	12	12	8	8
	0,16	0,16	12	24	40	8	6	6	8	12	12	12	12
	0,18	0,18	14	28	48	10	8	8	8	12	18	12	12
	0,20	0,20	16	32	56	12	8	8	8	18	18	16	16
	0,22	0,22	18	36	68	14	10	10	12	18	18	16	20
	0,24	0,24	22	44	80	16	12	12	12	18	24	20	20
	0,26	0,26	24	48	92	18	12	14	12	24	24	24	24
	0,28	0,27	28	56	108	22	14	16	16	24	30	24	28
	0,30	0,29	32	64	124	24	16	18	16	30	36	28	32
	0,32	0,31	36	72	136	26	18	20	20	30	36	32	36
	0,34	0,33	40	80	152	30	20	22	20	36	42	36	40
	0,36	0,35	44	88	172	34	22	24	24	36	42	40	44
0,38	0,37	48	96	188	36	24	28	24	42	48	40	48	
0,40	0,39	54	108	208	40	28	30	28	42	54	44	52	
0,05	0,10	0,10	8	16	20	6	4	4	8	12	12	8	8
	0,12	0,12	8	16	28	6	4	6	8	12	12	8	8
	0,14	0,14	10	20	36	8	6	6	8	12	12	12	12
	0,16	0,16	14	28	48	10	6	8	8	12	18	12	12
	0,18	0,18	16	32	56	12	8	10	8	18	18	16	16
	0,20	0,20	20	40	72	14	10	10	12	18	24	20	20
	0,22	0,22	22	44	84	16	12	12	12	18	24	20	24
	0,24	0,24	26	52	100	20	14	14	16	24	30	24	28
	0,26	0,26	30	60	116	22	16	16	16	24	30	28	32
	0,28	0,27	34	68	132	26	18	20	20	30	36	32	36
	0,30	0,29	40	80	148	30	20	22	20	30	42	36	40
	0,32	0,31	44	88	168	32	22	24	24	36	42	40	44
	0,34	0,33	48	96	188	36	24	28	24	42	48	44	48
	0,36	0,35	54	108	212	40	28	30	28	42	54	48	56
0,38	0,37	60	120	232	44	30	32	32	48	60	52	60	
0,40	0,39	66	132	256	48	32	36	32	54	66	56	64	
0,10	0,10	0,10	10	20	36	8	6	6	8	12	12	12	12
	0,12	0,12	14	28	52	10	8	8	8	12	18	16	16
	0,14	0,14	18	36	68	14	10	10	12	18	24	16	20
	0,16	0,16	24	48	84	18	12	12	12	24	24	24	24
	0,18	0,18	28	56	108	22	14	16	16	24	30	28	28
	0,20	0,20	34	68	132	26	18	20	20	30	36	32	36
	0,22	0,22	40	80	156	30	20	22	20	36	42	36	40
	0,24	0,24	48	96	188	36	24	26	24	42	48	44	48
	0,26	0,26	56	112	216	42	28	30	28	48	60	52	56
	0,28	0,27	64	128	248	48	32	36	32	54	66	56	64
	0,30	0,29	72	144	284	54	36	40	36	60	72	64	72
	0,32	0,31	82	164	320	62	42	46	44	66	84	72	84
	0,34	0,33	92	184	360	68	46	50	48	72	90	80	92
	0,36	0,35	102	204	400	76	52	56	52	78	102	88	100
0,38	0,37	112	224	444	84	56	62	56	90	108	96	112	
0,40	0,39	124	248	488	92	62	68	64	96	120	104	124	

Subscrito c significa presença de efeito *carry-over*

θ_γ = diferença das médias populacionais das formulações

CV = coeficiente de variação intra-individual (escala original)

σ_{e^*} = variabilidade intra-individual (escala logarítmica).

3.2 Poder do teste

A Tabela 3.3 apresenta o poder do teste utilizado para comparação de duas formulações para diversos delineamentos. Apesar dos delineamentos de Williams, *cross-over* 6x3 e 4x4(4F), permitirem comparar mais de duas formulações consideramos apenas o poder do teste para comparação das formulações duas a duas. Foi fixado $N = 24$ e nível de significância de 5%.

Como esperado, o aumento na variabilidade (CV) diminui o poder. O pior resultado foi obtido novamente para o *cross-over* 4x2. Além disso, para os delineamentos em que ocorre diferença dos cálculos com e sem o efeito *carry-over*, o poder do teste é sempre menor quando os cálculos são feitos considerando a presença de efeito *carry-over*. Para o *cross-over* 2x4, por exemplo, se $N = 24$, $\theta\gamma = 0,00$ e $CV = 0,30$ o poder é 95,87, sem a presença de efeito *carry-over* e 93,84 na presença deste efeito.

Na Figura 3.2 podemos visualizar a diferença do poder do teste para os diversos delineamentos quando não há efeito *carry-over* para $\theta\gamma = 0,00$ e $\theta\gamma = 0,05$, respectivamente nos painéis (a) e (b). Em todos os casos foram considerados $N = 24$ e nível de significância de 5%.

Considerando que não há efeito *carry-over*, o poder do teste para os delineamentos *cross-over* 4x4 e 2x4 são os mais elevados, sempre acima de 0,80 para valores de CV acima de 0,24. O *cross-over* 2x2 apresenta os piores resultados depois do 4x2. O *cross-over* 2x3 apresenta um resultado intermediário. Não há diferença entre os dois valores de $\theta\gamma$ apresentados no painéis (a) e (b) em relação à ordem das curvas. A diferença é que, de maneira geral, ao aumentar o valor de $\theta\gamma$ ocorre uma diminuição do poder.

Na Figura 3.3 temos a mesma comparação para delineamentos *cross-over* na presença de efeito residual. O delineamento *cross-over* 2x2 não é apresentado por não possuir um estimador não viciado para o efeito de formulação na presença de efeito *carry-over*. Os demais delineamentos apresentam resultados muito semelhantes àqueles apresentados sem o efeito, com a diferença de que o poder é menor para os delineamentos *cross-over* 4x2 e 2x4. Já para os delineamentos *cross-over* 2x3 e 4x4 não há diferença no cálculo do poder.

Tabela 3.3: Poder do teste para vários delineamentos *cross-over* em função da diferença das médias populacionais (θ_γ) e do coeficiente de variação (CV) ($N=24$ e nível de significância = 5%)

			Delineamento <i>cross-over</i>										
θ_γ	CV	σ_e^*	2x2	4x2	4x2 ^c	2x3	2x4	2x4 ^c	4x4	6x3	6x3 ^c	4x4(4F)	4x4(4F) ^c
0,00	0,10	0,10	100,00	99,99	98,46	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,12	0,12	100,00	99,72	91,97	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,14	0,14	99,98	98,06	79,53	100,00	100,00	100,00	100,00	99,99	99,88	99,99	99,97
	0,16	0,16	99,78	93,53	63,63	99,99	100,00	100,00	100,00	99,83	99,15	99,85	99,67
	0,18	0,18	98,91	85,74	47,04	99,89	100,00	100,00	100,00	99,11	96,94	99,17	98,52
	0,20	0,20	96,71	75,46	31,46	99,47	99,99	99,96	99,99	97,19	92,63	97,34	95,82
	0,22	0,22	92,78	63,85	17,62	98,34	99,91	99,81	99,91	93,63	86,19	93,90	91,23
	0,24	0,24	87,10	51,93	5,65	96,13	99,66	99,33	99,66	88,36	78,08	88,75	84,88
	0,26	0,26	80,01	40,40	0,00	92,65	99,03	98,31	99,03	81,65	68,94	82,16	77,18
	0,28	0,27	71,99	29,63	0,00	87,95	97,82	96,51	97,81	73,92	59,37	74,54	68,67
	0,30	0,29	63,48	19,80	0,00	82,23	95,87	93,84	95,87	65,63	49,82	66,33	59,81
	0,32	0,31	54,86	10,95	0,00	75,75	93,13	90,28	93,12	57,16	40,61	57,91	50,96
	0,34	0,33	46,41	3,04	0,00	68,82	89,62	85,95	89,61	48,79	31,91	49,57	42,39
	0,36	0,35	38,30	0,00	0,00	61,67	85,42	80,98	85,41	40,72	23,83	41,51	34,24
	0,38	0,37	30,65	0,00	0,00	54,52	80,68	75,55	80,67	33,06	16,39	33,85	26,61
	0,40	0,39	23,50	0,00	0,00	47,50	75,55	69,82	75,53	25,88	9,58	26,66	19,53
0,05	0,10	0,10	100,00	99,62	93,43	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,99	100,00	100,00
	0,12	0,12	99,93	97,48	83,26	100,00	100,00	100,00	100,00	99,95	99,72	99,95	99,90
	0,14	0,14	99,42	92,57	70,36	99,94	100,00	100,00	100,00	99,52	98,39	99,55	99,21
	0,16	0,16	97,76	85,29	56,23	99,59	99,99	99,96	99,99	98,07	95,27	98,16	97,21
	0,18	0,18	94,58	76,44	41,98	98,51	99,89	99,77	99,89	95,15	90,36	95,32	93,56
	0,20	0,20	89,97	66,66	28,47	96,37	99,53	99,17	99,52	90,81	84,07	91,07	88,49
	0,22	0,22	84,27	56,44	16,16	93,15	98,67	97,91	98,67	85,36	76,84	85,71	82,36
	0,24	0,24	77,80	46,20	5,25	88,98	97,14	95,87	97,14	79,13	69,01	79,55	75,51
	0,26	0,26	70,82	36,26	0,00	84,10	94,90	93,06	94,90	72,35	60,84	72,84	68,18
	0,28	0,27	63,53	26,85	0,00	78,69	92,01	89,61	92,00	65,24	52,56	65,79	60,60
	0,30	0,29	56,10	18,12	0,00	72,91	88,57	85,63	88,56	57,96	44,37	58,56	52,94
	0,32	0,31	48,70	10,10	0,00	66,89	84,70	81,26	84,69	50,67	36,44	51,31	45,35
	0,34	0,33	41,45	2,82	0,00	60,73	80,50	76,59	80,49	43,49	28,87	44,16	37,98
	0,36	0,35	34,44	0,00	0,00	54,54	76,06	71,71	76,05	36,54	21,73	37,22	30,90
	0,38	0,37	27,76	0,00	0,00	48,40	71,44	66,70	71,42	29,87	15,05	30,56	24,19
	0,40	0,39	21,43	0,00	0,00	42,38	66,70	61,61	66,68	23,54	8,87	24,24	17,88
0,10	0,10	0,10	99,37	92,34	72,60	99,93	100,00	100,00	100,00	99,48	98,28	99,51	99,15
	0,12	0,12	96,48	82,14	58,99	99,20	99,96	99,91	99,96	96,90	93,23	97,03	95,72
	0,14	0,14	90,65	71,16	48,03	96,67	99,59	99,27	99,58	91,44	85,27	91,69	89,29
	0,16	0,16	82,98	61,23	38,67	91,98	98,26	97,35	98,26	84,03	76,27	84,37	81,19
	0,18	0,18	74,82	52,78	29,84	85,77	95,53	93,85	95,52	76,00	67,59	76,38	72,82
	0,20	0,20	67,05	45,48	21,09	78,90	91,46	89,05	91,45	68,26	59,82	68,66	65,02
	0,22	0,22	60,05	38,84	12,48	72,07	86,46	83,48	86,45	61,24	53,04	61,63	58,06
	0,24	0,24	53,87	32,48	4,20	65,67	81,00	77,65	80,99	55,01	47,05	55,39	51,94
	0,26	0,26	48,36	26,21	0,00	59,85	75,47	71,92	75,46	49,48	41,58	49,85	46,47
	0,28	0,27	43,34	19,99	0,00	54,63	70,14	66,52	70,12	44,46	36,39	44,83	41,42
	0,30	0,29	38,60	13,88	0,00	49,91	65,12	61,53	65,11	39,75	31,33	40,13	36,62
	0,32	0,31	34,01	7,94	0,00	45,57	60,50	56,98	60,49	35,23	26,33	35,62	31,94
	0,34	0,33	29,50	2,25	0,00	41,51	56,27	52,83	56,26	30,78	21,36	31,20	27,31
	0,36	0,35	25,04	0,00	0,00	37,62	52,39	49,00	52,38	26,39	16,46	26,83	22,72
	0,38	0,37	20,61	0,00	0,00	33,83	48,80	45,44	48,79	22,03	11,67	22,49	18,18
	0,40	0,39	16,25	0,00	0,00	30,09	45,44	42,07	45,43	17,73	7,02	18,21	13,73

Subscrito c significa presença de efeito *carry-over*

θ_γ = diferença das médias populacionais das formulações

CV = coeficiente de variação intra-individual (escala original)

σ_e^* = variabilidade intra-individual (escala logarítmica).

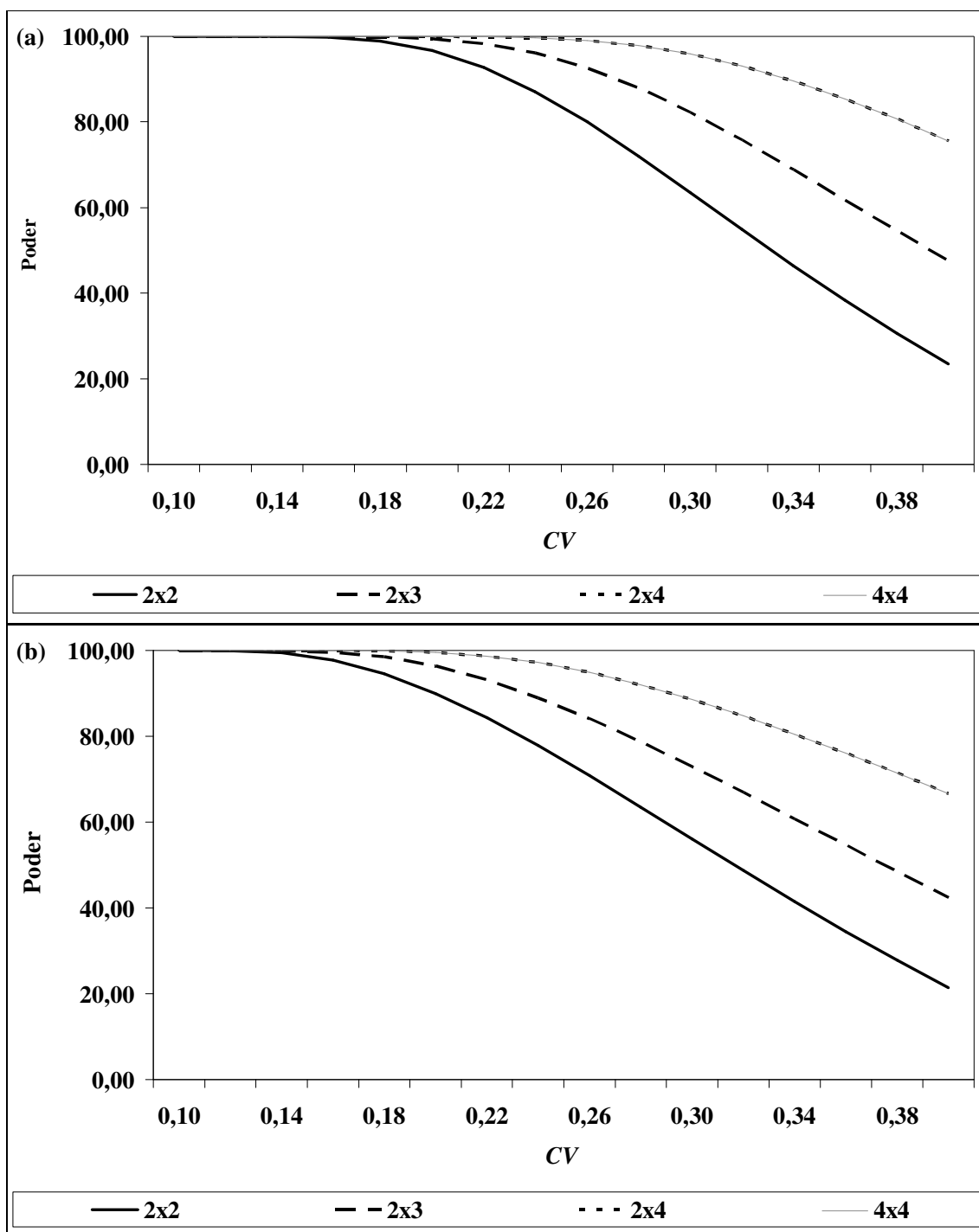


Figura 3.2: Poder do teste para vários delineamentos na ausência de efeito *carry-over* em função do CV ($N = 24$ e nível de significância = 5%): (a) $\theta\gamma = 0,00$, (b) $\theta\gamma = 0,05$

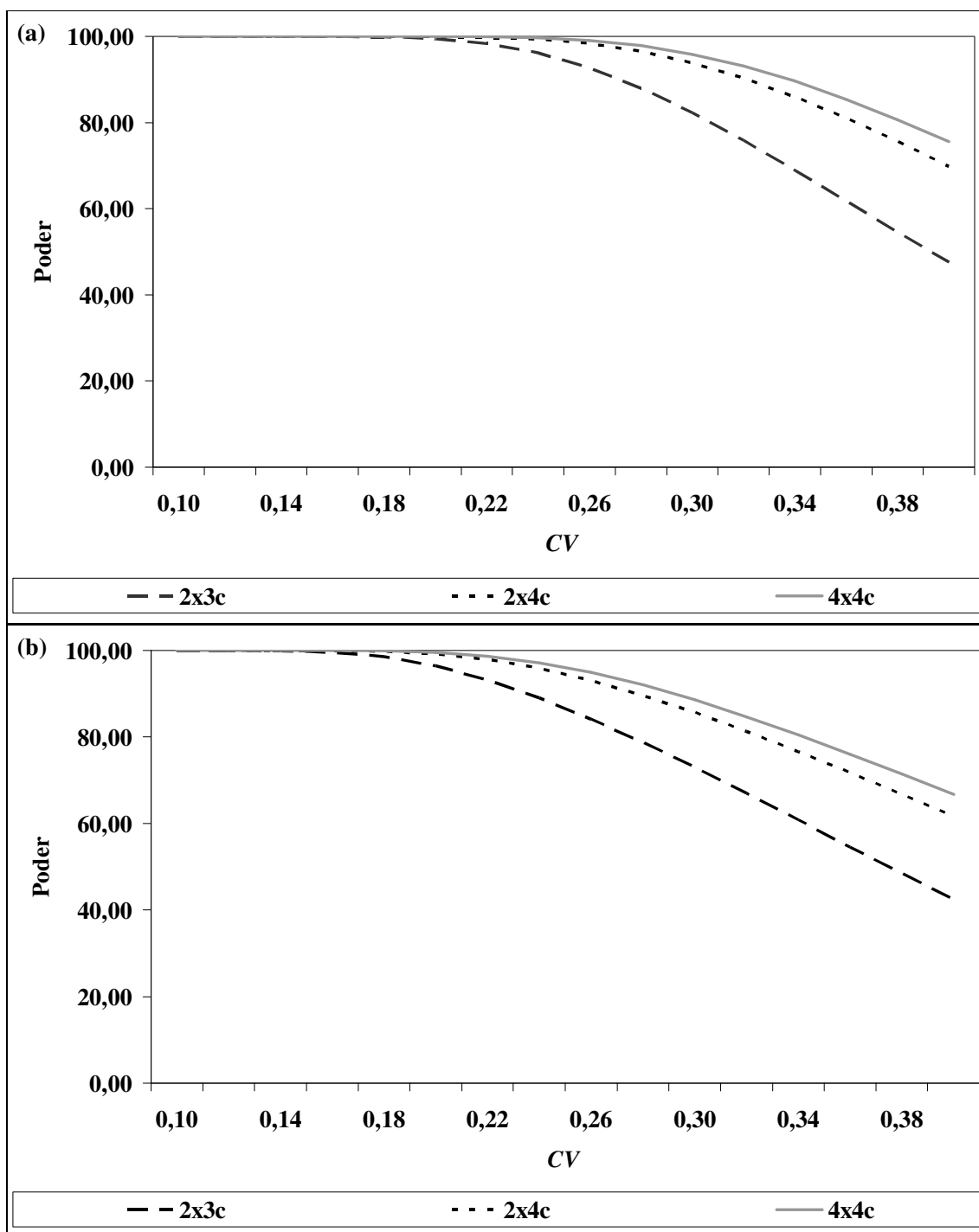


Figura 3.3: Poder do teste para vários delineamentos na presença de efeito *carry-over* em função do CV ($N = 24$ e nível de significância = 5%): (a) $\theta\gamma = 0,00$, (b) $\theta\gamma = 0,05$

3.3 Custo-Eficiência

A diminuição do número de voluntários nem sempre está associada a uma redução de custos no estudo de bioequivalência. Muitas vezes essa diminuição implica em aumento no número de períodos e conseqüentemente aumento nos custos individuais com cada voluntário. Um dos motivos do aumento do número de períodos e seqüências é o aumento do número de medidas realizadas em cada voluntário que resulta num aumento do custo total do estudo de bioequivalência média.

Apresentamos a seguir os resultados de um estudo comparando o número de medidas total em diversos delineamentos considerando um total de 10 medidas por voluntário em cada período. Na Tabela 3.4 notamos que o delineamento *cross-over* 2x2, em geral, possui o menor número de medidas. Para $\theta\gamma = 0,00$, o delineamento *cross-over* 2x3 apresenta número de medidas iguais ao 2x2 para $CV=0,10$ e $0,16$. Já para $\theta\gamma \geq 0,05$, o 2x4 é o que mais se aproxima do número de medidas do *cross-over* 2x2 com medidas idênticas em muitos casos. O 2x3 também tem um número de medidas próximo, apesar de um pouco maiores, a diferença entre as medidas do 2x2 e 2x3 vai de 0 a 160 medidas para $\theta\gamma = 0,00$. O delineamento que apresenta o maior número de medidas em todos os casos é o *cross-over* 4x2 seguido do 4x4(4F).

A Figura 3.4 mostra a diferença entre o número de medidas para os diversos delineamentos, variando os valores de CV (intra-individual), considerando que não há efeito *carry-over* e fixando $\theta\gamma = 0,05$, confirmando assim os resultados já relatados.

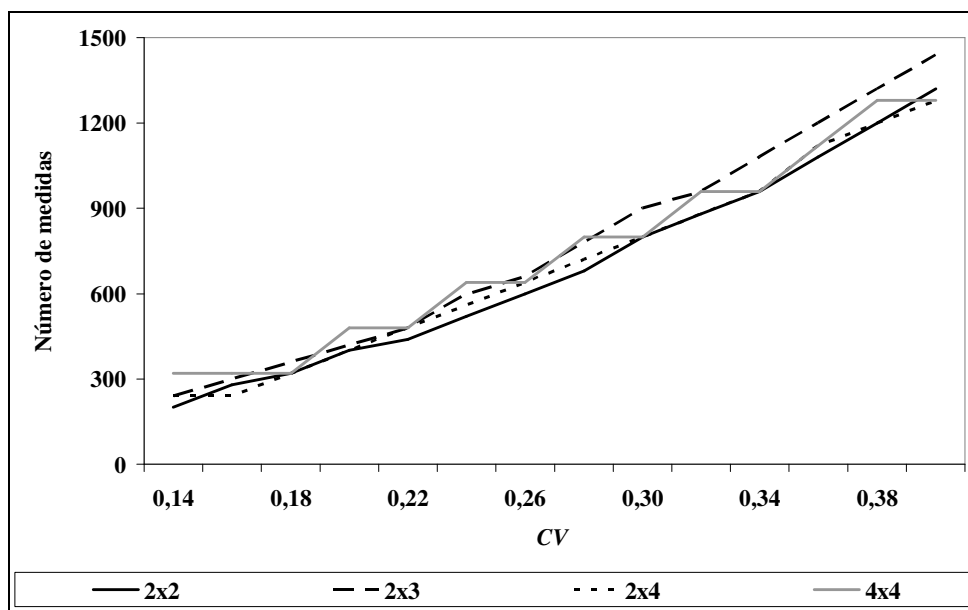


Figura 3.4: Número total de medidas para vários delineamentos em função do CV (10 medidas por voluntário em cada período, nível de significância = 5%, poder = 8% e $\theta\gamma = 0,05$)

Tabela 3.4: Número total de medidas para vários delineamentos em função da diferença das médias populacionais (θ_γ) e do coeficiente de variação (CV) (10 medidas por voluntário em cada período, nível de significância = 5% e poder = 80%)

θ_γ	CV	σ_e^*	Delineamento <i>cross-over</i>										
			2x2	4x2	4x2 ^c	2x3	2x4	2x4 ^c	4x4	6x3	6x3 ^c	4x4(4F)	4x4(4F) ^c
0,00	0,10	0,10	120	240	320	120	160	160	320	360	360	320	320
	0,12	0,12	160	320	480	180	160	160	320	360	360	320	320
	0,14	0,14	200	400	640	240	240	240	320	360	360	320	320
	0,16	0,16	240	480	800	240	240	240	320	360	360	480	480
	0,18	0,18	280	560	960	300	320	320	320	360	540	480	480
	0,20	0,20	320	640	1120	360	320	320	320	540	540	640	640
	0,22	0,22	360	720	1360	420	400	400	480	540	540	640	800
	0,24	0,24	440	880	1600	480	480	480	480	540	720	800	800
	0,26	0,26	480	960	1840	540	480	560	480	720	720	960	960
	0,28	0,27	560	1120	2160	660	560	640	640	720	900	960	1120
	0,30	0,29	640	1280	2480	720	640	720	640	900	1080	1120	1280
	0,32	0,31	720	1440	2720	780	720	800	800	900	1080	1280	1440
	0,34	0,33	800	1600	3040	900	800	880	800	1080	1260	1440	1600
	0,36	0,35	880	1760	3440	1020	880	960	960	1080	1260	1600	1760
	0,38	0,37	960	1920	3760	1080	960	1120	960	1260	1440	1600	1920
0,40	0,39	1080	2160	4160	1200	1120	1200	1120	1260	1620	1760	2080	
0,05	0,10	0,10	160	320	400	180	160	160	320	360	360	320	320
	0,12	0,12	160	320	560	180	160	240	320	360	360	320	320
	0,14	0,14	200	400	720	240	240	240	320	360	360	480	480
	0,16	0,16	280	560	960	300	240	320	320	360	540	480	480
	0,18	0,18	320	640	1120	360	320	400	320	540	540	640	640
	0,20	0,20	400	800	1440	420	400	400	480	540	720	800	800
	0,22	0,22	440	880	1680	480	480	480	480	540	720	800	960
	0,24	0,24	520	1040	2000	600	560	560	640	720	900	960	1120
	0,26	0,26	600	1200	2320	660	640	640	640	720	900	1120	1280
	0,28	0,27	680	1360	2640	780	720	800	800	900	1080	1280	1440
	0,30	0,29	800	1600	2960	900	800	880	800	900	1260	1440	1600
	0,32	0,31	880	1760	3360	960	880	960	960	1080	1260	1600	1760
	0,34	0,33	960	1920	3760	1080	960	1120	960	1260	1440	1760	1920
	0,36	0,35	1080	2160	4240	1200	1120	1200	1120	1260	1620	1920	2240
	0,38	0,37	1200	2400	4640	1320	1200	1280	1280	1440	1800	2080	2400
0,40	0,39	1320	2640	5120	1440	1280	1440	1280	1620	1980	2240	2560	
0,10	0,10	0,10	200	400	720	240	240	240	320	360	360	480	480
	0,12	0,12	280	560	1040	300	320	320	320	360	540	640	640
	0,14	0,14	360	720	1360	420	400	400	480	540	720	640	800
	0,16	0,16	480	960	1680	540	480	480	480	720	720	960	960
	0,18	0,18	560	1120	2160	660	560	640	640	720	900	1120	1120
	0,20	0,20	680	1360	2640	780	720	800	800	900	1080	1280	1440
	0,22	0,22	800	1600	3120	900	800	880	800	1080	1260	1440	1600
	0,24	0,24	960	1920	3760	1080	960	1040	960	1260	1440	1760	1920
	0,26	0,26	1120	2240	4320	1260	1120	1200	1120	1440	1800	2080	2240
	0,28	0,27	1280	2560	4960	1440	1280	1440	1280	1620	1980	2240	2560
	0,30	0,29	1440	2880	5680	1620	1440	1600	1440	1800	2160	2560	2880
	0,32	0,31	1640	3280	6400	1860	1680	1840	1760	1980	2520	2880	3360
	0,34	0,33	1840	3680	7200	2040	1840	2000	1920	2160	2700	3200	3680
	0,36	0,35	2040	4080	8000	2280	2080	2240	2080	2340	3060	3520	4000
	0,38	0,37	2240	4480	8880	2520	2240	2480	2240	2700	3240	3840	4480
0,40	0,39	2480	4960	9760	2760	2480	2720	2560	2880	3600	4160	4960	

Subscrito c significa presença de efeito *carry-over*

θ_γ = diferença das médias populacionais das formulações

CV = coeficiente de variação intra-individual (escala original)

σ_e^* = variabilidade intra-individual (escala logarítmica).

O número de medidas não é o único fator responsável pelo aumento do custo no estudo de bioequivalência. Uma questão de importância prática é como selecionar o delineamento com melhor custo-eficiência. Normalmente estima-se o número de voluntários para cada delineamento e então se escolhe aquele com menor número de voluntários assumindo que quanto menor o número de voluntários, menor será o custo. Como já foi dito, esta prática nem sempre é apropriada para escolher o delineamento com melhor custo-eficiência.

Zhou et al (2006) apresentam uma função geral de custo para verificar a relação custo-eficiência para os seguintes delineamentos *cross-over*: 4x2, 2x3, 4x3, 2x4 e 4x4.

O custo de um estudo clínico inclui o custo de recrutamento e análise (C_0), o custo associado com cada período (C_t), $t = 1, \dots, P$, além do custo normal de cada seqüência (C_s por seqüência). Em estudo com N voluntários, o custo total T para o delineamento com P períodos e S seqüências pode ser escrito como,

$$T = NC_0 + N \sum_{t=1}^P C_t + C_s S \quad (3.1)$$

A função custo (3.1) é muito geral no sentido que não coloca restrições no custo do período. Na realidade, as duas situações mais comuns são: (i) o custo de período é o mesmo para todos os períodos; (ii) o custo de período aumenta lineamente a cada período. A equação a seguir inclui as duas situações:

$$C_t = \alpha + \beta \cdot t, t=1, \dots, P \quad (3.2)$$

quando $\beta=0$, temos a situação (i), caso contrário, situação (ii).

Dada a relação (3.2), o custo total T passa a ser

$$T = N \left\{ C_0 + P\alpha + \frac{P(P+1)}{2} \beta \right\} + C_s S \quad (3.3)$$

No estudo de *Zhou et al* (2006), foram abordados seis diferentes cenários de custo:

1. Diferentes valores de β sem custo de seqüência ($C_s=0$);
2. Diferentes valores de β com custo de seqüência ($C_s \neq 0$);
3. Diferentes valores de C_0 sem aumento de custo por período ($\beta=0$);
4. Diferentes valores de C_0 com aumento de custo por período ($\beta \neq 0$);
5. Diferentes valores de C_s sem aumento de custo por período ($\beta=0$);
6. Diferentes valores de C_s com aumento de custo por período ($\beta \neq 0$).

Os resultados da simulação de Monte Carlo mostraram que o delineamento com menor número de voluntários pode não ser o que tem melhor custo-eficiência. O delineamento *cross-over* 4x2 tende a precisar de um número de voluntários muito maior que os outros delineamentos, o que leva a um alto custo. Não há um único delineamento uniformemente dominante. Apesar disso, os delineamentos *cross-over* 2x3 (especialmente) e 2x4 têm a melhor performance em termos de custo-eficiência. Eles dominam os demais delineamentos na maioria dos casos.

3.4 Resumo do capítulo

No Capítulo 3 foram apresentados cálculos do número total de voluntários (N), poder do teste e número total de medidas em função do coeficiente de variação (CV) e diferença entre as médias populacionais ($\theta\gamma$).

Algumas aproximações foram utilizadas nestes cálculos e foi observado que para $\theta\gamma = 0,00$ a aproximação conservadora é mais adequada que a não conservadora, principalmente com o aumento da variabilidade e para valores maiores de $\theta\gamma$ é preferível utilizar a aproximação não conservadora.

As distribuições Normal e t Student central se mostraram boas alternativas para o cálculo do número de voluntários pois além de produzirem resultados bastante próximos aos da distribuição exata (t Student não central) possuem fórmulas para o cálculo.

A Tabela 3.5 apresenta um resumo dos resultados deste capítulo em que foram omitidos os resultados para o delineamento *cross-over* 4x2 por serem sempre inferiores aos demais.

Para o número de voluntários o *cross-over* 2x4 é o que apresenta melhores resultados, já para o número de medidas os melhores resultados são do 2x2. Para CV baixo as diferenças entre os delineamentos é pequena e aumenta para valores altos de CV . Além disso, existe uma pequena diferença entre os resultados para $\theta\gamma = 0,00$ e $0,05$.

Tabela 3.5: Resumo dos resultados dos cálculos de número total de voluntários (N), poder do teste e número total de medidas em função do coeficiente de variação (CV) e diferença entre as médias populacionais ($\theta\gamma$)

Número total de voluntários (N) (poder = 80%, nível de significância = 0,05)					
CV	$\theta\gamma$	----- ----- ----- ----- ----- +			
		2x4	4x4	2x3	2x2
Baixo (0,10 a 0,20)	0,00	4 a 8	8	4 a 12	6 a 16
	0,05	4 a 10	8 a 12	6 a 14	8 a 20
Médio (0,20 a 0,30)	0,00	10 a 16	12 a 16	14 a 24	18 a 32
	0,05	12 a 20	12 a 20	16 a 30	22 a 40
Alto (0,30 a 0,40)	0,00	18 a 28	20 a 28	26 a 40	36 a 54
	0,05	22 a 32	24 a 32	32 a 48	44 a 66
Poder do teste ($N = 24$, nível de significância = 0,05)					
CV	$\theta\gamma$	----- ----- ----- ----- ----- +			
		2x2	2x3	4x4	2x4
Baixo (0,10 a 0,20)	0,00	96,71 a 100,00	99,47 a 100,00	99,99 a 100,00	99,99 a 100,00
	0,05	89,97 a 100,00	96,37 a 100,00	99,52 a 100,00	99,53 a 100,00
Médio (0,20 a 0,30)	0,00	63,48 a 92,78	82,23 a 98,34	95,87 a 99,91	95,87 a 99,91
	0,05	56,10 a 84,27	72,91 a 93,15	88,56 a 98,67	88,57 a 98,67
Alto (0,30 a 0,40)	0,00	23,50 a 54,86	47,50 a 75,75	75,53 a 93,12	75,53 a 93,12
	0,05	21,43 a 48,70	42,38 a 66,89	66,68 a 84,69	66,70 a 84,70
Número de medidas (10 medidas por voluntário, poder = 80%, nível de significância = 0,05)					
CV	$\theta\gamma$	----- ----- ----- ----- ----- +			
		2x2	2x4	4x4	2x3
Baixo (0,10 a 0,20)	0,00	120 a 320	160 a 320	320	120 a 360
	0,05	320 a 800	160 a 400	320 a 480	180 a 420
Médio (0,20 a 0,30)	0,00	360 a 640	400 a 640	480 a 640	420 a 720
	0,05	440 a 800	480 a 800	480 a 800	480 a 900
Alto (0,30 a 0,40)	0,00	720 a 1080	720 a 1120	800 a 1120	780 a 1200
	0,05	880 a 1320	880 a 1280	960 a 1280	960 a 1440

4 Estudos de simulação

Estudos de simulação são muitas vezes utilizados em diversas áreas do conhecimento com o intuito de simular situações que podem ocorrer na prática e na estatística isso não é diferente. São úteis especialmente quando a solução analítica é difícil ou impossível de ser obtida.

Neste capítulo serão apresentados resultados de estudos de simulação que abordam questões práticas, como o efeito do uso de uma medida de variabilidade incorreta na estimação do número de voluntários, efeito do aumento da variabilidade na conclusão de bioequivalência, presença de observações atípicas e suas conseqüências, entre outras.

Além de verificar o percentual de conclusão de bioequivalência nos estudos simulados, o objetivo é comparar alguns delineamentos e verificar qual seria o mais adequado em cada caso.

Existem duas maneiras de simular estudos de bioequivalência média. Uma delas é simular diretamente a medida farmacocinética, ASC ou C_{max} , por exemplo, e a outra é gerar a curva de concentração individual. Como no primeiro caso as interpretações dos resultados não dependem da medida farmacocinética (ASC e C_{max}), foi escolhido ASC . Para o segundo caso podemos verificar a conclusão de bioequivalência para cada uma dessas medidas e inclusive verificar se a conclusão é a mesma para as duas e ainda estudar as propriedades estatísticas, tal como a variabilidade. Esta última verificação é interessante já que a ANVISA determina que o estudo será aprovado apenas se para as duas medidas (ASC e C_{max}) houver conclusão de bioequivalência.

Os programas foram desenvolvidos em linguagem de programação C, sendo o número de repetições 100.000 e sempre supondo bioequivalência entre as formulações.

4.1 Simulação da medida farmacocinética

A medida farmacocinética ASC foi gerada segundo uma distribuição log-normal com os seguintes parâmetros: média ($\mu^* = 4,37$), variação inter-individual ($\sigma_s^* = 0,20$), variação intra-individual ($\sigma_e^* = 0,19$) e diferença entre as médias populacionais ($\theta_\gamma = 0,00$), ou seja, supondo que as duas formulações sejam bioequivalentes. Com relação ao número total de voluntários foram considerados aqueles que freqüentemente aparecem na prática ($N = 12, 16, 20, 24, 28, 32$ e 36), sendo este total

dividido igualmente entre as seqüências. Para a avaliação de bioequivalência, foi construído o intervalo de 90% de confiança para a diferença das médias das formulações e foram feitos os cálculos para os dois testes de hipóteses unilaterais de Schuirmann com poder de 80% e nível de significância de 5%. Foram considerados ainda ausência de efeito de período, de formulação e *carry-over*.

Para comparar duas formulações, foram utilizados os delineamentos do tipo *cross-over* 2x2, 4x2, 2x3, 2x4 e 4x4, e para comparação de quatro formulações, o *cross-over* 4x4(4F). Para o último serão considerados os valores para comparação das formulações duas a duas.

4.1.1 Conclusão de bioequivalência

Em um estudo de bioequivalência média, ao comparar a posição do intervalo de confiança em relação ao intervalo de bioequivalência (θ_l , θ_s) seis situações podem ocorrer. A primeira é aquela em que o intervalo de confiança está completamente dentro dos limites de bioequivalência, e neste caso dizemos que as duas formulações são bioequivalentes. Este é o resultado desejado quando se realiza um estudo de bioequivalência média. Na segunda situação, o limite superior do intervalo de confiança é maior que o limite superior de bioequivalência enquanto que no terceiro caso, o limite inferior do intervalo de confiança é menor que o limite inferior de bioequivalência. No quarto(quinto) caso, o intervalo de confiança está completamente acima(abaixo) do intervalo de bioequivalência. Estes dois casos são as condições mais extremas de não bioequivalência que devem realmente significar problema de formulação e não na coleta de dados ou outro incidente. Finalmente no sexto caso o intervalo de bioequivalência está completamente dentro do intervalo de confiança.

A Tabela 4.1 apresenta os percentuais de resultados declarados como bioequivalentes referentes aos seis casos descritos acima para os delineamentos *cross-over* 2x2, 4x2, 2x3, 2x4, 4x4 e 4x4(4F) e para vários números de voluntários.

O pior resultado foi observado para o delineamento *cross-over* 4x2, em que seriam necessários mais de 36 voluntários para atingir um percentual de bioequivalência de 80%.

Para o delineamento *cross-over* 2x2 com $\sigma_e^* = 0,19$ e 80% de poder seria necessário um total de 14 voluntários, nesse caso entre 69,89% e 86,81% dos estudos seriam considerados bioequivalentes, ou seja, o intervalo de 90% de confiança construído está totalmente dentro dos limites de bioequivalência. Para o *cross-over* 2x3, com os mesmos parâmetros seriam necessários 12 voluntários e o percentual de bioequivalência nesse caso seria 81,35%. Já para o *cross-over* 2x4 seriam necessários 8 voluntários e o percentual de bioequivalência seria 85,24%.

Os casos em que não se conclui bioequivalência estão divididos em duas situações: limite superior do intervalo construído está acima do limite superior de bioequivalência e/ou está abaixo do limite

inferior de bioequivalência na maioria dos delineamentos. Apenas para os *cross-over* 4x2 e 4x4(4F) ocorrem outras situações.

Tabela 4.1: Percentuais de conclusão de bioequivalência para vários delineamentos em função do número total de voluntários (N)

Delineamento <i>cross-over</i>	N	Poder	$([])$	$([])$	$([])$	$[]()$	$() []$	$([])$
2x2	12	70,76	69,89	15,01	15,03	0,00	0,00	0,06
	16	87,59	86,81	6,57	6,62	0,00	0,00	0,00
	20	94,95	94,55	2,74	2,72	0,00	0,00	0,00
	24	98,01	97,77	1,10	1,13	0,00	0,00	0,00
	28	99,24	99,10	0,47	0,43	0,00	0,00	0,00
	32	99,72	99,69	0,15	0,16	0,00	0,00	0,00
	36	99,90	99,89	0,05	0,06	0,00	0,00	0,00
4x2	12	4,22	15,05	27,95	27,64	0,02	0,03	29,31
	16	34,56	20,70	31,04	31,07	0,01	0,00	17,18
	20	55,94	29,86	31,11	30,79	0,00	0,00	8,24
	24	70,76	40,74	27,91	27,97	0,00	0,00	3,38
	28	80,84	52,25	23,41	23,40	0,00	0,00	0,94
	32	87,59	62,92	18,35	18,51	0,00	0,00	0,22
	36	92,04	72,25	13,83	13,89	0,00	0,00	0,04
2x3	12	88,80	81,34	9,29	9,37	0,00	0,00	0,00
	16	96,67	93,20	3,37	3,43	0,00	0,00	0,00
	20	99,06	97,59	1,17	1,24	0,00	0,00	0,00
	24	99,75	99,18	0,39	0,43	0,00	0,00	0,00
	28	99,93	99,71	0,14	0,15	0,00	0,00	0,00
	32	99,98	99,92	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00
	36	100,00	99,97	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00
2x4	12	98,22	96,63	1,69	1,68	0,00	0,00	0,00
	16	99,75	99,52	0,24	0,25	0,00	0,00	0,00
	20	99,97	99,92	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00
	24	100,00	99,99	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
	28	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	32	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	36	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4x4	12	98,21	99,75	0,12	0,12	0,00	0,00	0,00
	16	99,75	99,99	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	20	99,97	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	28	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	32	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	36	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4x4(4F)	12	76,62	67,40	16,24	16,19	0,00	0,00	0,18
	16	90,13	86,14	6,92	6,94	0,00	0,00	0,00
	20	96,00	94,37	2,79	2,84	0,00	0,00	0,00
	24	98,43	97,73	1,17	1,10	0,00	0,00	0,00
	28	99,40	99,08	0,47	0,45	0,00	0,00	0,00
	32	99,78	99,66	0,18	0,16	0,00	0,00	0,00
	36	99,92	99,86	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00

N = número total de voluntários; Intervalo de confiança (); Intervalo de bioequivalência []

Para a recomendação da ANVISA de no mínimo um total de 24 voluntários, o percentual de conclusão de bioequivalência está acima de 90% para todos os delineamentos, exceto o *cross-over* 4x2 que apresenta percentual de conclusão de bioequivalência de apenas 40,74%.

A Figura 4.1 apresenta o aumento do percentual de bioequivalência com o aumento do número total de voluntários para os delineamentos 2x2, 2x3, 2x4 e 4x4. Os resultados para o delineamento 4x2 foram omitidos por apresentarem valores muito inferiores aos dos demais delineamentos. Os delineamentos 4x4 e 2x4 são os que apresentaram o maior percentual de bioequivalência em todos os casos, respectivamente. Em seguida aparecem o 2x3 e 2x2.

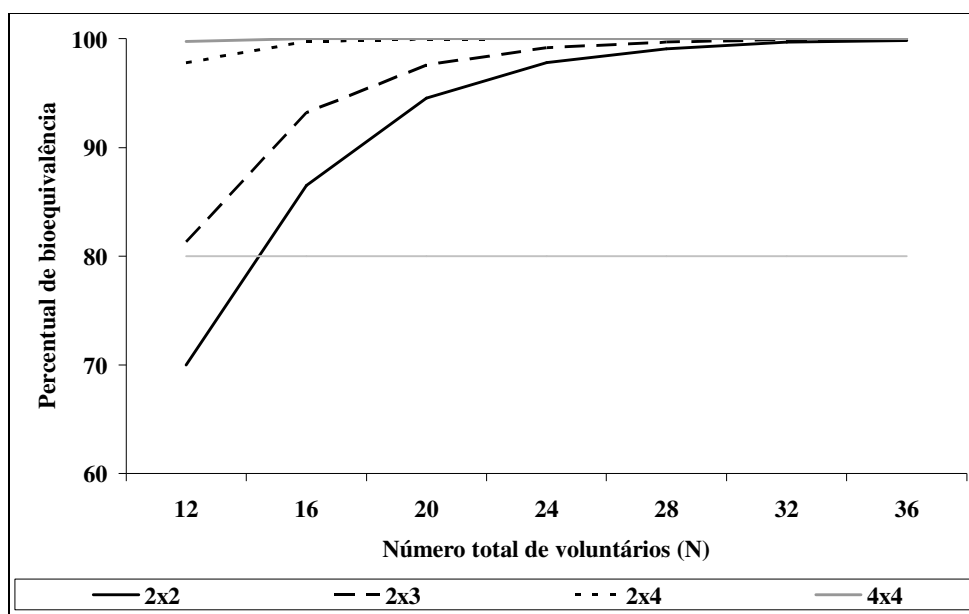


Figura 4.1: Percentuais de bioequivalência em função do número total de voluntários (N) para vários delineamentos

A Tabela 4.2 apresenta os percentuais de resultados declarados como bioequivalentes referentes aos seis casos descritos acima para os delineamentos *cross-over* 2x2, 2x3 e 2x4 desta vez fixando o número de medidas e ainda considerando um total de 10 medidas por voluntário em cada período.

A Figura 4.2 apresenta para os vários delineamentos o aumento do percentual de bioequivalência com o aumento do número total de medidas. O delineamento *cross-over* 2x2 apresentara o maior percentual de conclusão de bioequivalência, variando de 69,63 para 240 medidas até 100,00 para 1.000 medidas. Já o 2x3 é o que apresenta os menores percentuais, variando de 52,35 para 240 medidas até 99,96 para 1.000 medidas.

Tabela 4.2: Percentuais de conclusão de bioequivalência para vários delineamentos em função do número de medidas

Delineamento <i>cross-over</i>	Medidas	([])	([])	([])	([])	([])	([])
2x2	240	69,63	15,24	15,07	0,00	0,00	0,06
	320	86,82	6,70	6,48	0,00	0,00	0,00
	400	94,62	2,71	2,67	0,00	0,00	0,00
	480	97,91	1,03	1,06	0,00	0,00	0,00
	560	99,10	0,45	0,45	0,00	0,00	0,00
	640	99,69	0,14	0,17	0,00	0,00	0,00
	720	99,88	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00
	800	99,95	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00
	1000	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2x3	240	52,35	22,97	23,27	0,01	0,01	1,41
	320	69,54	15,23	15,16	0,00	0,00	0,08
	400	88,88	5,66	5,46	0,00	0,00	0,00
	480	93,43	3,24	3,33	0,00	0,00	0,00
	560	95,95	1,99	2,06	0,00	0,00	0,00
	640	98,68	0,65	0,67	0,00	0,00	0,00
	720	99,20	0,41	0,39	0,00	0,00	0,00
	800	99,50	0,23	0,26	0,00	0,00	0,00
	1000	99,96	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00
2x4	240	56,07	19,87	20,34	0,00	0,00	3,73
	320	79,84	9,98	10,05	0,00	0,00	0,13
	400	91,57	4,22	4,21	0,00	0,00	0,00
	480	96,59	1,70	1,70	0,00	0,00	0,00
	560	98,68	0,65	0,67	0,00	0,00	0,00
	640	99,54	0,22	0,24	0,00	0,00	0,00
	720	99,81	0,10	0,10	0,00	0,00	0,00
	800	99,94	0,02	0,04	0,00	0,00	0,00
	1000	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Intervalo de confiança () ; Intervalo de bioequivalência []

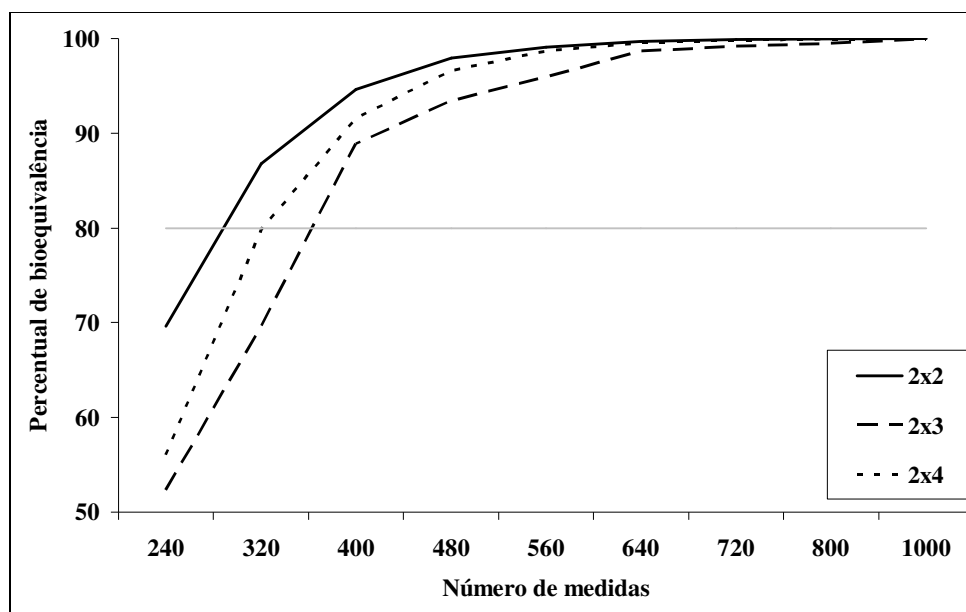


Figura 4.2: Percentuais de bioequivalência para vários delineamentos em função do número de medidas

A Tabela 4.3 mostra os resultados de um estudo para avaliar o efeito do aumento da variabilidade intra-individual (σ_e^*) no percentual de bioequivalência para diversos delineamentos.

Tabela 4.3: Percentuais de conclusão de bioequivalência para vários valores de σ_e^* e vários delineamentos em função do número total de voluntários (N)

Delineamento	N	$\sigma_e^* = 0,19$	$\sigma_e^* = 0,24$	$\sigma_e^* = 0,29$	$\sigma_e^* = 0,34$	$\sigma_e^* = 0,39$	$\sigma_e^* = 0,44$
2x2	12	69,89	38,09	17,18	6,99	2,72	1,05
	16	86,81	60,60	34,00	15,84	6,43	2,43
	20	94,55	76,24	51,08	28,44	13,11	5,28
	24	97,77	85,83	65,15	42,56	23,28	10,63
	28	99,10	91,68	75,25	54,40	34,06	17,85
	32	99,69	95,24	82,61	64,09	44,45	26,54
	36	99,89	97,37	87,90	71,99	53,58	35,76
4x2	12	15,05	6,88	3,35	1,73	0,93	0,53
	16	20,70	7,96	3,19	1,32	0,59	0,28
	20	29,86	10,71	3,67	1,31	0,51	0,21
	24	40,74	15,44	5,09	1,58	0,52	0,19
	28	52,25	21,65	7,08	2,09	0,64	0,19
	32	62,92	29,38	10,01	2,90	0,79	0,24
	36	72,25	38,40	14,04	4,06	1,06	0,27
2x3	12	81,34	55,88	31,95	15,76	7,33	3,33
	16	93,20	76,52	53,51	31,90	16,50	7,73
	20	97,59	87,86	70,23	49,14	29,80	15,66
	24	99,18	93,97	81,37	63,35	44,05	27,06
	28	99,71	97,07	88,17	73,58	55,86	38,15
	32	99,92	98,57	92,92	81,44	65,65	48,95
	36	99,97	99,29	95,68	86,92	73,66	58,05
2x4	12	95,80	79,17	55,15	33,16	21,86	9,32
	16	99,36	92,76	76,59	55,79	41,06	20,50
	20	99,89	97,64	88,37	72,33	58,30	35,62
	24	99,99	99,23	94,47	83,25	71,33	50,02
	28	100,00	99,78	97,38	90,11	80,70	62,26
	32	100,00	99,93	98,84	94,24	87,00	71,68
	36	100,00	99,98	99,47	96,66	91,28	78,72
4x4	12	99,75	97,74	92,08	83,06	71,93	60,64
	16	99,99	99,70	97,98	93,92	87,75	79,94
	20	100,00	99,94	99,47	97,81	94,52	89,52
	24	100,00	99,99	99,86	99,20	97,46	94,41
	28	100,00	100,00	99,96	99,67	98,80	96,96
	32	100,00	100,00	99,99	99,91	99,48	98,38
	36	100,00	100,00	100,00	99,96	99,76	99,16
4x4(4F)	12	67,40	36,66	17,08	7,45	3,25	1,44
	16	86,14	59,74	33,37	15,80	6,87	2,79
	20	94,37	76,02	51,09	28,70	13,52	5,60
	24	97,73	85,59	64,75	42,03	23,03	10,88
	28	99,08	91,77	75,20	54,26	34,12	18,17
	32	99,66	95,20	82,48	64,02	44,49	26,77
	36	99,86	97,26	87,74	71,95	53,47	35,55
40	99,96	98,51	91,63	78,30	61,34	43,84	

N = número total de voluntários (poder = 80%, nível de significância = 5%, $\theta\gamma = 0,00$)

$\sigma_e^* = 0,19 \leftrightarrow CV = 0,19$, $\sigma_e^* = 0,24 \leftrightarrow CV = 0,24$, $\sigma_e^* = 0,29 \leftrightarrow CV = 0,30$, $\sigma_e^* = 0,34 \leftrightarrow CV = 0,35$,
 $\sigma_e^* = 0,39 \leftrightarrow CV = 0,41$, $\sigma_e^* = 0,44 \leftrightarrow CV = 0,46$

Como já era esperado, o aumento da variabilidade resulta numa diminuição do percentual de bioequivalência para N fixo. Essa diminuição é maior para os delineamentos 2x2 e 2x3, sem considerar o delineamento 4x2 que não apresenta bons resultados para nenhuma das variabilidades estudadas, mesmo com 36 voluntários e variabilidade baixa ($\sigma_e^* = 0,19$) o percentual de conclusão de bioequivalência é inferior a 80,00 (72,25). O delineamento 4x4 é o que apresenta os maiores percentuais de bioequivalência em todos os casos, seguido do 2x4.

Considerando $\sigma_e^* = 0,34$ e fixando o poder em 80%, seriam necessários 40 voluntários para o delineamento *cross-over* 2x2, sendo que o percentual de bioequivalência encontrado para esse número de voluntários é 79,02% (omitido da tabela). Para o *cross-over* 2x3, com o mesmo parâmetro seriam necessários 30 voluntários e o percentual de bioequivalência nesse caso estaria entre 73,58% e 81,44%. Já para o *cross-over* 2x4 seriam necessários 20 voluntários e o percentual de bioequivalência seria 72,33%.

A Figura 4.3 mostra a diminuição no percentual de conclusão de bioequivalência com o aumento da variabilidade intra-individual considerando $N = 24$.

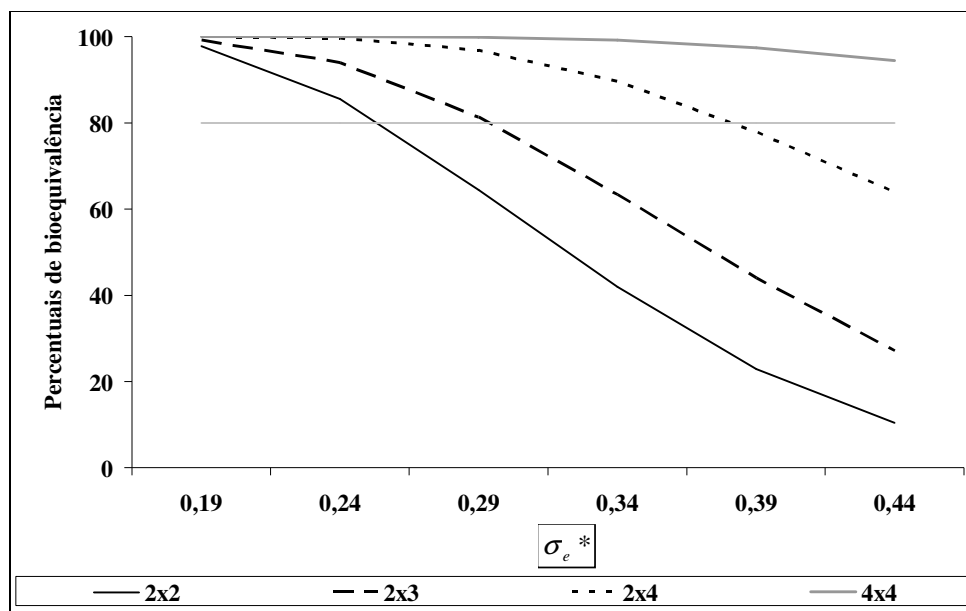


Figura 4.3: Percentuais de bioequivalência para vários delineamentos em função da variabilidade intra-individual ($N = 24$, nível de significância = 5%, $\theta\gamma = 0,00$)

Para o delineamento *cross-over* 2x2, o poder de 80% exigido seria atingido apenas para valores de σ_e^* abaixo de aproximadamente 0,25. Para formulações com alta variabilidade intra-individual ($CV > 30\%$) apenas os delineamentos 2x4 e 4x4 atingem poder acima de 80%. O *cross-over* 2x3 apresenta resultados melhores que o 2x2 mas inferiores aos do 2x4, possui percentual de conclusão de bioequivalência acima de 80,00 para variabilidade intra-individual inferior a 0,29, demonstrando que o

aumento no número de períodos gera um aumento na conclusão de bioequivalência. A diferença no percentual de conclusão de bioequivalência entre o *cross-over* 2x2, que possui os menores percentuais e o 4x4 que apresenta os maiores percentuais é acentuada com o aumento da variabilidade, por exemplo, para $N = 24$ a diferença é 2,23 se $\sigma_e^* = 0,19$, 34,71 se $\sigma_e^* = 0,29$ e 74,18 se $\sigma_e^* = 0,39$.

4.1.2 *Presença de observações atípicas*

A presença de observações atípicas, em inglês *outliers*, é sempre uma questão preocupante principalmente quando não se sabe o que gerou essa atipicidade. Exceto no caso de ser um erro de medida ou de digitação, que em geral pode ser corrigido, pode significar um comportamento diferente do esperado para a maioria dos voluntários. Neste caso, pode estar ligado a algum problema do produto ou ainda uma característica inerente ao voluntário, mas que pode ser observada em um paciente que for usar o medicamento.

Para verificar o efeito da presença desse tipo de observação em estudos de bioequivalência média que compara duas formulações (teste e referência) foi realizado um estudo de simulação. A observação atípica foi gerada utilizando a técnica de detecção apresentada nos gráficos do tipo *box-plot* em que considera-se atípica a observação que se encontra a uma distância maior ou igual a 1,5 vezes a distância inter-quartilica do primeiro ou terceiro quartil da distribuição.

Nove situações são apresentadas: nenhuma observação atípica, uma observação atípica na formulação referência (1R), uma observação atípica na formulação teste (1T), uma observação atípica na formulação referência e outra na teste (1R1T), duas observações atípicas na formulação referência (2R), duas observações atípicas na formulação teste (2T), duas observações atípicas na formulação referência e uma na teste (2R1T), duas observações atípicas na formulação teste e uma na referência (1R2T), duas observações atípicas em cada formulação (2R2T).

Houve a preocupação de gerar a observação atípica sempre num período que antecederesse um outro com formulação diversa, ou seja, se o *outlier* foi gerado no primeiro período para a formulação referência (R), no segundo período a observação seria para a formulação teste (T), e vice-versa.

Os resultados da Tabela 4.4 indicam que para todos os delineamentos, o aumento no número de observações atípicas gera uma diminuição no percentual de bioequivalência. Não há diferença se o *outlier* aparece na formulação R ou na T. Fixando $N = 24$, a diminuição no percentual de bioequivalência, aumentando o número de *outliers*, varia de 3,72 a 21,55 no *cross-over* 2x2, 1,61 a 5,36 no 4x2, 1,67 a 12,59 no 2x3 e 0,03 a 0,31 no 2x4, ou seja, o 2x2 é o delineamento mais afetado pela presença de observações atípicas. No *cross-over* 4x4 não há diminuição.

Tabela 4.4: Percentuais de conclusão de bioequivalência na presença de *outliers* utilizando o critério do *box-plot* para vários delineamentos em função do número total de voluntários (*N*)

Delineamento <i>cross-over</i>	<i>N</i>	Presença de <i>outliers</i> *								
		Nenhum	1R	1T	1R1T	2R	2T	2R1T	1R2T	2R2T
2x2	12	69,89	44,12	44,43	26,84	26,13	25,97	15,32	15,32	8,47
	16	86,81	70,99	70,92	56,20	55,84	55,85	42,51	42,73	31,36
	20	94,55	86,35	86,44	76,97	76,99	77,04	67,30	67,15	57,60
	24	97,77	94,05	94,01	88,92	88,95	88,83	82,73	82,78	76,22
	28	99,10	97,36	97,54	94,81	94,98	94,86	91,40	91,35	87,43
	32	99,69	98,98	99,03	97,77	97,84	97,84	96,08	96,07	93,74
	36	99,89	99,62	99,64	99,10	99,09	99,15	98,21	98,21	97,03
4x2	12	14,87	13,79	13,78	12,92	12,89	13,01	11,94	12,08	11,51
	16	20,81	19,31	19,47	18,25	18,47	18,27	17,61	17,53	16,52
	20	29,94	28,46	28,17	26,86	27,05	27,09	26,06	26,07	24,82
	24	40,71	39,10	39,37	37,77	37,68	37,76	36,33	36,56	35,35
	28	52,27	50,51	50,55	49,06	49,03	48,88	47,58	47,79	46,29
	32	62,88	61,27	61,26	59,58	59,61	59,79	58,30	58,03	57,14
	36	72,29	70,70	70,67	69,41	69,44	69,31	68,18	68,05	66,78
2x3	12	81,27	58,15	58,15	38,37	37,88	38,04	23,48	23,31	13,40
	16	93,30	82,23	82,22	69,46	69,49	69,17	56,30	56,80	44,08
	20	97,65	93,06	93,06	86,74	86,83	86,86	79,28	79,28	71,13
	24	99,19	97,52	97,40	94,71	94,77	94,71	91,07	91,14	86,60
	28	99,70	99,11	99,10	97,98	97,99	98,10	96,32	96,38	94,07
	32	99,91	99,70	99,69	99,27	99,28	99,34	98,60	98,59	97,59
	36	99,98	99,91	99,89	99,75	99,73	99,76	99,48	99,48	99,11
2x4	12	97,84	91,78	92,00	85,64	85,73	85,79	78,73	78,81	71,57
	16	99,74	98,54	98,62	97,05	97,16	97,08	94,95	95,04	92,42
	20	99,96	99,78	99,78	99,51	99,48	99,52	99,02	99,01	98,30
	24	99,99	99,96	99,96	99,91	99,92	99,91	99,83	99,84	99,68
	28	100,00	100,00	99,99	99,99	99,99	99,99	99,98	99,97	99,96
	32	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	36	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
4x4	12	99,75	99,33	99,44	98,81	98,38	98,79	97,56	97,81	96,23
	16	99,99	99,97	99,97	99,93	99,90	99,94	99,79	99,82	99,69
	20	100,00	100,00	100,00	99,99	99,99	100,00	99,99	99,99	99,97
	24	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	32	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	36	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

N = número total de voluntários; *número de *outliers*; R=Referência e T=Teste

A Figura 4.4 apresenta para diversos delineamentos, o percentual de diminuição (em comparação à ausência de *outlier*) no percentual de bioequivalência com o aumento do número de *outliers* para *N*=12 e *N*=24, respectivamente. Quanto maior o número de observações atípicas, menor é o percentual de conclusão de bioequivalência. O *cross-over* 4x4 apresenta percentual de diminuição próximo de zero nos dois casos. O 2x4 apresenta um baixo impacto no percentual de conclusão de

bioequivalência, tendo uma diminuição insignificante para $N=24$. Já para $N=12$, o mesmo delineamento apresenta uma diminuição um pouco maior, mas ainda baixa e neste caso próxima à diminuição sofrida pelo 4x2. O *cross-over* 2x2 é o mais afetado diante da presença de observações atípicas tanto para $N=12$ quanto para $N=24$.

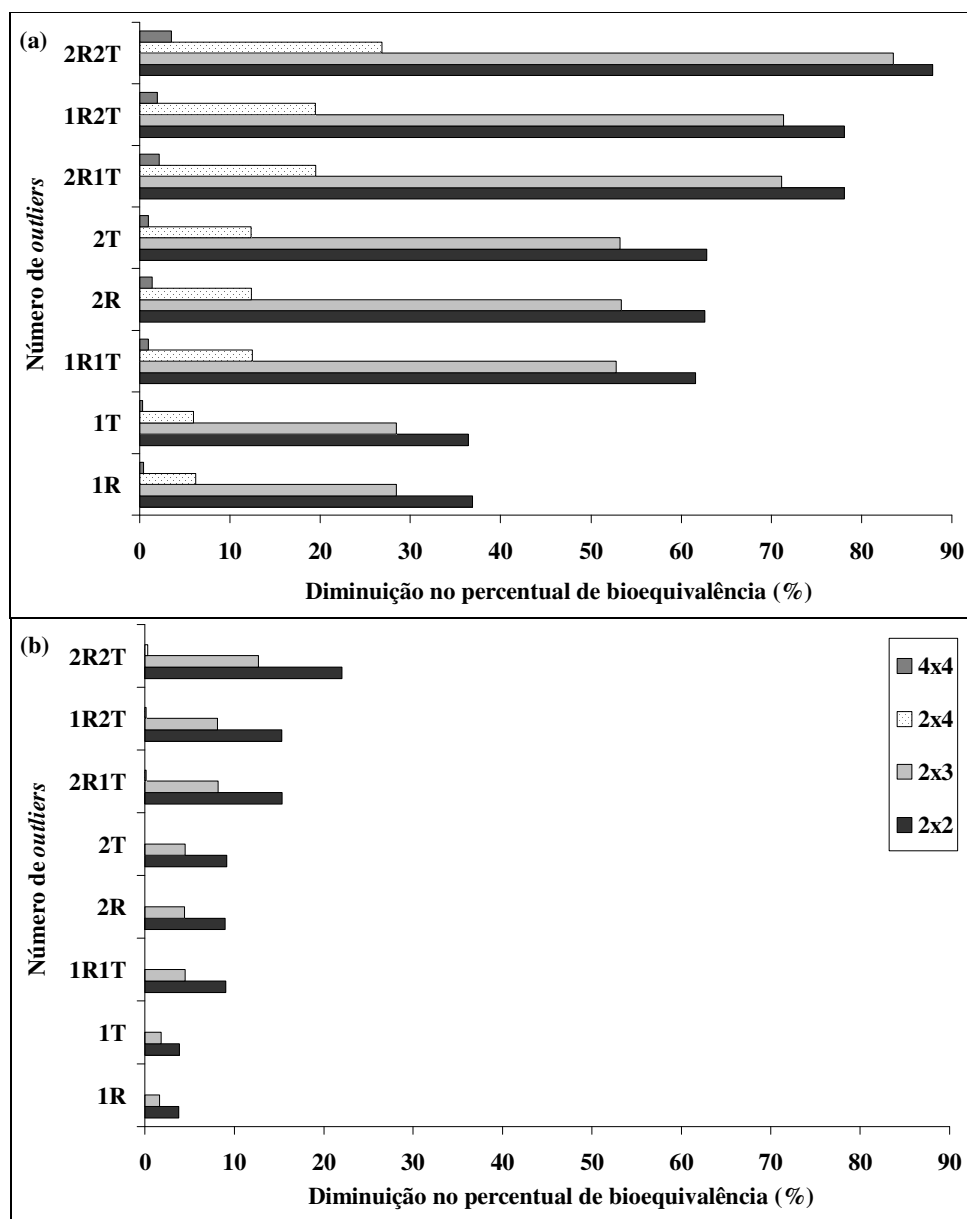


Figura 4.4: Percentual de diminuição no percentual de bioequivalência com o aumento do número de outliers para os delineamentos 2x2, 2x3, 2x4 e 4x4: (a) $N=12$ e (b) $N=24$

4.1.3 Incerteza na estimativa da variabilidade

Muitas vezes não é possível encontrar na literatura o valor do *CV* do fármaco estudado para realizar o cálculo do número de voluntários. Além disso, nem sempre é possível realizar um estudo piloto para obter essa informação, principalmente pelo tempo e gastos envolvidos.

Para avaliar o efeito da utilização de um coeficiente de variação (*CV*) diferente do real no número de voluntários recrutados, foi calculado o número de voluntários total (*N*), com nível de significância de 5%, poder do teste de 80% e $\theta\gamma = 0,00$ para os delineamentos *cross-over* 2x2, 4x2, 2x3, 2x4 e 4x4. Além disso, foram considerados valores de *CV* entre 0,10 e 0,50. Para cada valor de *CV* tomado como sendo o real, foram calculados quantos voluntários seriam recrutados a menos (a mais) quando o valor de *CV* usado é menor (maior) do que o verdadeiro valor.

A Tabela 4.5 apresenta os resultados para valores selecionados de *CV* (intra-individual). Foi observado que ao utilizar um *CV* inferior ao real para os cálculos do número de voluntários o resultado do estudo pode ser comprometido, uma vez que será utilizado um número de voluntários menor que o necessário diminuindo também o poder do teste utilizado. Por outro lado, a utilização de um *CV* maior que o real leva a um aumento excessivo e desnecessário, portanto elevando o custo do estudo. Quando o *CV* verdadeiro é 0,20 e o *CV* usado para o cálculo do número de voluntários é maior como 0,25, por exemplo, o número de voluntários a mais é 14 no 2x2, 6 no 2x3 e 4 no 2x4. Quando o *CV* verdadeiro é como 0,30 e o *CV* usado para o cálculo do número de voluntários é menor como 0,20, por exemplo, o número total de voluntários a menos é 32 no 2x2, 6 no 2x3 e 4 no 2x4.

A Figura 4.5 mostram o aumento da razão entre o número de voluntários calculado e o número de voluntários necessários (calculado com o *CV* real) considerando *CV* real igual a 0,12 e 0,50, respectivamente.

Quando *CV* real é 0,12 a razão entre o número de voluntários calculado e o número de voluntários necessários (calculado com o *CV* real) aumenta de forma semelhante para os delineamentos 4x2, 2x3 e 2x4. Para o 2x2 esse aumento é mais rápido e para o 4x4 mais lento. O aumento da razão é menor até *CV* = 0,20 aumentando de forma mais acelerada a partir deste ponto. Para o delineamento 2x4 e supondo que o *CV* real seja 0,12, se for utilizado o valor 0,20 para calcular o número de voluntários necessários, o dobro do número de voluntários necessários para atingir o poder de 80% deverá ser recrutado, enquanto que para o *cross-over* 2x2 o aumento seria de 2,5 vezes.

Tabela 4.5: Diferença entre o número total de voluntários (N) calculado quando o valor de CV é mal especificado e o valor correto para vários delineamentos (poder = 80%)

Delineamento <i>cross-over</i>	CV real	N	CV utilizado no cálculo do número de voluntários									
			0,12	0,15	0,18	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
2x2	0,12	12	0	6	12	18	32	50	70	92	118	144
	0,15	18	-6	0	6	12	26	44	64	86	112	138
	0,18	24	-12	-6	0	6	20	38	58	80	106	132
	0,20	30	-18	-12	-6	0	14	32	52	74	100	126
	0,25	44	-32	-26	-20	-14	0	18	38	60	86	112
	0,30	62	-50	-44	-38	-32	-18	0	20	42	68	94
	0,35	82	-70	-64	-58	-52	-38	-20	0	22	48	74
	0,40	104	-92	-86	-80	-74	-60	-42	-22	0	26	52
	0,45	130	-118	-112	-106	-100	-86	-68	-48	-26	0	26
0,50	156	-144	-138	-132	-126	-112	-94	-74	-52	-26	0	
4x2	0,12	16	0	4	12	16	32	48	68	92	116	144
	0,15	20	-4	0	8	12	28	44	64	88	112	140
	0,18	28	-12	-8	0	4	20	36	56	80	104	132
	0,20	32	-16	-12	-4	0	16	32	52	76	100	128
	0,25	48	-32	-28	-20	-16	0	16	36	60	84	112
	0,30	64	-48	-44	-36	-32	-16	0	20	44	68	96
	0,35	84	-68	-64	-56	-52	-36	-20	0	24	48	76
	0,40	108	-92	-88	-80	-76	-60	-44	-24	0	24	52
	0,45	132	-116	-112	-104	-100	-84	-68	-48	-24	0	28
0,50	160	-144	-140	-132	-128	-112	-96	-76	-52	-28	0	
2x3	0,12	6	0	2	4	6	12	18	26	34	44	54
	0,15	8	-2	0	2	4	10	16	24	32	42	52
	0,18	10	-4	-2	0	2	8	14	22	30	40	50
	0,20	12	-6	-4	-2	0	6	12	20	28	38	48
	0,25	18	-12	-10	-8	-6	0	6	14	22	32	42
	0,30	24	-18	-16	-14	-12	-6	0	8	16	26	36
	0,35	32	-26	-24	-22	-20	-14	-8	0	8	18	28
	0,40	40	-34	-32	-30	-28	-22	-16	-8	0	10	20
	0,45	50	-44	-42	-40	-38	-32	-26	-18	-10	0	10
0,50	60	-54	-52	-50	-48	-42	-36	-28	-20	-10	0	
2x4	0,12	4	0	2	4	4	8	12	18	24	30	36
	0,15	6	-2	0	2	2	6	10	16	22	28	34
	0,18	8	-4	-2	0	0	4	8	14	20	26	32
	0,20	8	-4	-2	0	0	4	8	14	20	26	32
	0,25	12	-8	-6	-4	-4	0	4	10	16	22	28
	0,30	16	-12	-10	-8	-8	-4	0	6	12	18	24
	0,35	22	-18	-16	-14	-14	-10	-6	0	6	12	18
	0,40	28	-24	-22	-20	-20	-16	-12	-6	0	6	12
	0,45	34	-30	-28	-26	-26	-22	-18	-12	-6	0	6
0,50	40	-36	-34	-32	-32	-28	-24	-18	-12	-6	0	
4x4	0,12	8	0	0	0	0	4	8	16	20	28	32
	0,15	8	0	0	0	0	4	8	16	20	28	32
	0,18	8	0	0	0	0	4	8	16	20	28	32
	0,20	8	0	0	0	0	4	8	16	20	28	32
	0,25	12	-4	-4	-4	-4	0	4	12	16	24	28
	0,30	16	-8	-8	-8	-8	-4	0	8	12	20	24
	0,35	24	-16	-16	-16	-16	-12	-8	0	4	12	16
	0,40	28	-20	-20	-20	-20	-16	-12	-4	0	8	12
	0,45	36	-28	-28	-28	-28	-24	-20	-12	-8	0	4
0,50	40	-32	-32	-32	-32	-28	-24	-16	-12	-4	0	

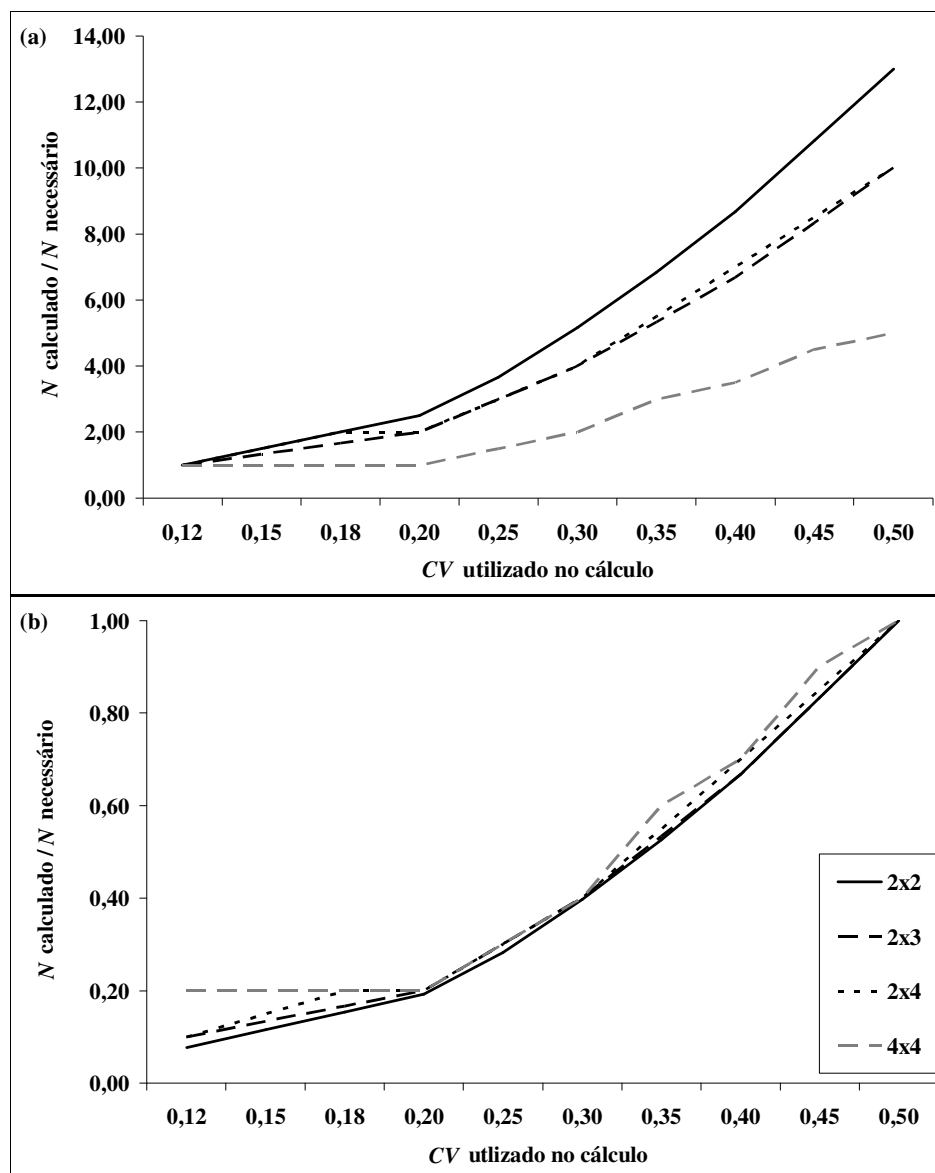


Figura 4.5: Razão entre o número de voluntários calculado e o número de voluntários necessários em função do CV utilizado no cálculo: (a) CV real = 0,12; (b) CV real = 0,50

Em uma situação de alta variabilidade com CV real de 0,50, a razão entre o número de voluntários calculado e o número de voluntários necessários (calculado com o CV real) aumenta de forma semelhante para todos os delineamentos. Se for utilizado CV = 0,20 para estimar o número de voluntários quando o CV real é 0,50 o número de voluntários será aproximadamente 20% do número de voluntários que seria de fato necessário para obter o poder de 80%.

É possível verificar a diminuição no percentual de bioequivalência quando CV usado nos cálculos não é o CV real. Os delineamentos *cross-over* 2x2, 2x3 e 2x4 foram os utilizados nesta análise em que foi possível verificar o impacto do aumento do número de períodos neste contexto.

A Tabela 4.6 mostra os percentuais de conclusão de bioequivalência quando o valor de *CV* é mal especificado para os delineamentos *cross-over* 2x2, 2x3 e 2x4, respectivamente. Quanto maior o valor de *CV*, maior é o percentual de conclusão de bioequivalência. Quando o *CV* verdadeiro é 0,12 e o *CV* usado para o cálculo do número de voluntários é maior como 0,15, por exemplo, o percentual de conclusão de bioequivalência aumenta em 14,09 pontos percentuais no *cross-over* 2x2, 15,79 no 2x3 e 25,49 no 2x4. Quando o *CV* verdadeiro é alto como 0,50, por exemplo, e o *CV* usado para o cálculo do número de voluntários é menor como 0,45, por exemplo, o percentual de conclusão de bioequivalência diminui em 10,08 pontos percentuais no *cross-over* 2x2, 10,38 no 2x3 e 7,17 no 2x4.

A Figura 4.6 apresenta o aumento dos percentuais de conclusão de bioequivalência com o aumento do *CV* utilizado no cálculo do número de voluntários para os delineamentos *cross-over* 2x2, 2x3 e 2x4 com o aumento do coeficiente de variação (*CV*). Para os três casos apresentados (*CV* = 0,12, 0,20 e 0,50), o *cross-over* 2x4 é o que apresenta maior percentual de bioequivalência, apesar da diferença para os outros delineamentos ser pequena.

Tabela 4.6: Percentuais de bioequivalência quando o valor de *CV* é mal especificado (poder = 80%)

Delineamento <i>cross-over</i>	CV real	N	CV utilizado no cálculo do número de voluntários									
			0,12	0,15	0,18	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
2x2	0,12	12	82,68	96,77	99,40	99,91	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,15	18	56,33	83,80	94,40	98,07	99,84	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,18	24	32,05	62,41	81,94	90,78	98,54	99,85	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,20	30	19,56	48,92	70,39	82,41	95,88	99,46	99,92	100,00	100,00	100,00
	0,25	44	6,08	19,73	39,91	56,25	81,80	94,02	98,31	99,61	99,93	99,99
	0,30	62	1,73	5,76	16,10	30,91	59,55	81,02	91,85	97,25	99,30	99,72
	0,35	82	0,56	1,47	4,89	11,67	37,54	63,48	79,78	90,55	96,11	98,72
	0,40	104	0,19	0,43	1,23	4,22	20,24	46,05	65,09	80,24	89,73	94,66
	0,45	130	0,07	0,14	0,31	0,94	7,82	29,22	50,60	67,35	80,91	88,94
0,50	156	0,03	0,02	0,07	0,20	2,58	16,68	37,15	54,42	69,48	79,50	
2x3	0,12	6	75,50	91,29	96,96	98,95	99,95	99,99	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,15	8	54,83	77,45	89,36	94,84	99,47	99,95	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,18	10	36,92	59,48	75,79	85,98	97,43	99,61	99,96	100,00	100,00	100,00
	0,20	12	27,96	47,54	65,09	77,61	94,60	98,81	99,84	99,99	100,00	100,00
	0,25	18	13,94	24,96	38,86	52,65	80,93	92,61	98,12	99,54	99,92	99,99
	0,30	24	7,42	12,22	20,39	30,64	61,18	80,05	92,23	97,03	99,24	99,80
	0,35	32	4,03	6,33	10,03	15,87	40,98	63,22	81,45	90,90	96,51	98,68
	0,40	40	2,41	3,21	5,03	7,85	24,56	45,88	67,54	80,85	90,61	95,49
	0,45	50	1,52	1,82	2,64	3,88	13,33	30,15	52,73	69,08	82,08	89,81
0,50	60	0,96	1,03	1,37	1,96	6,90	17,92	38,01	56,17	71,76	82,14	
2x4	0,12	4	72,44	97,93	99,86	99,88	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,15	6	53,45	89,08	97,95	97,91	99,94	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,18	8	38,27	74,59	91,25	91,28	99,13	99,90	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,20	8	31,04	63,40	84,29	84,02	97,44	99,65	99,98	100,00	100,00	100,00
	0,25	12	19,14	39,81	61,51	61,47	86,92	95,80	99,26	99,90	99,98	100,00
	0,30	16	12,27	24,18	40,77	40,55	70,00	86,00	95,81	98,78	99,64	99,90
	0,35	22	8,48	14,85	25,58	25,38	52,04	72,05	87,98	95,00	97,99	99,18
	0,40	28	6,06	9,41	15,81	16,08	36,36	56,98	76,98	88,19	94,04	97,06
	0,45	34	4,45	6,25	10,02	9,81	24,05	42,59	65,17	79,20	87,75	92,69
0,50	40	3,43	4,17	6,32	6,32	15,93	30,85	53,03	68,90	79,78	86,95	

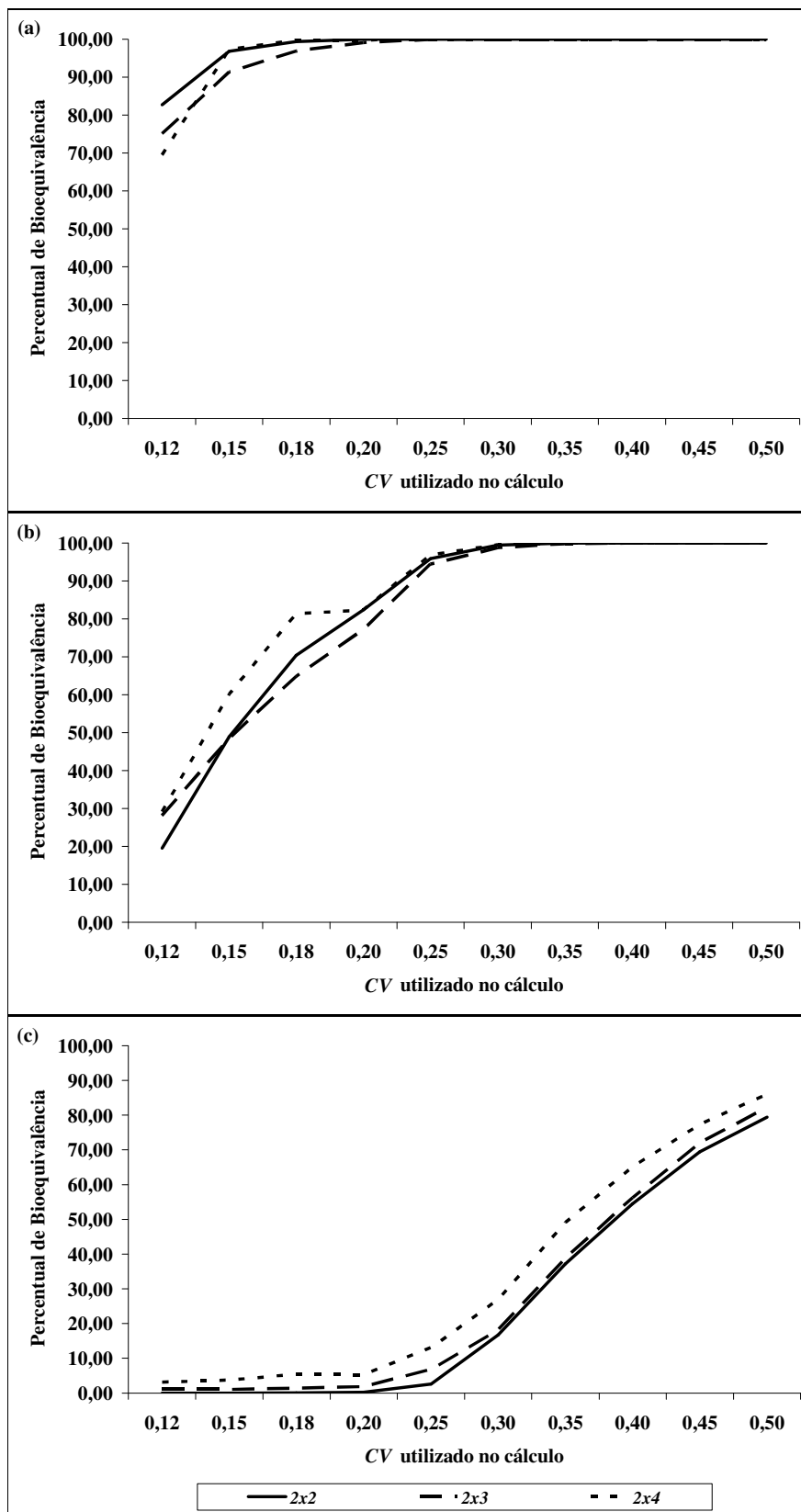


Figura 4.6: Percentuais de bioequivalência quando o valor de CV é mal especificado para os delineamentos *cross-over* 2x2, 2x3 e 2x4: (a) $CV_{real} = 0,12$; (b) $CV_{real} = 0,20$; $CV_{real} = 0,50$

4.1.4 Desistências

Um ponto fraco dos delineamentos *cross-over* replicados é que o aumento no número de períodos pode levar a um aumento no número de participantes que desistem (*dropouts*), podendo comprometer o sucesso do estudo.

Para verificar o impacto dessas desistências no decorrer de um estudo de bioequivalência foram simuladas algumas situações e verificado o percentual de conclusão de bioequivalência. Os parâmetros utilizados foram os mesmos usados nas simulações anteriores: nível de significância de 5%, poder do teste de 80%, média ($\mu^* = 4,37$), variação inter-individual ($\sigma_s^* = 0,20$), variação intra-individual ($\sigma_e^* = 0,19$) e diferença entre as médias populacionais ($\theta_\gamma = 0,00$) e os delineamentos *cross-over* 2x2, 2x3 e 2x4.

Para simular o número de desistências foi utilizada a distribuição binomial com n_k participantes no início do estudo na seqüência k e probabilidade de desistência no j -ésimo período, p_j . A Figura 4.7 mostra o esquema usado na simulação para o delineamento *cross-over* 2x3.

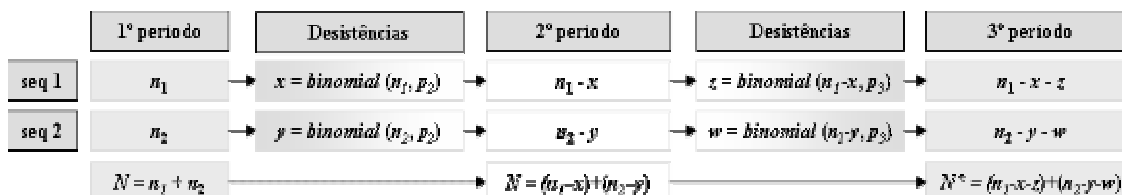


Figura 4.7: Esquema usado na simulação das desistências para o delineamento *cross-over* 2x3

As Tabelas 4.7 a 4.9 apresentam os resultados respectivamente para os delineamentos *cross-over* 2x2, 2x3 e 2x4. Foram consideradas diversas combinações de percentual de desistência para os períodos, sempre considerando que a probabilidade de desistência em um período é no mínimo igual à probabilidade de desistências no período anterior. Além disso, não foram consideradas desistências no primeiro período uma vez que nesse caso o voluntário pode ser substituído a tempo, descaracterizando perda de informação.

Para o delineamento *cross-over* 2x2, o número de desistências é sempre menor que nos demais pois só um período deve ser considerado para ocorrência do evento. Além disso, o impacto dessas desistências é pequeno e não compromete o poder do estudo. Já para o *cross-over* 2x3 há uma perda de poder considerável para os casos em que N é menor que 13, pois a perda de apenas dois voluntários pode fazer com que o percentual de bioequivalência fique abaixo de 80%. O delineamento *cross-over* 2x4 é o que apresenta o maior número de desistências.

Tabela 4.7: Percentual de bioequivalência e número total de voluntários segundo a probabilidade de desistência para o *cross-over* 2x2 (nível de significância = 5%, poder = 80%, $\theta_\gamma = 0,00$ e $\sigma_e^* = 0,19$)

Probabilidade de desistência 2º período (p_2)	Número de voluntários inicial	Desistências	Número de voluntários restantes	Percentual de bioequivalência
0,00	12	0	12	69,89
	16	0	16	86,81
	20	0	20	94,55
	24	0	24	97,77
	28	0	28	99,10
	32	0	32	99,69
	36	0	36	99,89
0,01	12	0	12	69,89
	16	0	16	86,81
	20	2	18	91,10
	24	0	24	97,77
	28	0	28	99,10
	32	2	30	99,48
	36	0	36	99,89
0,02	12	0	12	69,89
	16	0	16	86,81
	20	2	18	91,10
	24	0	24	97,77
	28	2	26	98,60
	32	6	26	98,55
	36	2	34	99,79
0,03	12	0	12	69,89
	16	2	14	78,73
	20	4	16	84,02
	24	0	24	97,77
	28	2	26	98,60
	32	6	26	98,55
	36	2	34	99,79

Tabela 4.8: Percentual de bioequivalência e número total de voluntários segundo a probabilidade de desistência para o *cross-over* 2x3 (nível de significância = 5%, poder = 80%, $\theta_\gamma = 0,00$ e $\sigma_e^* = 0,19$)

Probabilidade de desistência		Número de voluntários inicial	Desistências	Número de voluntários restantes	Percentual de bioequivalência
2º período (p_2)	3º período (p_3)				
0,00	0,00	12	0	12	81,34
		16	0	16	93,20
		20	0	20	97,59
		24	0	24	99,18
		28	0	28	99,71
		32	0	32	99,92
		36	0	36	99,97
0,01	0,01	12	2	10	67,27
		16	0	16	93,20
		20	2	18	95,66
		24	4	20	97,59
		28	6	22	98,58
		32	2	30	99,81
		36	2	34	99,95
0,01	0,02	12	2	10	67,27
		16	0	16	93,20
		20	2	18	95,66
		24	4	20	97,59
		28	8	20	97,12
		32	10	22	97,89
		36	2	34	99,95
0,02	0,03	12	2	10	67,27
		16	0	16	93,20
		20	4	16	93,20
		24	10	14	87,93
		28	10	18	95,69
		32	10	22	98,60
		36	4	32	99,90
0,02	0,02	12	2	10	67,27
		16	0	16	93,20
		20	2	18	95,66
		24	4	20	97,59
		28	8	20	97,12
		32	10	22	97,89
		36	2	34	99,95
0,03	0,03	12	2	10	67,27
		16	0	16	93,20
		20	4	16	93,20
		24	10	14	87,93
		28	10	18	95,69
		32	10	22	98,60
		36	4	32	99,90
0,03	0,03	12	2	10	67,27
		16	0	16	93,20
		20	4	16	93,20
		24	10	14	87,93
		28	12	16	93,20
		32	12	20	94,83
		36	6	30	99,81

Tabela 4.9: Percentual de bioequivalência e número total de voluntários segundo a probabilidade de desistência para o *cross-over* 2x4 (nível de significância = 5%, poder = 80%, $\theta_\gamma = 0,00$ e $\sigma_e^* = 0,19$)

Probabilidade de desistência			Número de voluntários inicial	Desistências	Número de voluntários restantes	Percentual de bioequivalência	
2º período (p_2)	3º período (p_3)	4º período (p_4)					
0,01	0,01	0,01	12	2	10	90,38	
			16	2	14	98,54	
			20	0	20	99,92	
			24	8	16	99,21	
			28	4	24	99,99	
			32	2	30	100,00	
			36	4	32	100,00	
	0,01	0,02	0,02	12	2	10	90,38
				16	2	14	98,54
				20	0	20	99,92
				24	10	14	98,50
				28	2	26	100,00
				32	2	30	100,00
				36	4	32	100,00
	0,01	0,03	0,03	12	2	10	90,38
				16	2	14	98,54
				20	0	20	99,92
				24	12	12	96,63
				28	2	26	100,00
				32	4	28	100,00
				36	4	32	100,00
	0,02	0,02	0,02	12	2	10	90,38
				16	2	14	98,54
				20	4	16	99,52
				24	8	16	99,52
				28	8	20	99,69
				32	4	28	100,00
				36	4	32	100,00
0,02	0,03	0,03	12	2	10	90,38	
			16	2	14	98,54	
			20	4	16	99,52	
			24	8	16	99,52	
			28	8	20	99,69	
			32	6	26	100,00	
			36	10	26	100,00	
0,03	0,03	0,03	12	2	10	90,38	
			16	4	12	94,46	
			20	6	14	98,50	
			24	14	10	71,36	
			28	6	22	99,97	
			32	2	30	100,00	
			36	6	30	100,00	

4.2 Simulação da curva de concentração individual

Para que duas formulações sejam declaradas bioequivalentes, a ANVISA exige que esta declaração ocorra tanto para ASC quanto para C_{max} . Da forma como foram feitas as simulações nas seções anteriores não era possível verificar se havia alguma divergência de resultados para as duas medidas, assim foi simulada agora a curva de concentração individual de cada indivíduo e a partir dela foram calculadas as medidas farmacocinéticas.

A curva de concentração versus tempo é dada por:

$$C(t) = \frac{DK_a}{Vd(K_a - K_e)} [e^{K_e t} - e^{K_a t}], \quad (4.1)$$

onde D é a dose administrada, K_a a constante de absorção, K_e a constante de eliminação e Vd o volume de distribuição.

Assumindo o total de m tempos de coletas t_1, t_2, \dots, t_m , a estimação para ASC_t usando a regra dos trapezóides é dada por:

$$ASC_t = \sum_{i=1}^c \left[\frac{C_{t_{i-1}} + C_i}{2} \right] (t_i - t_{i-1}) \quad (4.2)$$

Inicialmente foram fixados os seguintes 17 tempos de coletas (em horas): 0, 0,5, 1, 1,33, 1,67, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 10, 12, 16. Através de simulações de Monte Carlo, foram calculados os valores referentes a cada tempo para a construção da curva de concentração plasmática segundo uma distribuição log-normal, com número de total de voluntários por grupo de $N = 16, 20, 24$ e 28 .

Os valores para K_a e K_e foram obtidos através de duas distribuições log-normais, cada um com um valor específico para a média e o desvio-padrão de cada seqüência do estudo. É razoável assumir que D e Vd são constantes, já que os estudos de bioequivalência são conduzidos em voluntários sadios, assim fixamos os valores 400 mg e 10 litros para D e Vd , respectivamente. Os parâmetros utilizados nas simulações são apresentados na Tabela 4.9.

Em seguida foi utilizado o procedimento de teste de Schiurmann e o intervalo com 90% de confiança para avaliar bioequivalência média.

As Tabelas com os percentuais de bioequivalência para os 27 casos da Tabela 4.10 para os delineamentos *cross-over* 2x2, 4x2, 2x3, 2x4 e 4x4, são apresentadas no ANEXO B.

Tabela 4.10: Parâmetros considerados na simulação para a constante de eliminação (Ke) e constante de absorção (Ka)

Caso	$Ke = 0,05$		Caso	$Ke = 0,07$		Caso	$Ke = 0,09$	
	KaR	KaT		KaR	KaT		KaR	KaT
1	0,60	0,50	10	0,60	0,50	19	0,60	0,50
2	0,60	0,60	11	0,60	0,60	20	0,60	0,60
3	0,60	0,70	12	0,60	0,70	21	0,60	0,70
4	0,70	0,50	13	0,70	0,50	22	0,70	0,50
5	0,70	0,60	14	0,70	0,60	23	0,70	0,60
6	0,70	0,70	15	0,70	0,70	24	0,70	0,70
7	0,80	0,50	16	0,80	0,50	25	0,80	0,50
8	0,80	0,60	17	0,80	0,60	26	0,80	0,60
9	0,80	0,70	18	0,80	0,70	27	0,80	0,70

R: formulação referência, T: formulação teste

A Figura 4.8 apresenta os percentuais de conclusão de bioequivalência para C_{max} e ASC_t para seis casos selecionados. Quanto mais próximos os valores de KaR e KaT maiores os percentuais de conclusão de bioequivalência e mais próximos os resultados para as duas medidas. Além disso, quanto maior o valor de Ke menores são os percentuais de conclusão de bioequivalência e mais discrepantes são os resultados para C_{max} e ASC_t . Os piores resultados foram observados no caso 25 ($KaR=0,80$, $KaT=0,50$ e $Ke=0,09$) que está no grupo com maior Ke e possui os valores mais extremos de KaR e KaT dentre os apresentados.

Os percentuais de conclusão de bioequivalência para C_{max} são menores que para ASC_t , na maioria dos casos, o que nos leva a questionar a qualidade da medida C_{max} para avaliar a velocidade de absorção.

Em todos os casos o *cross-over* 4x2 apresenta os menores percentuais de conclusão de bioequivalência tanto para C_{max} quanto para ASC_t . Os delineamentos 2x4 e 4x4 apresentam os maiores percentuais de conclusão de bioequivalência em todos os casos, além de apresentarem as menores diferenças entre C_{max} e ASC_t .

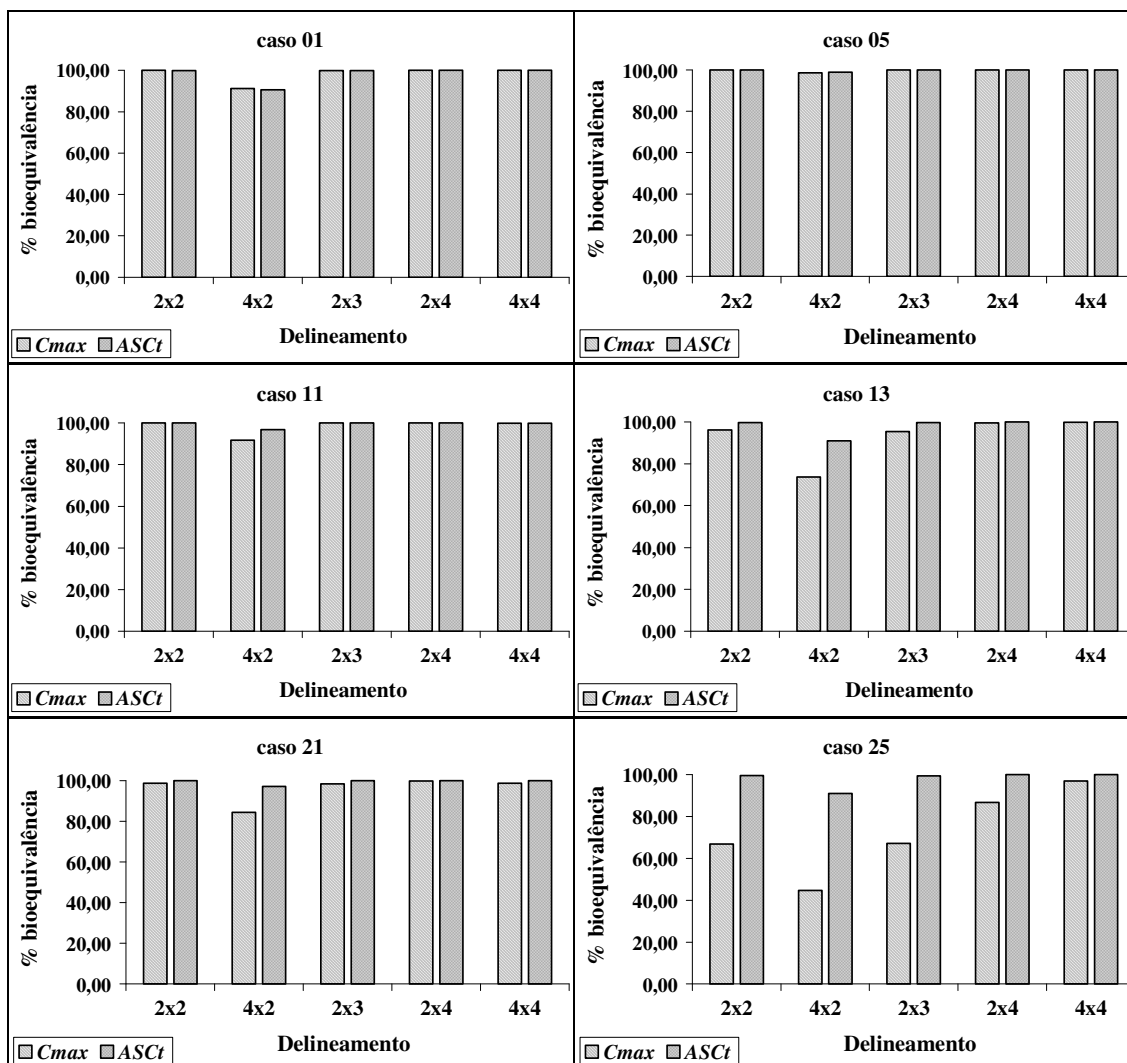


Figura 4.8: Percentuais de conclusão de bioequivalência para C_{max} e ASC_t para 6 casos selecionados

4.3 Resumo do capítulo

O Quadro 4.1 apresenta um resumo das análises abordadas no Capítulo 4. São apresentados os resultados referentes ao percentual de conclusão de bioequivalência, presença de observações atípicas, incerteza na estimativa de variabilidade e desistências, para os delineamentos *cross-over* 2x2, 2x3, 2x4 e 4x4.

Quadro 4.1: Resumo dos resultados obtidos através das simulações para os delineamentos *cross-over* 2x2, 2x3, 2x4 e 4x4.

Análise	Delineamento <i>cross-over</i>			
	2x2	2x3	2x4	4x4
Percentual de Conclusão de Bioequivalência	<ul style="list-style-type: none"> Alto percentual para $CV < 20\%$ ou para CV entre 20% e 30% com número de voluntários acima de 24. Para $CV > 30$ não possui bons resultados. 	<ul style="list-style-type: none"> Alto percentual para $CV < 25\%$ ou para CV entre 25% e 30% com número de voluntários acima de 20. Para $CV > 30\%$ usar mais de 30 voluntários. 	<ul style="list-style-type: none"> Alto percentual para $CV < 30\%$ ou para CV entre 30% e 40% com número de voluntários acima de 24. 	<ul style="list-style-type: none"> Alto percentual mesmo para altos valores de CV.
Presença de Observações Atípicas (Outliers)	<ul style="list-style-type: none"> É o delineamento mais afetado pela presença de <i>outliers</i>. Grande diminuição no percentual de bioequivalência. 	<ul style="list-style-type: none"> Grande diminuição no percentual de bioequivalência para N pequeno (< 16). Pouco afetado nos demais casos. 	<ul style="list-style-type: none"> Mesmo para número pequeno de voluntários a diminuição no percentual de bioequivalência é baixa. 	<ul style="list-style-type: none"> Praticamente não é afetado pela presença de <i>outliers</i>.
Incerteza na Estimativa da Variabilidade	<ul style="list-style-type: none"> Grande aumento ou diminuição no número de voluntários ao utilizar CV incorreto. Uma diferença de 3% no CV utilizado aumenta ou diminui até 6 voluntários (3 por seqüência) para CV em torno de 20%. 	<ul style="list-style-type: none"> Uma diferença de 3% no CV utilizado aumenta ou diminui até 4 voluntários (2 por seqüência) para CV em torno de 20%. 	<ul style="list-style-type: none"> Pequeno aumento ou diminuição no número de voluntários ao utilizar CV incorreto. Em muitos casos não há aumento ou diminuição ao utilizar CV com diferença de até 2%. 	<ul style="list-style-type: none"> Pequeno aumento ou diminuição no número de voluntários ao utilizar CV incorreto. Em muitos casos não há aumento nem diminuição no número de voluntários mesmo quando CV não é exatamente o real.
Desistências	<ul style="list-style-type: none"> Poucas desistências. Pouca diminuição no percentual de bioequivalência. 	<ul style="list-style-type: none"> Alto impacto para poucos voluntários. Considerável diminuição no percentual de bioequivalência. 	<ul style="list-style-type: none"> Muitas desistências. Pouca diminuição no percentual de bioequivalência. 	<p>-----</p>

5 Conclusões

No Brasil, a introdução de medicamentos genéricos no mercado foi sem dúvida um grande avanço no setor de saúde. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), responsável pela regulação deste mercado estabelece normas para a comercialização destes medicamentos. A regulação vigente exige a realização de testes que comparam a biodisponibilidade de duas formulações de um mesmo fármaco através do método chamado bioequivalência média em que apenas a média é comparada e a legislação atual restringe-se praticamente ao delineamento *cross-over* 2x2. Tanto o método como o delineamento possuem limitações que foram discutidas neste trabalho.

Além da bioequivalência média, foram descritos brevemente os métodos de bioequivalência individual e populacional. Não é possível realizar a comparação de bioequivalência individual através do delineamento *cross-over* 2x2. A comparação destes três métodos pode ser aprofundada e é uma sugestões para trabalhos futuros.

O delineamento *cross-over* 2x2 é o mais utilizado em estudos de bioequivalência média. É um delineamento simples, já implementado em pacotes estatísticos específicos para análise de bioequivalência. Entretanto, para fármacos com alta variabilidade este delineamento requer um número muito grande de voluntários para que o teste de bioequivalência possa atingir poder de pelo menos 80%, recomendado pela ANVISA. Além disso, o teste de Schuirmann para este delineamento não é capaz de detectar a presença de interação do indivíduo com a formulação. Nos casos mencionados, é recomendado o uso de delineamentos *cross-over* de ordem maior que 2x2.

Dois laboratórios podem se associar para testar suas formulações (T_1 e T_2) de um mesmo medicamento em comparação com uma formulação referência (R), o que pode representar redução de custos da realização do estudo. Nesta situação também são utilizados delineamentos *cross-over* de ordem maior que 2x2. Os mais utilizados para comparação de mais de duas formulações são o 6x3 e 4x4 para três e quatro formulações, respectivamente.

Quando a resposta farmacocinética apresenta baixa variabilidade não é preciso utilizar delineamento *cross-over* de ordem maior que 2x2 uma vez que não haverá uma redução significativa do número de voluntários por seqüência necessários para o estudo, mas sim um grande aumento no número de medidas e conseqüentemente nos gastos envolvidos na realização do estudo. Já para medicamentos que apresentam alta variabilidade intra-individual ($CV \geq 30\%$) para as respostas farmacocinéticas é interessante utilizar delineamentos como o *cross-over* 2x3, o 2x4 e o 4x4, pois é possível reduzir o número de voluntários por seqüência envolvidos no estudo sem aumentar muito o número de amostras

coletadas. Além disso, o poder pode ser aumentado às custas do acréscimo de períodos e/ou seqüências. Isto nem sempre é viável por restrições de tempo e recursos financeiros, como na comparação de formulações de um fármaco com meia-vida muito longa. Nestes casos, o período de *washout* torna-se inviável, sendo portanto recomendada inclusive a utilização de um delineamento paralelo.

As aproximações utilizadas para cálculo do número de voluntários devem ser utilizadas de forma criteriosa, uma vez que cada uma delas é adequada para uma determinada situação. Quando $\theta_\gamma = 0,00$ é recomendado utilizar a aproximação conservadora e à medida que θ_γ se afasta de zero a aproximação não conservadora. Em todos os casos as aproximações pelas distribuições t de Student central e Normal são adequadas.

Os delineamentos *cross-over* 4x4 e 2x4 apresentaram desempenho superior aos demais nas diversas situações práticas abordadas. Independente da variabilidade do fármaco, estes dois delineamentos, além do 2x3, em alguns casos, tiveram um percentual de bioequivalência maior. Em situações em que a variabilidade intra-individual do fármaco é alta ($CV \geq 30\%$), a superioridade destes delineamentos é ainda maior. Nestes casos o 2x2 não apresenta um bom desempenho e o 4x2 apresenta os piores resultados em todas as situações.

Quando a variabilidade do fármaco não é conhecida por falta de literatura e inviabilidade de realização de um estudo piloto, é recomendável ter a postura a mais conservadora possível (ou seja assumir *CV* alto e recrutar o maior número possível de voluntários); este conservadorismo vale mesmo em situações em que o *CV* é conhecido. Entretanto, quanto maior o *CV* maior será o número de voluntários e maior será o custo do estudo, um custo que pode ser, muitas vezes, desnecessário ou inviável. A razão entre o número de voluntários calculado e o número de voluntários necessários (calculado com o *CV* real) aumenta de forma semelhante para todos os delineamentos.

A presença de observações atípicas (*outliers*), muitas vezes impossível de se controlar mesmo em estudos bem planejados, resulta em uma diminuição no percentual de bioequivalência proporcional ao aumento do número de *outliers* em todos os delineamentos estudados, sendo que o *cross-over* 2x2 é o mais afetado. Para evitar estes problemas é necessário um bom planejamento com a escolha de voluntários homogêneos e uma aleatorização cuidadosa.

É importante lembrar que o aumento do número de períodos em um estudo de bioequivalência pode elevar o número de desistências. Isso deve ser considerado ao estabelecer o número de voluntários que participarão do estudo. Espera-se que para o delineamento *cross-over* 2x2, o número de desistências seja menor que nos demais, pois só um período deve ser considerado para ocorrência do evento.

Apesar da possibilidade de desistências no delineamento *cross-over* 2x3 ser menor que no 2x4, o impacto no percentual de bioequivalência é maior neste delineamento, ou seja, uma desistência no 2x3 diminui mais o percentual de bioequivalência que uma desistência no 2x4.

Na maioria absoluta das vezes, o percentual de bioequivalência para a medida farmacocinética área sob a curva de concentração versus tempo (*ASC*) é maior do que para o pico de concentração máxima (C_{max}). Isto pode ser consequência do fato de que C_{max} não é uma medida pura da velocidade de absorção, sofre influência da extensão de absorção da droga, além de ser dependente do cronograma de coleta.

Foram simuladas apenas situações em que as formulações eram bioequivalentes e verificados os percentuais de conclusão de bioequivalência, e assim foi possível verificar casos em que apesar de haver bioequivalência entre as formulações, a conclusão é de não bioequivalência. Seria interessante simular situações em que as formulações não são bioequivalentes para verificar o percentual de conclusão de bioequivalência em diversas situações práticas e verificar os casos em que as formulações não são bioequivalentes, mas a conclusão é pela bioequivalência

Este trabalho traz uma contribuição relativamente ampla para os estudos de bioequivalência, do planejamento à análise, mas estudos adicionais são necessários para cobrir lacunas da literatura sobre o assunto, tais como:

- Comparar os métodos de bioequivalência média, individual e populacional;
- Fazer algumas extensões, por exemplo a construção da tabela de análise de variância para todos os delineamentos considerados;
- Investigar situações problemáticas, como desbalanceamento do número de voluntários e violação de pressupostos dos métodos estatísticos padrão para avaliar bioequivalência.

Não existe uma fórmula para escolha do melhor delineamento, nem sempre o delineamento mais simples é o mais adequado e por outro lado nem sempre é necessário utilizar delineamentos muito complexos. As características de cada estudo devem ser cuidadosamente avaliadas e deve-se sempre ter em mente que o compromisso da equipe de estudos de bioequivalência é com a qualidade do estudo e a confiabilidade dos resultados.

Referências

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE n. 1170, de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 24 abr. 2006.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. 135, de 17 de maio de 2002. Proceda à reavaliação toxicológica dos produtos técnicos e formulados à base dos ingredientes ativos Dicofol, Heptacloro, MSMA, Linuron, Captan, Folpet, Clorotalonil, Vinclozolin, Epoxiconazole, Procloraz, Clorpirifós. E institui comissão técnica para proceder à reavaliação procedida. *Diário Oficial da União*, Brasília, 22 maio 2002.
3. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Gerência Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos. *Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência*. Brasília: ANVISA, 2002. 2 v.
4. ABDEL-RAHMAN, S.M. *et. al.* The bioequivalence of nizatidine (Axid®) in two extemporaneously and one commercially prepared oral liquid formulations compared with capsule. *The Journal of Clinical Pharmacology*, Cambridge, v. 43, p. 148-153, feb. 2003.
5. BOTTER, D. A.; SINGER, J. M. Experiments with three-treatment three-period crossover design: analysis through the general linear model. *Biometrical Journal*, Zurich, v. 33, n. 4, p. 401-410, jan. 1991.
6. CHELLINI, P. R. *Boas práticas estatísticas em estudos de bioequivalência com delineamento crossover 2x2*. 2007. 71 f. (Mestrado em Estatística) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
7. CHEN, K. W.; CHOW, S. C.; Li, G. A note on sample size determination for bioequivalence studies with higher-order crossover designs. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, Netherland, v.25, n.6, p. 753-765, dec. 1997.
8. CHOW, S. C.; LIU, J. P. *Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies*. 2nd. New York: Marcel Dekker, 2000. 584 p.
9. CHOW, S. C.; SHAO, J.; WANG, H. *Sample Size Calculations in Clinical Research*. [S.l.]: Marcel Dekker, 2003. 358 p.
10. CHOW, S. C.; WANG, H. On sample size calculation in bioequivalence trials on sample size calculation in bioequivalence trials. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, Netherlands, v. 28, n. 2, p. 155-169, apr. 2001.
11. CHOW, S. C.; WANG, H. On statistical power for average bioequivalence testing under replicated crossover designs. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, Philadelphia, v.12, n.3, p. 295-309, aug. 2002.

12. DHAWAN, S. *et. al.* Bioavailability of immediate- and extended-release formulations of glipizide in healthy male volunteers, *Clinical Pharmacokinetics*, Yardley, v.45, n. 3, p. 317-324. 2006.
13. DONNER, A.; HAUCK, W. W.; ZOU, G. The impact of missing values in the concentration-time curve on the assessment of bioequivalence. *Pharmaceutical Statistics*, Hoboken, v.4, n. 2, p. 91-99, apr./jun. 2005.
14. GERLOFF, J. *et. al.* Pharmacokinetics and absolute bioavailability of lansoprazole. *European Journal of Clinical Pharmacology*, New York, v. 50, n. 4, p. 293-298, jun.1996.
15. HAUCK, W. W.; Anderson, S. Types for bioequivalence and related statistical
16. considerations. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, Elmont, v. 30, n. 5, p. 181-187, may. 1992.
17. HAUSCHKE, D.; STEINJANS, V.; PIGEOT, I. *Bioequivalence studies in drug development: methods and applications*. New York: John Wiley, 2007. 328 p.
18. JACOBSEN, L.V. *et. al.* Bioequivalence between ready-to-use recombinant human growth hormone (rhGH) in liquid formulation and rhGH for reconstitution. *Growth Hormone & IGF Research*, Orlando, v. 10, n. 2, p. 93-98, apr. 2000.
19. JONES, B.; KENWARD, M. G. *Design and analysis of crossover trials*. 2nd., London: Chapman and Hall, 2003. 412 p.
20. JULIOUS, S. A. Tutorial in biostatistics: sample sizes for clinical trials with normal data. *Statistics in Medicine*, Sheffield, v.23, n. 12, p. 1921-1986. 2004.
21. KIM, Y.C. *et. al.* Comparative bioavailability of silibinin in healthy male volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Elmont, v. 41, n. 2, p. 593-596, feb. 2003.
22. MEYER, M. C. *et. al.* Bioequivalence of methylphenidate immediate-release tablets using a replicated study design to characterize intrasubject variability. *Pharmaceutical Research*, Arlington, v. 17, n. 4, p. 381-384, apr. 2000.
23. PETERSON, S.; JONES, B. *Bioequivalence and statistics in clinical pharmacology*. New York: Chapman & Hall, 2006. 408 p.
24. QU, R.P.; ZHENG, H. Sample size calculation for bioequivalence studies with high-order crossover designs. *Controlled Clinical Trials*, New York, v.24, n. 4, p. 436-439, aug. 2003.
25. RAMSAY, T.; ELKUM, N. A comparison of four different methods for outlier detection in bioequivalence studies. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, Philadelphia, v. 15, n.1, p. 43-52, dec. 2004.
26. RUMEL, D.; NISHOKA, S. de A.; SANTOS, A. A. M dos. Intercambialidade de medicamentos: abordagem clínica e o ponto de vista do consumidor. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 40, n. 5, p. 921-927, out. 2006
27. SIQUEIRA, A.L. *et al.* Comparison of sample size formulae for 2x2 cross-over designs applied to bioequivalence studies. *Pharmaceutical Statistics*, Hoboken, v.4, n. 4, p. 233-243, oct./dec. 2005.
28. SIX, K. *et. al.* Clinical study of solid dispersions of itraconazole prepared by hot-stage extrusion. *European Journal of Pharmaceutical Science*, New York, v. 24, n. 2/3, p. 179-186, feb. 2005.
29. SCHUIRMANN, D. J. On hypothesis testing to determinate if mean of a normal

30. distribution is continued in a known interval. *Biometrics*, Arlington, 37, 617 [abstract]. 1981.
31. WANG, W.; CHOW, S. C. Examining outlying subjects and outlying records in bioequivalence trials. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, Philadelphia, v. 13, n. 1, p. 43-56, feb. 2003.
32. WILLAVIZE, S. A.; MORGENTHIEN, E. A. Comparison of models for average bioequivalence in replicated crossover designs. *Pharmaceutical Statistics*, Hoboken, v.5, n. 3, p. 201-211, jul./set. 2006.
33. WILLIAMS, E. J. Experimental designs balanced for the estimation of residual effects of treatment. *Australian Journal of Scientific Research*, Sydney, v.2, n. 2, p. 149-168, jun. 1949.
34. ZHOU, J. *et al.* Cost-efficient higher-order crossover designs in comparative bioavailability studies, *Clinical Pharmacokinetics*, Yardley, v. 45, n.6. p. 623-632. 2006.
35. ZHOU, J. *et al.* Empirical power for higher-order crossover designs in comparative bioavailability clinical trials. *SAS Users Group International*, Philadelphia, n. 30, apr. 2005.

Anexo A

*Número total de voluntários (N)
obtido por meio de várias aproximações para os
delineamentos cross-over 2x2, 4x2, 2x3 e 4x4*

Tabela A.1: Número total de voluntários (N) obtido por meio de várias aproximações para o *cross-over* 2x2 em função da diferença das médias populacionais ($\theta\gamma$) e do coeficiente de variação (CV) (nível de significância = 5% e poder = 80%)

$\theta\gamma$	CV	σ_e^*	Distribuição								
			t não Central			t central			Normal		
			N_{nc}^1	N_{nc}^2	N_{nc}^3	N_c^1	N_c^2	N_c^3	N_z^1	N_z^2	N_z^3
0,00	0,10	0,10	6	6	6	6	6	6	4	4	4
	0,12	0,12	8	8	6	8	8	6	6	6	4
	0,14	0,14	10	10	8	10	10	8	8	8	6
	0,16	0,16	12	12	10	12	12	10	10	10	8
	0,18	0,18	14	14	10	14	14	10	12	12	8
	0,20	0,20	16	16	12	16	16	12	14	14	10
	0,22	0,22	18	18	14	20	20	14	18	18	12
	0,24	0,24	22	22	16	22	22	16	20	20	14
	0,26	0,26	24	24	18	26	26	18	24	24	18
	0,28	0,27	28	28	22	28	28	22	26	26	20
	0,30	0,29	32	32	24	32	32	24	30	30	22
	0,32	0,31	36	36	26	36	36	26	34	34	26
	0,34	0,33	40	40	30	40	40	30	38	38	28
	0,36	0,35	44	44	32	44	44	32	42	42	32
0,38	0,37	48	48	36	50	50	36	48	48	34	
0,40	0,39	54	54	40	54	54	40	52	52	38	
0,05	0,10	0,10	8	8	8	8	8	8	6	6	6
	0,12	0,12	10	8	8	12	10	8	10	8	6
	0,14	0,14	14	10	10	14	12	10	12	10	10
	0,16	0,16	18	14	14	18	14	14	16	12	12
	0,18	0,18	20	16	16	20	16	16	20	14	14
	0,20	0,20	24	20	18	26	20	18	24	18	18
	0,22	0,22	30	22	22	30	22	22	28	22	20
	0,24	0,24	34	26	26	34	26	26	34	24	24
	0,26	0,26	40	30	30	40	30	30	38	28	28
	0,28	0,27	46	34	34	46	34	34	44	34	32
	0,30	0,29	52	40	38	52	40	38	50	38	36
	0,32	0,31	58	44	42	58	44	42	56	42	42
	0,34	0,33	64	48	48	66	50	48	64	48	46
	0,36	0,35	72	54	52	72	54	52	70	52	52
0,38	0,37	80	60	58	80	60	58	78	58	56	
0,40	0,39	88	66	64	88	66	64	86	64	62	
0,10	0,10	0,10	14	10	10	14	10	10	12	10	10
	0,12	0,12	18	14	14	18	14	14	18	12	12
	0,14	0,14	24	18	18	24	18	18	22	16	16
	0,16	0,16	32	24	24	32	24	24	30	22	22
	0,18	0,18	38	28	28	38	28	28	38	28	28
	0,20	0,20	46	34	34	48	34	34	46	34	34
	0,22	0,22	56	40	40	56	42	42	54	40	40
	0,24	0,24	66	48	48	66	48	48	64	46	46
	0,26	0,26	76	56	56	76	56	56	74	54	54
	0,28	0,27	88	64	64	88	64	64	86	62	62
	0,30	0,29	100	72	72	100	72	72	98	72	72
	0,32	0,31	112	82	82	112	82	82	112	80	80
	0,34	0,33	126	92	92	126	92	92	124	90	90
	0,36	0,35	140	102	102	140	102	102	138	100	100
0,38	0,37	154	112	112	156	112	112	154	112	112	
0,40	0,39	170	124	124	170	124	124	168	122	122	

1 - Aproximação conservadora, 2 - Método completo, 3 - Aproximação não conservadora

$\theta\gamma$ = diferença das médias populacionais das formulações

CV = coeficiente de variação intra-individual (escala original)

σ_e^* = variabilidade intra-individual (escala logarítmica).

Tabela A.2: Número total de voluntários (N) obtido por meio de várias aproximações para o *cross-over* 4x2 em função da diferença das médias populacionais ($\theta\gamma$) e do coeficiente de variação (CV) (nível de significância = 5% e poder = 80%)

$\theta\gamma$	CV	σ_e^*	Distribuição								
			t não Central			t central			Normal		
			N_{nc}^1	N_{nc}^2	N_{nc}^3	N_c^1	N_c^2	N_c^3	N_z^1	N_z^2	N_z^3
0,00	0,10	0,10	12	12	12	12	12	12	8	8	8
	0,12	0,12	16	16	12	16	16	12	12	12	8
	0,14	0,14	20	20	16	20	20	16	16	16	12
	0,16	0,16	24	24	20	24	24	20	20	20	16
	0,18	0,18	28	28	20	28	28	20	24	24	16
	0,20	0,20	32	32	24	32	32	24	28	28	20
	0,22	0,22	36	36	28	40	40	28	36	36	24
	0,24	0,24	44	44	32	44	44	32	40	40	28
	0,26	0,26	48	48	36	52	52	36	48	48	36
	0,28	0,27	56	56	44	56	56	44	52	52	40
	0,30	0,29	64	64	48	64	64	48	60	60	44
	0,32	0,31	72	72	52	72	72	52	68	68	52
	0,34	0,33	80	80	60	80	80	60	76	76	56
	0,36	0,35	88	88	64	88	88	64	84	84	64
0,38	0,37	96	96	72	100	100	72	96	96	68	
0,40	0,39	108	108	80	108	108	80	104	104	76	
0,05	0,10	0,10	16	16	16	16	16	16	12	12	12
	0,12	0,12	20	16	16	24	20	16	20	16	12
	0,14	0,14	28	20	20	28	24	20	24	20	20
	0,16	0,16	36	28	28	36	28	28	32	24	24
	0,18	0,18	40	32	32	40	32	32	40	28	28
	0,20	0,20	48	40	36	52	40	36	48	36	36
	0,22	0,22	60	44	44	60	44	44	56	44	40
	0,24	0,24	68	52	52	68	52	52	68	48	48
	0,26	0,26	80	60	60	80	60	60	76	56	56
	0,28	0,27	92	68	68	92	68	68	88	68	64
	0,30	0,29	104	80	76	104	80	76	100	76	72
	0,32	0,31	116	88	84	116	88	84	112	84	84
	0,34	0,33	128	96	96	132	100	96	128	96	92
	0,36	0,35	144	108	104	144	108	104	140	104	104
0,38	0,37	160	120	116	160	120	116	156	116	112	
0,40	0,39	176	132	128	176	132	128	172	128	124	
0,10	0,10	0,10	28	20	20	28	20	20	24	20	20
	0,12	0,12	36	28	28	36	28	28	36	24	24
	0,14	0,14	48	36	36	48	36	36	44	32	32
	0,16	0,16	64	48	48	64	48	48	60	44	44
	0,18	0,18	76	56	56	76	56	56	76	56	56
	0,20	0,20	92	68	68	96	68	68	92	68	68
	0,22	0,22	112	80	80	112	84	84	108	80	80
	0,24	0,24	132	96	96	132	96	96	128	92	92
	0,26	0,26	152	112	112	152	112	112	148	108	108
	0,28	0,27	176	128	128	176	128	128	172	124	124
	0,30	0,29	200	144	144	200	144	144	196	144	144
	0,32	0,31	224	164	164	224	164	164	224	160	160
	0,34	0,33	252	184	184	252	184	184	248	180	180
	0,36	0,35	280	204	204	280	204	204	276	200	200
0,38	0,37	308	224	224	312	224	224	308	224	224	
0,40	0,39	340	248	248	340	248	248	336	244	244	

1 - Aproximação conservadora, 2 - Método completo, 3 - Aproximação não conservadora

$\theta\gamma$ = diferença das médias populacionais das formulações

CV = coeficiente de variação intra-individual (escala original)

σ_e^* = variabilidade intra-individual (escala logarítmica).

Tabela A.3: Número total de voluntários (N) obtido por meio de várias aproximações para o *cross-over* 2x3 em função da diferença das médias populacionais ($\theta\gamma$) e do coeficiente de variação (CV) (nível de significância = 5% e poder = 80%)

$\theta\gamma$	CV	σ_e^*	Distribuição								
			t não Central			t central			Normal		
			N_{nc}^1	N_{nc}^2	N_{nc}^3	N_c^1	N_c^2	N_c^3	N_z^1	N_z^2	N_z^3
0,00	0,10	0,10	4	4	4	6	6	4	4	4	2
	0,12	0,12	6	6	4	6	6	6	4	4	4
	0,14	0,14	8	8	6	8	8	6	6	6	4
	0,16	0,16	8	8	6	8	8	6	8	8	6
	0,18	0,18	10	10	8	10	10	8	10	10	6
	0,20	0,20	12	12	10	12	12	10	12	12	8
	0,22	0,22	14	14	10	14	14	10	14	14	10
	0,24	0,24	16	16	12	16	16	12	16	16	12
	0,26	0,26	18	18	14	18	18	14	18	18	14
	0,28	0,27	22	22	16	22	22	16	20	20	16
	0,30	0,29	24	24	18	24	24	18	24	24	18
	0,32	0,31	26	26	20	28	28	20	26	26	20
	0,34	0,33	30	30	22	30	30	22	30	30	22
	0,36	0,35	34	34	24	34	34	24	32	32	24
0,38	0,37	36	36	26	36	36	26	36	36	26	
0,40	0,39	40	40	30	40	40	30	40	40	28	
0,05	0,10	0,10	6	6	6	6	6	6	6	4	4
	0,12	0,12	8	6	6	8	6	6	8	6	6
	0,14	0,14	10	8	8	10	8	8	10	8	8
	0,16	0,16	12	10	10	12	10	10	12	10	8
	0,18	0,18	16	12	12	16	12	12	14	12	10
	0,20	0,20	18	14	14	18	14	14	18	14	14
	0,22	0,22	22	16	16	22	16	16	22	16	16
	0,24	0,24	26	20	20	26	20	20	26	18	18
	0,26	0,26	30	22	22	30	22	22	30	22	22
	0,28	0,27	34	26	26	34	26	26	34	26	24
	0,30	0,29	38	30	28	38	30	28	38	28	28
	0,32	0,31	44	32	32	44	32	32	42	32	32
	0,34	0,33	48	36	36	48	36	36	48	36	34
	0,36	0,35	54	40	40	54	40	40	54	40	38
0,38	0,37	60	44	44	60	44	44	58	44	42	
0,40	0,39	66	48	48	66	50	48	64	48	46	
0,10	0,10	0,10	10	8	8	10	8	8	10	8	8
	0,12	0,12	14	10	10	14	10	10	14	10	10
	0,14	0,14	18	14	14	18	14	14	18	12	12
	0,16	0,16	24	18	18	24	18	18	22	16	16
	0,18	0,18	28	22	22	28	22	22	28	20	20
	0,20	0,20	34	26	26	36	26	26	34	26	26
	0,22	0,22	42	30	30	42	30	30	42	30	30
	0,24	0,24	50	36	36	50	36	36	48	36	36
	0,26	0,26	58	42	42	58	42	42	56	42	42
	0,28	0,27	66	48	48	66	48	48	64	48	48
	0,30	0,29	74	54	54	74	54	54	74	54	54
	0,32	0,31	84	62	62	84	62	62	84	60	60
	0,34	0,33	94	68	68	94	68	68	94	68	68
	0,36	0,35	104	76	76	106	76	76	104	76	76
0,38	0,37	116	84	84	116	84	84	116	84	84	
0,40	0,39	128	92	92	128	92	92	126	92	92	

1 - Aproximação conservadora, 2 - Método completo, 3 - Aproximação não conservadora

$\theta\gamma$ = diferença das médias populacionais das formulações

CV = coeficiente de variação intra-individual (escala original)

σ_e^* = variabilidade intra-individual (escala logarítmica).

Tabela A.4: Número total de voluntários (N) obtido por meio de várias aproximações para o *cross-over* 4x4 em função da diferença das médias populacionais ($\theta\gamma$) e do coeficiente de variação (CV) (nível de significância = 5% e poder = 80%)

$\theta\gamma$	CV	σ_e^*	Distribuição								
			t não Central			t central			Normal		
			N_{nc}^1	N_{nc}^2	N_{nc}^3	N_c^1	N_c^2	N_c^3	N_z^1	N_z^2	N_z^3
0,00	0,10	0,10	8	8	8	8	8	8	4	4	4
	0,12	0,12	8	8	8	8	8	8	4	4	4
	0,14	0,14	8	8	8	8	8	8	4	4	4
	0,16	0,16	8	8	8	8	8	8	8	8	4
	0,18	0,18	8	8	8	8	8	8	8	8	4
	0,20	0,20	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	0,22	0,22	12	12	8	12	12	8	12	12	8
	0,24	0,24	12	12	8	12	12	8	12	12	8
	0,26	0,26	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	0,28	0,27	16	16	12	16	16	12	16	16	12
	0,30	0,29	16	16	12	16	16	12	16	16	12
	0,32	0,31	20	20	16	20	20	16	20	20	16
	0,34	0,33	20	20	16	20	20	16	20	20	16
	0,36	0,35	24	24	16	24	24	16	24	24	16
0,38	0,37	24	24	20	24	24	20	24	24	20	
0,40	0,39	28	28	20	28	28	20	28	28	20	
0,05	0,10	0,10	8	8	8	8	8	8	4	4	4
	0,12	0,12	8	8	8	8	8	8	8	4	4
	0,14	0,14	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	0,16	0,16	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	0,18	0,18	12	8	8	12	8	8	12	8	8
	0,20	0,20	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	0,22	0,22	16	12	12	16	12	12	16	12	12
	0,24	0,24	20	16	16	20	16	16	20	12	12
	0,26	0,26	20	16	16	20	16	16	20	16	16
	0,28	0,27	24	20	20	24	20	20	24	20	16
	0,30	0,29	28	20	20	28	20	20	28	20	20
	0,32	0,31	32	24	24	32	24	24	28	24	24
	0,34	0,33	32	24	24	32	24	24	32	24	24
	0,36	0,35	36	28	28	36	28	28	36	28	28
0,38	0,37	40	32	32	40	32	32	40	32	28	
0,40	0,39	44	32	32	44	36	32	44	32	32	
0,10	0,10	0,10	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	0,12	0,12	12	8	8	12	8	8	12	8	8
	0,14	0,14	12	12	12	12	12	12	12	8	8
	0,16	0,16	16	12	12	16	12	12	16	12	12
	0,18	0,18	20	16	16	20	16	16	20	16	16
	0,20	0,20	24	20	20	24	20	20	24	20	20
	0,22	0,22	28	20	20	28	20	20	28	20	20
	0,24	0,24	36	24	24	36	24	24	32	24	24
	0,26	0,26	40	28	28	40	28	28	40	28	28
	0,28	0,27	44	32	32	44	32	32	44	32	32
	0,30	0,29	52	36	36	52	36	36	52	36	36
	0,32	0,31	56	44	44	56	44	44	56	40	40
	0,34	0,33	64	48	48	64	48	48	64	48	48
	0,36	0,35	72	52	52	72	52	52	72	52	52
0,38	0,37	80	56	56	80	56	56	80	56	56	
0,40	0,39	88	64	64	88	64	64	84	64	64	

1 - Aproximação conservadora, 2 - Método completo, 3 - Aproximação não conservadora

$\theta\gamma$ = diferença das médias populacionais das formulações

CV = coeficiente de variação intra-individual (escala original)

σ_e^* = variabilidade intra-individual (escala logarítmica).

Anexo B

Resultados das Simulações para Curva de Concentração

Tabela A.5: Percentuais de conclusão de bioequivalência para o *cross-over* 2x2 para C_{max} , ASC_t e para as duas medidas simultaneamente

Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas	Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas	Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas
1	16	99,10	98,70	98,50	10	16	96,18	99,12	96,13	19	16	91,15	99,41	91,14
	20	99,81	99,66	99,62		20	98,66	99,81	98,65		20	96,02	99,89	96,02
	24	99,94	99,88	99,87		24	99,51	99,93	99,50		24	98,08	99,96	98,08
	28	99,99	99,98	99,97		28	99,82	99,99	99,82		28	99,19	100,00	99,19
Caso					Caso					Caso				
2	16	99,93	99,81	99,79	11	16	99,53	99,86	99,50	20	16	98,39	99,92	98,39
	20	99,99	99,97	99,97		20	99,93	99,98	99,93		20	99,62	99,99	99,62
	24	100,00	99,99	99,99		24	99,98	100,00	99,98		24	99,89	100,00	99,89
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	99,98	100,00	99,98
Caso					Caso					Caso				
3	16	99,59	99,39	99,30	12	16	97,43	99,64	97,42	21	16	93,27	99,77	93,27
	20	99,94	99,88	99,87		20	99,20	99,93	99,20		20	96,99	99,96	96,99
	24	99,98	99,96	99,95		24	99,75	99,99	99,75		24	98,64	99,99	98,64
	28	100,00	100,00	100,00		28	99,95	100,00	99,95		28	99,43	100,00	99,43
Caso					Caso					Caso				
4	16	96,36	96,50	95,46	13	16	87,10	97,67	87,08	22	16	74,76	98,44	74,76
	20	98,69	98,64	98,23		20	93,08	99,22	93,07		20	82,94	99,56	82,94
	24	99,52	99,51	99,34		24	96,20	99,71	96,20		24	88,48	99,82	88,48
	28	99,82	99,83	99,76		28	98,05	99,92	98,05		28	92,34	99,96	92,34
Caso					Caso					Caso				
5	16	100,00	99,99	99,99	14	16	99,88	99,99	99,88	23	16	99,38	100,00	99,38
	20	100,00	100,00	100,00		20	99,99	100,00	99,99		20	99,88	100,00	99,88
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	99,97	100,00	99,97
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
Caso					Caso					Caso				
6	16	100,00	100,00	100,00	15	16	99,99	100,00	99,99	24	16	99,94	100,00	99,94
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
Caso					Caso					Caso				
7	16	90,61	93,49	89,85	16	16	72,07	95,74	72,07	25	16	52,84	97,19	52,84
	20	95,30	96,90	94,88		20	80,12	98,18	80,12		20	60,50	98,96	60,50
	24	97,63	98,56	97,40		24	85,91	99,23	85,91		24	66,85	99,59	66,85
	28	98,94	99,38	98,83		28	90,11	99,70	90,11		28	72,53	99,87	72,53
Caso					Caso					Caso				
8	16	99,94	99,98	99,93	17	16	99,29	99,99	99,29	26	16	97,00	99,99	97,00
	20	99,99	100,00	99,99		20	99,86	100,00	99,86		20	99,02	100,00	99,02
	24	100,00	100,00	100,00		24	99,96	100,00	99,96		24	99,66	100,00	99,66
	28	100,00	100,00	100,00		28	99,99	100,00	99,99		28	99,89	100,00	99,89
Caso					Caso					Caso				
9	16	100,00	100,00	100,00	18	16	100,00	100,00	100,00	27	16	99,99	100,00	99,99
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00

N = número total de voluntários

C_{max} = pico de concentração máxima

ASC_t = Área sob a curva da formulação versus tempo

Tabela A.6: Percentuais de conclusão de bioequivalência para o *cross-over* 4x2 para C_{max} , ASC_t e para as duas medidas simultaneamente

Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas	Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas	Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas
1	16	82,57	81,21	78,48	10	16	70,78	85,00	70,22	19	16	60,74	88,03	60,65
	20	88,12	87,10	85,15		20	77,61	90,06	77,24		20	67,97	92,44	67,89
	24	91,28	90,54	89,02		24	82,46	92,91	82,18		24	73,48	94,76	73,43
	28	93,67	93,12	91,95		28	86,11	94,98	85,95		28	77,63	96,33	77,60
Caso					Caso					Caso				
2	16	91,94	93,66	91,22	11	16	86,07	95,09	86,00	20	16	79,95	96,21	79,94
	20	94,37	95,46	93,94		20	90,00	96,49	89,98		20	85,10	97,25	85,09
	24	95,46	96,20	95,11		24	91,83	96,96	91,82		24	87,65	97,55	87,64
	28	96,07	96,49	95,76		28	93,02	97,24	93,02		28	89,53	97,76	89,53
Caso					Caso					Caso				
3	16	90,49	93,94	90,31	12	16	84,82	95,20	84,82	21	16	79,48	96,18	79,48
	20	92,52	94,98	92,38		20	87,44	96,14	87,44		20	82,68	96,98	82,68
	24	93,32	95,51	93,22		24	88,66	96,40	88,65		24	84,33	97,12	84,33
	28	94,07	95,86	93,98		28	89,65	96,60	89,65		28	85,46	97,33	85,46
Caso					Caso					Caso				
4	16	77,26	77,32	73,51	13	16	62,35	81,85	61,96	22	16	50,98	85,67	50,91
	20	83,06	83,31	79,97		20	68,53	87,44	68,26		20	56,52	90,64	56,47
	24	87,11	87,38	84,63		24	73,68	90,94	73,49		24	61,45	93,66	61,42
	28	90,17	90,93	88,40		28	77,63	93,77	77,51		28	65,65	95,92	65,63
Caso					Caso					Caso				
5	16	95,82	96,70	95,19	14	16	90,43	97,83	90,37	23	16	83,79	98,57	83,78
	20	97,84	98,25	97,48		20	94,28	98,87	94,25		20	89,01	99,30	89,00
	24	98,71	98,86	98,48		24	96,24	99,26	96,23		24	92,15	99,51	92,14
	28	99,12	99,19	98,91		28	97,35	99,48	97,34		28	94,28	99,65	94,28
Caso					Caso					Caso				
6	16	97,54	98,50	97,41	15	16	94,95	98,97	94,94	24	16	91,87	99,24	91,87
	20	98,46	98,94	98,37		20	96,58	99,24	96,58		20	94,33	99,48	94,33
	24	98,74	99,14	98,68		24	97,23	99,37	97,23		24	95,57	99,51	95,57
	28	98,92	99,26	98,87		28	97,68	99,45	97,68		28	96,13	99,59	96,13
Caso					Caso					Caso				
7	16	68,39	71,51	65,36	16	16	49,83	77,22	49,64	25	16	37,38	82,07	37,36
	20	74,34	77,71	71,79		20	54,69	83,07	54,57		20	41,00	87,51	40,98
	24	78,92	82,51	77,04		24	59,63	87,32	59,56		24	44,72	91,10	44,71
	28	82,89	86,61	81,35		28	63,72	90,92	63,68		28	48,00	93,96	47,99
Caso					Caso					Caso				
8	16	94,98	96,36	94,29	17	16	87,22	97,81	87,16	26	16	78,45	98,70	78,43
	20	97,38	98,18	97,03		20	91,94	99,04	91,91		20	84,08	99,48	84,07
	24	98,55	99,04	98,32		24	94,58	99,54	94,57		24	88,12	99,78	88,12
	28	99,11	99,37	98,92		28	96,38	99,75	96,38		28	91,15	99,88	91,15
Caso					Caso					Caso				
9	16	99,24	99,51	99,11	18	16	97,82	99,76	97,81	27	16	95,39	99,87	95,38
	20	99,74	99,76	99,66		20	99,00	99,88	99,00		20	97,64	99,93	97,64
	24	99,84	99,87	99,79		24	99,48	99,92	99,48		24	98,57	99,96	98,57
	28	99,86	99,88	99,83		28	99,60	99,93	99,60		28	98,99	99,95	98,99

N = número total de voluntários

C_{max} = pico de concentração máxima

ASC_t = Área sob a curva da formulação versus tempo

Tabela A.7: Percentuais de conclusão de bioequivalência para o *cross-over* 2x3 para C_{max} , ASC_t e para as duas medidas simultaneamente

Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas	Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas	Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas
1	16	98,87	98,44	98,24	10	16	95,62	98,91	95,56	19	16	90,01	99,23	90,01
	20	99,69	99,54	99,47		20	98,24	99,71	98,23		20	94,99	99,82	94,99
	24	99,92	99,86	99,85		24	99,32	99,92	99,32		24	97,52	99,97	97,52
	28	99,98	99,95	99,94		28	99,73	99,98	99,73		28	98,77	99,99	98,77
Caso					Caso					Caso				
2	16	99,89	99,75	99,74	11	16	99,26	99,84	99,24	20	16	97,78	99,89	97,78
	20	99,99	99,95	99,95		20	99,83	99,97	99,83		20	99,30	99,98	99,30
	24	100,00	99,99	99,99		24	99,98	100,00	99,98		24	99,80	100,00	99,80
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	99,94	100,00	99,94
Caso					Caso					Caso				
3	16	99,46	99,35	99,20	12	16	97,02	99,63	97,00	21	16	92,51	99,74	92,51
	20	99,86	99,79	99,76		20	98,91	99,88	98,90		20	96,38	99,94	96,38
	24	99,98	99,96	99,96		24	99,63	99,98	99,63		24	98,34	99,99	98,34
	28	100,00	99,99	99,99		28	99,87	100,00	99,87		28	99,26	100,00	99,26
Caso					Caso					Caso				
4	16	96,11	96,33	95,22	13	16	86,55	97,50	86,53	22	16	73,98	98,28	73,98
	20	98,42	98,47	97,97		20	92,03	99,08	92,03		20	81,68	99,40	81,68
	24	99,42	99,38	99,18		24	95,46	99,67	95,46		24	87,23	99,82	87,23
	28	99,75	99,74	99,67		28	97,53	99,86	97,53		28	91,24	99,92	91,24
Caso					Caso					Caso				
5	16	99,98	99,98	99,97	14	16	99,76	99,99	99,76	23	16	99,04	99,99	99,04
	20	100,00	100,00	100,00		20	99,97	100,00	99,97		20	99,75	100,00	99,75
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	99,94	100,00	99,94
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	99,99	100,00	99,99
Caso					Caso					Caso				
6	16	100,00	100,00	100,00	15	16	99,98	100,00	99,98	24	16	99,89	100,00	99,89
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	99,98	100,00	99,98
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
Caso					Caso					Caso				
7	16	90,52	93,51	89,87	16	16	71,87	95,62	71,87	25	16	53,34	97,07	53,34
	20	94,80	96,69	94,44		20	79,48	97,97	79,48		20	60,65	98,79	60,65
	24	97,29	98,32	97,04		24	85,21	99,11	85,21		24	67,08	99,52	67,08
	28	98,68	99,24	98,58		28	89,34	99,61	89,34		28	72,31	99,81	72,31
Caso					Caso					Caso				
8	16	99,90	99,96	99,89	17	16	99,08	99,98	99,08	26	16	96,51	99,99	96,51
	20	99,99	99,99	99,99		20	99,76	100,00	99,76		20	98,70	100,00	98,70
	24	100,00	100,00	100,00		24	99,94	100,00	99,94		24	99,54	100,00	99,54
	28	100,00	100,00	100,00		28	99,99	100,00	99,99		28	99,82	100,00	99,82
Caso					Caso					Caso				
9	16	100,00	100,00	100,00	18	16	100,00	100,00	100,00	27	16	99,98	100,00	99,98
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00

N = número total de voluntários

C_{max} = pico de concentração máxima

ASC_t = Área sob a curva da formulação versus tempo

Tabela A.8: Percentuais de conclusão de bioequivalência para o *cross-over* 2x4 para C_{max} , ASC_t e para as duas medidas simultaneamente

Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas	Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas	Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas
1	16	99,94	99,90	99,88	10	16	99,55	99,95	99,54	19	16	98,31	99,97	98,31
	20	100,00	100,00	100,00		20	99,89	100,00	99,89		20	99,47	100,00	99,47
	24	100,00	100,00	100,00		24	99,98	100,00	99,98		24	99,83	100,00	99,83
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	99,97	100,00	99,97
Caso					Caso					Caso				
2	16	99,99	99,96	99,96	11	16	99,91	99,97	99,90	20	16	99,67	99,98	99,67
	20	100,00	100,00	100,00		20	99,98	100,00	99,98		20	99,94	100,00	99,94
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	99,98	100,00	99,98
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
Caso					Caso					Caso				
3	16	99,93	99,85	99,84	12	16	99,39	99,91	99,39	21	16	97,81	99,93	97,81
	20	99,99	99,97	99,97		20	99,87	99,99	99,87		20	99,26	100,00	99,26
	24	100,00	99,99	99,99		24	99,97	99,99	99,97		24	99,71	100,00	99,71
	28	100,00	100,00	100,00		28	99,99	100,00	99,99		28	99,92	100,00	99,92
Caso					Caso					Caso				
4	16	99,62	99,68	99,53	13	16	97,08	99,83	97,08	22	16	91,16	99,91	91,16
	20	99,92	99,93	99,90		20	98,85	99,97	98,85		20	95,17	99,99	95,17
	24	99,99	99,99	99,98		24	99,58	100,00	99,58		24	97,45	100,00	97,45
	28	100,00	100,00	100,00		28	99,84	100,00	99,84		28	98,63	100,00	98,63
Caso					Caso					Caso				
5	16	100,00	100,00	100,00	14	16	100,00	100,00	100,00	23	16	99,96	100,00	99,96
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
Caso					Caso					Caso				
6	16	100,00	100,00	100,00	15	16	100,00	100,00	100,00	24	16	99,99	100,00	99,99
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
Caso					Caso					Caso				
7	16	98,4	99,23	98,32	16	16	89,97	99,59	89,97	25	16	75,06	99,78	75,06
	20	99,51	99,76	99,46		20	94,22	99,89	94,22		20	81,48	99,95	81,48
	24	99,81	99,93	99,81		24	96,86	99,98	96,86		24	86,63	99,99	86,63
	28	99,95	99,99	99,95		28	98,22	99,99	98,22		28	90,04	100,00	90,04
Caso					Caso					Caso				
8	16	100,00	100,00	100,00	17	16	99,96	100,00	99,96	26	16	75,06	99,78	75,06
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	81,48	99,95	81,48
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	86,63	99,99	86,63
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	90,04	100,00	90,04
Caso					Caso					Caso				
9	16	100,00	100,00	100,00	18	16	100,00	100,00	100,00	27	16	100,00	100,00	100,00
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00

N = número total de voluntários

C_{max} = pico de concentração máxima

ASC_t = Área sob a curva da formulação versus tempo

Tabela A.9: Percentuais de conclusão de bioequivalência para o *cross-over* 4x4 para C_{max} , ASC_t e para as duas medidas simultaneamente

Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas	Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas	Caso	N	C_{max}	ASC_t	Ambas
1	16	99,97	99,92	99,92	10	16	99,80	99,94	99,78	19	16	99,24	99,95	99,23
	20	100,00	99,94	99,94		20	99,93	99,95	99,90		20	99,66	99,96	99,65
	24	99,99	99,94	99,94		24	99,94	99,95	99,92		24	99,81	99,96	99,80
	28	100,00	99,96	99,96		28	99,97	99,97	99,96		28	99,85	99,98	99,85
Caso					Caso					Caso				
2	16	99,94	99,85	99,85	11	16	99,80	99,87	99,78	20	16	99,48	99,90	99,48
	20	99,96	99,87	99,87		20	99,87	99,90	99,85		20	99,67	99,91	99,67
	24	99,96	99,91	99,91		24	99,91	99,92	99,89		24	99,75	99,94	99,74
	28	99,98	99,89	99,89		28	99,91	99,91	99,89		28	99,79	99,93	99,79
Caso					Caso					Caso				
3	16	99,83	99,74	99,73	12	16	99,33	99,79	99,32	21	16	93,27	99,77	93,27
	20	99,87	99,76	99,75		20	99,56	99,82	99,55		20	96,99	99,96	96,99
	24	99,92	99,81	99,81		24	99,64	99,86	99,64		24	98,64	99,99	98,64
	28	99,92	99,84	99,84		28	99,71	99,86	99,71		28	99,43	100,00	99,43
Caso					Caso					Caso				
4	16	99,93	99,92	99,89	13	16	99,30	99,95	99,30	22	16	97,51	99,98	97,51
	20	99,98	99,97	99,96		20	99,68	99,99	99,68		20	98,67	99,99	98,67
	24	99,98	99,98	99,97		24	99,81	99,99	99,81		24	99,14	99,99	99,14
	28	99,99	99,97	99,97		28	99,86	99,99	99,86		28	99,44	99,99	99,44
Caso					Caso					Caso				
5	16	100,00	99,99	99,99	14	16	99,99	100,00	99,99	23	16	99,98	100,00	99,98
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	99,99	100,00	99,99
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
Caso					Caso					Caso				
6	16	100,00	99,98	99,98	15	16	99,98	99,99	99,98	24	16	99,95	99,99	99,95
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	99,98	100,00	99,98
	24	100,00	99,99	99,99		24	99,99	100,00	99,99		24	99,97	100,00	99,97
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	99,98	100,00	99,98
Caso					Caso					Caso				
7	16	99,72	99,84	99,68	16	16	97,82	99,90	97,81	25	16	93,27	99,95	93,27
	20	99,91	99,92	99,87		20	98,86	99,96	98,85		20	95,55	99,98	95,55
	24	99,95	99,95	99,93		24	99,28	99,96	99,28		24	97,01	99,99	97,01
	28	99,95	99,95	99,93		28	99,49	99,97	99,49		28	97,73	99,98	97,73
Caso					Caso					Caso				
8	16	100,00	100,00	100,00	17	16	100,00	100,00	100,00	26	16	99,94	100,00	99,94
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	99,98	100,00	99,98
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	99,99	100,00	99,99
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
Caso					Caso					Caso				
9	16	100,00	100,00	100,00	18	16	100,00	100,00	100,00	27	16	100,00	100,00	100,00
	20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00		20	100,00	100,00	100,00
	24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00		24	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00

N = número total de voluntários

C_{max} = pico de concentração máxima

ASC_t = Área sob a curva da formulação versus tempo