

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

DEMÉTRIO FERNANDES DO NASCIMENTO

**DETERMINAÇÃO DE NIMODIPINO EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS DE
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS-MS)**

FORTALEZA

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEMÉTRIUS FERNANDES DO NASCIMENTO

**DETERMINAÇÃO DE NIMODIPINO EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS DE
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS-MS)**

*Dissertação submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
da Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Farmacologia.*

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

**Fortaleza
2005**

N194d Nascimento, Demétrius Fernandes do
Determinação de nimodipino em plasma humano através
de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à
Espectrometria de Massa (LC-MS-MS)/ Demétrius Fernandes
do Nascimento . – Fortaleza, 2005.
174 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de
Moraes.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina.

1. Nimodipino. 2. LC-MS-MS. 3. Bioanálise. 4. Fárma-
cocinética. I. Título.

CDD 615.1

DEMÉTRIUS FERNANDES DO NASCIMENTO

**DETERMINAÇÃO DE NIMODIPINO EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS DE
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS-MS)**

Dissertação aprovada em _____ de _____ de 2005

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará-UFC

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a Deus, meus pais, Ivonilde e José Benes, meus irmãos, Dayves e Danielle e a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para o meu crescimento intelectual.

AGRADECIMENTOS

Minha Família, pelo carinho, apoio e dedicação durante a realização deste trabalho e pelo entusiasmo em cada conquista.

Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes, minha orientadora, por ter me recebido na UNIFAC, como bolsista de iniciação científica e posteriormente como aluno de pós-graduação, onde pude compartilhar de seus conhecimentos científicos que despertaram em mim o interesse pela Farmacologia Clínica.

Dr. Manoel Odorico de Moraes, por colaborar sempre com seus ensinamentos enriquecedores que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Dr. Fernando Antônio Frota Bezerra, por estar sempre disposto a transmitir seus conhecimentos, contribuindo bastante para o meu engrandecimento acadêmico, bem como pela amizade e respeito.

Dr. José Pedrazzoli Júnior, por ter me acolhido em seu laboratório na Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco, Bragança Paulista-SP.

Às Doutoras **Geanne Matos de Andrade Cunha e Nylane Maria Nunes de Alencar** por terem gentilmente aceitado a participar da Banca Examinadora contribuindo para o engrandecimento do nosso Trabalho.

Professores do Curso de Pós-Graduação, por terem colaborado nessa caminhada infundável pela busca de conhecimentos.

Aos meus amigos, **Luciana, Ismael, Raquel, Suellen, Fabrine, Marne, Pacífica** pelo companheirismo durante todos esses anos de convivência.

Em especial aos meus amigos **Giovanni e Ismenia** pela amizade, companheirismo, cumplicidade, respeito e pelo apoio constante em todas as horas.

Às amigas, **Ana, Pacífica, Isabele, Janaína, Mariuza** pela amizade.

Aos amigos da Unidade de Farmacologia Clínica, **Gilmara (Gil), Aline, Teresa, Adriano**, meu agradecimento a todos vocês por terem colaborado na minha pesquisa científica, fazendo do trabalho diário um ambiente mais ameno e alegre.

Aos **amigos da Pós-Graduação** e a todos que fazem o Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC.

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Instituto Claude Bernard (InCB)**, por ter colaborado financeiramente no desenvolvimento da pesquisa.

EPÍGRAFE

“Da terra, Deus criou os remédios, e o homem de bom senso não os despreza”.

Ecl. 38, 4-5

RESUMO

Determinação de nimodipino em plasma humano através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS-MS). Demétrius Fernandes do Nascimento. Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Um método rápido, sensível e específico de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS-MS) foi desenvolvido para determinar nimodipino (analito) em plasma humano usando dibucaína como padrão interno (PI). O analito (m/z 418,6 > 342,6) e o PI (m/z 344,2 > 271,0) foram extraídos de amostras de plasma através de extração líquido-líquido utilizando hexano-acetato de etila (1:1v/v). As corridas cromatográficas foram executadas utilizando-se uma coluna analítica Varian® Polaris C₁₈ (3µm, 50 x 2,0 mm) e uma pré-coluna Securityguard™ C₁₈ (4,0 x 3,0 mm). A fase móvel consistiu de acetonitrila-solução de acetato de amônio 0,02 mol/L (80:20v/v). O método teve um tempo total de corrida de 4,5 min e uma curva de calibração linear que variou de 0,1-40 ng/mL. O limite de quantificação de 0,1 ng/mL. A precisão intra-ensaio para o limite de quantificação (LQ) foi 0,00% (lote 01), 5,71% (lote 02) e 5,27% (lote 03); para os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) os resultados foram respectivamente: 8,57, 0,81 e 1,37%. A precisão interensaio para o LQ e os CQB, CQM e CQA foram respectivamente de: 7% e 5,46, 4,12 e 3,37%. A exatidão intra-ensaio para o LQ foi 110, 96 e 104%; para CQB, CQM e CQA os resultados foram 100,67, 109,09 e 109,72% respectivamente. Os resultados da exatidão interensaio para o LQ, CQB, CQM e CQA foram respectivamente de: 103% e 102,89, 106,6, 109,69%. Este método foi aplicado para a avaliação do perfil farmacocinético do nimodipino administrado em 24 voluntários sadios participantes de um estudo de biodisponibilidade comparativa. A média geométrica da Formulação teste/Formulação referência para as porcentagens individuais foi 104,56% para ASC_{0-48h} e 55,73% para C_{max}. Os intervalos obtidos a partir do intervalo de confiança (IC) de 90% foram 94,80-115,32% e 44,73-69,42% respectivamente. Os valores de meia-vida e C_{max} para as formulações teste e referência foram de 27,83;32,78h e 9,48;18,76ng/mL, respectivamente. Os valores de T_{max} foram de 2,34;0,98h para as formulações teste e referência, respectivamente. Considerando o IC de 90% para C_{max} e ASC_{0-48h} dentro da variação de 80-125% proposto pelo Food and Drug Administration e ANVISA, as duas formulações de nimodipino 30mg não são bioequivalentes quanto à taxa de absorção (C_{max}) após uma única administração.

Palavras chaves: Nimodipino - LC-MS-MS - Bioanálise – Farmacocinética

ABSTRACT

Nimodipine determination in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS). Demétrius Fernandes do Nascimento. Supervisor: Professor Maria Elisabete Amaral de Moraes. Dissertation presented for the degree of master in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Faculty of Medicine. Federal University of Ceará.

A rapid, specific and highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed to determine nimodipine in human plasma using dibucaine as the internal standard (IS) is described. The analyte (m/z 418,6 > 342,6) and IS (m/z 344,2 > 271,0) were extracted from plasma samples by liquid-liquid extraction using hexane-ethyl acetate (1:1v/v). Chromatography was performed on a Varian[®] Polaris C₁₈ analytical column (3 μ m, 50 x 2,0 mm) and pre-column Securityguard[™] C₁₈ (4,0 x 3,0 mm). The phase mobile consisted of Acetonitrile-Ammonium acetate 0.02 ml/L (80:20v/v). The method had a chromatographic run time of 4.5 min and linear calibration curve over the range 0.1- 40 ng/mL ($r^2 > 0.9938$). The limit of quantification (LQ) was 0.1 ng/mL. The intra-day precision for the limit quantification was 0.00% (batch 01), 5.71% (batch 02) and 5.27% (batch 03); for the quality controls low (QCL), middle (QCM) and high (QCH) the results were respectively 8.57, 0.81 and 1.37%. The inter-day precision for LQ and QCL, QCM and QCH were respectively: 7% and 5.46, 4.12 and 3.37%. The intra-day accuracy for LQ was 110, 96 and 104%; for QCL, QCM and QCH the results were 100.67, 109.09 and 109.72% respectively. The results of the inter-day accuracy for LQ, QCL, QCM and QCH were respectively and 110.0, 96.0, 104.0% for the limit of quantification and 8.57, 0.81, 1.37% and 100.67, 109.09, 109.72% respectively: 103% e 102.89, 106.60, 109.69%. This validated method was successfully applied for the pharmacokinetic profiles of nimodipine tablets administered to 24 healthy volunteer's participant of bioavailability comparative study. Geometric mean of Test formulation/Reference formulation individual percent ratio was 104,56% for AUC_{0-48h} and 55,73% for C_{max}. The 90% for the confidence intervals (CI) were 94,80-115,32% e 44,73-69,42%, respectively. The values of half-life and C_{max} for test formulation and reference formulation were 27,83;32,78h and 9,48;18,76ng/mL, respectively. The values of T_{max} were 2,34;0,98h for the formulations test and reference respectively. Since the 90% CI for C_{max} and AUC_{0-48h}, were within the 80-125% interval proposed by the "Food and Drug Administration" and ANVISA, it was concluded that the two formulations of nimodipine 30mg tablets were not bioequivalent, according to the rate of absorption after single dose administration.

KEY WORDS: Nimodipine - LC-MS-MS - Bioanalysis - Pharmacokinetic

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-Fórmula estrutural do nimodipino	30
FIGURA 2 – Esquema demonstrativo da fragmentação de compostos utilizando espectrômetro de massa triplo-quadrupolo no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM).....	40
FIGURA 3 – Filtro de massa quadrupolo.....	42
FIGURA 4 – Esquema do procedimento de extração líquido-líquido	59
FIGURA 5 – Esquema dos ensaios de estabilidade em ciclos de congelamento de descongelamento	69
FIGURA 6 – Esquema dos ensaios de estabilidade de longa duração	70
FIGURA 7 – Esquema dos ensaios de estabilidade das soluções padrão	71
FIGURA 8 – Esquema do procedimento de coleta de sangue e separação de amostras plasmáticas	79
FIGURA 9 - Linearidade da curva de calibração realizada com seis diferentes concentrações de nimodipino ($r^2= 0,993824$).	87
FIGURA 10 - Cromatogramas do plasma humano: A) Plasma branco normal, lote 39252/1, B) Plasma branco normal, lote 39081/1, C) Plasma branco normal, lote 39529/1, D) Plasma branco normal, lote 39595/1, E) Plasma branco Lipêmico, lote 39359/1, F) Plasma branco hemolisado, lote 12119/5.....	96
FIGURA 11 - Cromatogramas (MRM) de nimodipino determinado por LC- MS-MS: (A) Amostra de plasma humano branco; (B) Plasma branco contaminado com nimodipino e dibucaína (IS); (C) Plasma humano coletado 0.25 h após administração oral de nimodipino (30 mg) em voluntários sadios. Pico I, nimodipino; pico II, dibucaína.	97
FIGURA 12 - Curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) <i>versus</i> tempo (h) após a administração de uma das formulações de 30mg de nimodipino em 24 voluntários saudáveis.	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características farmacocinéticas do nimodipino	35
TABELA 2 - Material utilizado na etapa analítica.....	53
TABELA 3 - Componentes do HPLC.....	53
TABELA 4 - Componentes do Espectrômetro de Massa.....	54
TABELA 5 - Padrões utilizados na etapa analítica.....	54
TABELA 6 - Reagentes utilizados na etapa analítica.....	54
TABELA 7 - Material utilizado na etapa clínica.....	55
TABELA 8 - Equipamentos utilizados na etapa clínica.....	55
TABELA 9 – Soluções de nimodipino utilizadas no pré-estudo, validação e estudo.....	61
TABELA 10 – Soluções de dibucaína utilizadas no pré-estudo, validação e estudo.....	61
TABELA 11 – Preparo da curva de calibração para o nimodipino.....	63
TABELA 12 – Preparo dos controles de qualidade.....	64
TABELA 13 – Definição dos controles de qualidade (CQ).....	64
TABELA 14 – Amostras do fluido biológico (plasma).....	67
TABELA 15 - Produtos estudados.....	78
TABELA 16 - Parâmetros farmacocinéticos.....	82
TABELA 17 – Dados da curva de calibração linear do nimodipino.....	87
TABELA 18 – Desvios nominais dos padrões das curvas de calibração.....	88
TABELA 19 - Análise Intralote do controle de qualidade LQ.....	92
TABELA 20 - Análise Intralote dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA.....	92
TABELA 21 - Análise intralote dos controles de qualidade do nimodipino em plasmas lipêmico e hemolisado.....	93
TABELA 22 - Análise interlote do controle de qualidade LQ.....	94
TABELA 23 - Análise interlote dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA.....	94
TABELA 24 - Percentagem de recuperação do fármaco e do padrão interno.....	98
TABELA 25 - Estabilidade do nimodipino em plasma no auto-injetor (20°C).....	99
TABELA 26 - Média e desvios obtidos no estudo de estabilidade do nimodipino em plasma submetido à análise no auto-injetor (20°C).....	99
TABELA 27 - Estudo de estabilidade do nimodipino em plasma submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para o controle de qualidade baixo.....	100

TABELA 28 - Estudo de estabilidade de nimodipino em plasma submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para o controle de qualidade médio.....	100
TABELA 29 - Estudo de estabilidade de nimodipino em plasma submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para o controle de qualidade alto.....	101
TABELA 30 - Variação das médias dos controles de qualidade nos ciclos de congelamento e degelo em relação às médias das amostras recém-preparadas	101
TABELA 31 - Estabilidade de longa duração para o nimodipino no fluido biológico.....	102
TABELA 32 - Estabilidade das soluções padrão para o nimodipino	103
TABELA 33 – Média e intervalo de confiança (90%) dos parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração de 30 mg de nimodipino.....	104
TABELA 34 - ANOVA para $\ln(C_{\max})$	105
TABELA 35 - ANOVA para $\ln(ASC_{(0-48h)})$	106
TABELA 36 – Análise da diferença individual de T_{\max} (teste menos referência)	106
TABELA 37 – Média, IC (90%) e razão das médias de C_{\max} e ASC_{0-48h}	107
TABELA 38 - Eventos adversos relatados pelos voluntários durante os dois períodos de internação.	108
TABELA 39 - Resultados hematológicos das determinações laboratoriais das 12 voluntárias do sexo feminino (média \pm SD) antes e após os dois períodos de internação.....	109
TABELA 40 - Resultados hematológicos das determinações laboratoriais dos 12 voluntários do sexo masculino (média \pm SD) antes e após os dois períodos de internação.....	110
TABELA 41 - Resultados bioquímicos das determinações laboratoriais das 12 voluntárias do sexo feminino (média \pm SD) antes e após os dois períodos de internação.....	111
TABELA 42 - Resultados bioquímicos das determinações laboratoriais dos 12 voluntários do sexo masculino (média \pm SD) antes e após os dois períodos de internação.....	112
TABELA 43 - Determinações laboratoriais do sumário de urina dos 24 voluntários de ambos os sexos (média \pm SD) antes e após os dois períodos de internação.	113

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	mais ou menos
≤	Menor ou igual
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
μg/mL	micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μL/min	microlitros por minuto
μL/mL	microlitros por mililitros
>	Maior
cm	Centímetro
g	Gramma
h	Hora
kg	Kilogramma
kV	Kilovolt
L	Litro
ln	logaritmo neperiano
m	Metro
mg	Miligrama
mg/dia	miligrama por dia
mg/kg	miligrama por kilogramma
mg/mL	miligrama por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
n°	Número
n	Número de amostragem
ng	Nanogramma

ng/mL	nanograma por mililitro
nm	Nanômetros
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
U/L	Unidades por litro
V	Volt
eV	Elétron volt
mbar	Mili bar
bar	bar
v/v	volume por volume
CQ	Controle de qualidade
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CQA	Controle de qualidade alto
LQ	Limite de quantificação
DP	Desvio padrão
CV	Coeficiente de variação
IC	Intervalo de confiança
ANOVA	Análise de variância
T_{\max}	Tempo do pico de concentração máxima
C_{\max}	Pico de concentração máxima
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida de eliminação do fármaco
$ASC_{0-t(h)}$	Área sob a curva de concentração de 0 a t (h)
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva de concentração de 0 a infinito (h)
FDA	Food and Drug Administration
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
SUMÁRIO.....	15
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE ENSAIOS CLÍNICOS	20
1.1.1 <i>Fases de desenvolvimento de um medicamento</i>	20
1.2 ENSAIOS CLÍNICOS	21
1.2.1 <i>Classificação de ensaios clínicos</i>	22
1.2.1.1 Quanto à investigação.....	22
1.2.1.2 Quanto à metodologia.....	23
1.2.1.3 Quanto à alocação de tratamento.....	24
1.2.1.4 Quanto à finalidade.....	25
1.3 IMPORTÂNCIA E CARACTERÍSTICAS DOS FÁRMACOS	28
1.4 NIMODIPINO	29
1.4.1 <i>Farmacologia</i>	30
1.4.2 <i>Farmacologia clínica</i>	32
1.4.3 <i>Farmacocinética</i>	33
1.4.4 <i>Metabolismo</i>	35
1.4.5 <i>Usos terapêuticos</i>	36
1.4.6 <i>Formas farmacêuticas</i>	36
1.4.6.1 Forma oral	36
1.4.6.2 Forma parenteral.....	36
1.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	37

1.6	ESPECTROMETRIA DE MASSA	39
1.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS	42
1.7.1	<i>Pré-requisitos para validar uma metodologia bioanalítica</i>	43
1.7.1.1	Exatidão e precisão	44
1.7.1.2	Recuperação	45
1.7.1.3	Curva de calibração/linearidade	46
1.7.1.4	Limite de quantificação	46
1.7.1.5	Limite de detecção.....	47
1.7.1.6	Especificidade/seletividade	47
1.7.1.7	Estabilidade	48
1.8	JUSTIFICATIVA.....	49
2	OBJETIVOS	51
2.1	OBJETIVO GERAL	51
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3	MATERIAIS	53
3.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA.....	53
3.1.1	<i>Materiais utilizados</i>	53
3.2	APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA ESTUDO FARMACOCINÉTICO EM 24 VOLUNTÁRIOS SADIOS	55
3.2.1	<i>Material utilizado</i>	55
4	METODOLOGIA.....	57
4.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA.....	57
4.1.1	<i>Validação pré-estudo do método bioanalítico</i>	57
4.1.1.1	Padrão interno.....	57
4.1.1.2	Condições de detecção no espectrômetro de massa no modo MS/MS.....	57
4.1.1.3	Condições cromatográficas.....	58
4.1.1.4	Extração das amostras (extração líquido-líquido).....	58
4.1.1.5	Soluções padrão.....	60
4.1.1.5.1	<i>Solução padrão de nimodipino</i>	60
4.1.1.5.2	<i>Solução padrão de dibucaína (padrão interno)</i>	61
4.1.1.6	Preparo da fase móvel acetonitrila - acetato de amônio 0,02 mol/L (80:20 v/v)	61

4.1.1.7	Preparação dos padrões da curva de calibração.....	62
4.1.1.8	Preparação das amostras dos controles de qualidade	63
4.1.2	<i>Validação do método</i>	64
4.1.2.1	Determinação do limite de quantificação (LQ).....	64
4.1.2.2	Curva de calibração/linearidade	65
4.1.2.3	Precisão e exatidão	66
4.1.2.3.1	<i>Precisão e exatidão intralote</i>	66
4.1.2.3.2	<i>Precisão e exatidão interlote</i>	66
4.1.2.4	Especificidade.....	67
4.1.2.5	Recuperação	67
4.1.2.6	Estudo de estabilidade do fármaco no fluido biológico	68
4.1.2.6.1	<i>Estabilidade no tempo e condições de análise (curta duração)</i>	68
4.1.2.6.2	<i>Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo</i>	69
4.1.2.6.3	<i>Estabilidade de longa duração</i>	70
4.1.2.6.4	<i>Estabilidade das soluções padrão</i>	71
4.2	APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA ESTUDO FARMACOCINÉTICO EM 24 VOLUNTÁRIOS	
SADIOS	71
4.2.1	<i>Delineamento do estudo</i>	71
4.2.2	<i>Seleção dos voluntários</i>	72
4.2.3	<i>Sinais vitais</i>	73
4.2.4	<i>Exame cardiológico</i>	73
4.2.5	<i>Exames laboratoriais</i>	73
4.2.6	<i>Valores de referência dos exames laboratoriais</i>	74
4.2.7	<i>CrITÉRIOS de inclusão</i>	74
4.2.8	<i>CrITÉRIOS de exclusão</i>	75
4.2.9	<i>CrITÉRIOS para retirada do estudo</i>	76
4.2.10	<i>Entrada do voluntário no estudo</i>	77
4.2.11	<i>Internamento</i>	77
4.2.12	<i>Restrições</i>	77
4.2.13	<i>Esquema experimental</i>	78
4.2.14	<i>Coletas de sangue</i>	79
4.2.15	<i>Avaliação da segurança</i>	80
4.2.15.1	<i>Definições de efeitos adversos quanto à intensidade</i>	80

4.2.15.2	Relacionamento suposto com a droga experimental	80
4.2.16	<i>Aspectos Éticos</i>	81
4.2.16.1	Termo de consentimento livre e esclarecido	81
4.2.16.2	Confidencialidade	81
4.2.17	<i>Análise do perfil farmacocinético do nimodipino</i>	82
4.2.18	<i>Análise estatística</i>	82
4.2.18.1	Material	82
4.2.18.2	Métodos	83
5	RESULTADOS	85
5.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA	85
5.1.1	<i>Método bioanalítico</i>	85
5.1.2	<i>Princípio do método</i>	85
5.1.3	<i>Determinação do Limite de quantificação (LQ)</i>	86
5.1.4	<i>Curva de calibração/linearidade</i>	86
5.1.5	<i>Precisão e exatidão</i>	91
5.1.5.1	Precisão e exatidão intralote	91
5.1.5.2	Precisão e exatidão interlote	93
5.1.6	<i>Especificidade</i>	94
5.1.7	<i>Recuperação</i>	98
5.1.8	<i>Estabilidade no tempo e condições de análise (curta duração)</i>	98
5.1.9	<i>Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo</i>	100
5.1.10	<i>Estabilidade de longa duração</i>	102
5.1.11	<i>Estabilidade das soluções padrão</i>	102
5.1.12	<i>Resultados da Análise Farmacocinética</i>	103
5.2	APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA ESTUDO FARMACOCINÉTICO EM 24 VOLUNTÁRIOS SADIOS	107
6	DISCUSSÃO	115
7	CONCLUSÃO	124
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
	GLOSSÁRIO	137
	ANEXO I	142

ANEXO II.....	143
ANEXO III.....	150
ANEXO IV	151

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre ensaios clínicos

Com o desenvolvimento da indústria farmacêutica ao final do século XIX, a descoberta de fármacos tornou-se um processo altamente focado e administrado. No século XX, viu-se a introdução maciça de novos fármacos que trouxeram possibilidade de cura até então inalcançáveis, sobretudo no campo das doenças infecciosas, assim como possibilidades variáveis na eficácia do tratamento sintomático de quadros agudos e de enfermidades crônicas (TOGNONI & LAPORTE, 1997).

A partir de então, os medicamentos se tornaram uma importante ferramenta terapêutica nas mãos dos profissionais da saúde, sendo responsáveis por parte significativa da melhoria da qualidade e expectativa de vida da população. Entretanto, para que a farmacoterapia tenha êxito e produza os resultados esperados, é indispensável que os medicamentos tenham qualidade, segurança, eficácia, e que sejam prescritos e utilizados adequadamente.

O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, mais eficazes e seguros, contribui para o aumento da utilização dos medicamentos. Por este motivo, pesquisas clínicas com fármacos são realizadas em diversas instituições de saúde em todo o mundo. Os pesquisadores e profissionais de saúde que participam de pesquisas clínicas devem assegurar a credibilidade das mesmas e a proteção dos seres humanos empregando métodos éticos.

A pesquisa clínica no âmbito dos serviços de saúde requer a constituição de equipes interdisciplinares para assegurar a realização mais eficaz dos ensaios clínicos.

1.1.1 Fases de desenvolvimento de um medicamento

O processo de desenvolvimento de um fármaco inicia-se com a etapa química, pois se busca seu planejamento e a melhor maneira de sintetizá-lo, com o objetivo de produzi-lo de forma econômica para que se torne acessível à população. Após a etapa química (síntese e

determinação de suas características físico-químicas), segue-se a etapa pré-clínica onde são realizadas diversas pesquisas em culturas de células (ensaios *in vitro*), órgãos isolados (ensaios *ex vivo*) e em animais experimentais (*in vivo*), nos quais se estuda o metabolismo, a eficácia e o potencial de toxicidade do fármaco. Em seguida, realiza-se a fase clínica onde são realizadas diversas pesquisas para verificar a segurança e a eficácia da utilização da substância em seres humanos (MORAES & MORAES, 2000).

Assim, para o desenvolvimento de um novo medicamento, desde sua síntese até sua liberação para comercialização, tem-se a execução das seguintes etapas:

Fase de Investigação Físico-Química e Farmacocinética: envolve a caracterização físico-química da molécula pesquisada, desenvolvimento de formas farmacêuticas adequadas e determinação da estabilidade do fármaco (MORAES & MORAES, 2000).

Farmacologia Experimental: estabelece as propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas, toxicológicas e possíveis efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos em diversas espécies de animais. Visa conhecer a farmacologia do fármaco para dar segurança e início aos estudos em humanos (MORAES & MORAES, 2000).

Farmacologia Clínica: é a pesquisa realizada em seres humanos, ocorrendo apenas após a aprovação nas etapas anteriores, que objetiva caracterizar os aspectos farmacocinéticos, farmacodinâmicos, eficácia terapêutica, segurança e reações adversas relacionadas ao fármaco (MORAES & MORAES, 2000).

1.2 Ensaios clínicos

Ensaio clínico pode ser dito como um teste rigorosamente controlado de um novo fármaco ou um novo produto médico em seres humanos (COBERT & BIRON, 2002). Sob o ponto de vista epidemiológico, é um estudo experimental e prospectivo. A Agência Europeia para Avaliação de Medicamentos define ensaio clínico como qualquer investigação em seres humanos, objetivando descobrir ou verificar os efeitos farmacodinâmicos, farmacológicos,

clínicos e/ou outros efeitos de produto(s) investigado(s) e/ou identificar reações adversas ao(s) produto(s) em investigação, com o objetivo de averiguar sua segurança e/ou eficácia.

O investigador controla o agente terapêutico ou profilático, que é recebido por cada participante do estudo. Os indivíduos são alocados, aleatoriamente, em dois grupos designados: experimental e controle. Ao grupo experimental é oferecido o fármaco sob teste, e ao grupo controle, um fármaco de referência ou placebo. Os agentes empregados em ensaios clínicos podem ser medicamentos, cirurgias, vacinas, dietas e outros procedimentos médicos (MORAES & MORAES, 2000).

1.2.1 Classificação de ensaios clínicos

Dependendo da característica em que se avalia o ensaio clínico, este pode ser classificado em quatro aspectos: quanto à investigação, metodologia, alocação de tratamento e finalidade.

1.2.1.1 Quanto à investigação

a) Estudos Unicêntricos

São estudos realizados em somente um local, como hospitais ou complexo hospitalar, coordenados por um investigador ou por uma equipe de investigação. O estudo pode se restringir a uma unidade hospitalar ou se estender a outras unidades integrantes do complexo. Devido a esse fator, geralmente, há um número reduzido de pacientes envolvidos no estudo, o que, muitas vezes, não permitem evidenciar as possíveis diferenças entre os tratamentos (MORAES & MORAES, 2000).

b) Estudos Multicêntricos

São estudos realizados por vários investigadores ou grupo de investigadores, em centros independentes, efetuando a investigação em conjunto e adotando um protocolo comum. Os ensaios multicêntricos são mais vantajosos do que os unicêntricos porque o recrutamento de indivíduos é facilitado e as conclusões são mais representativas e válidas,

porém são mais difíceis de ser planejados e coordenados. Esse tipo de estudo, envolvendo pesquisadores brasileiros e internacionais, é regulamentado pela Resolução 292, de 08/07/99, do Conselho Nacional de Saúde.

1.2.1.2 Quanto à metodologia

a) Estudos Não Controlados

A principal característica, que se torna um importante problema nesse estudo, é a ausência de comparação entre um grupo controle e um grupo experimental. A falta do grupo controle pode levar a conclusões errôneas sobre o medicamento em estudo (MORAES & MORAES, 2000).

Esse tipo de estudo é empregado para estudar efeitos secundários, alterações bioquímicas, após terapias em longo prazo, tolerância, interações e eficácia dos fármacos.

b) Estudos Controlados

Os estudos controlados são caracterizados por permitirem uma comparação estatisticamente aceitável entre resultados obtidos em um grupo tratado com a substância em experimentação e grupo controle com a substância de referência ou placebo. A possível influência do médico na seleção de voluntários sadios ou pacientes é mínima, pois a alocação dos participantes do estudo é ao acaso (MORAES & MORAES, 2000).

Existem quatro tipos principais de estudos controlados. São eles:

Estudos Abertos: tanto o participante do estudo quanto o investigador conhecem o tipo de tratamento ou intervenção à qual foi selecionado. Utilizam-se esses estudos para avaliação de técnicas cirúrgicas, dessensibilização de drogados e fumantes, ensaios com alterações de estilo de vida e outros. Porém, pode haver tendenciosidade, pois como é de conhecimento do observador em qual grupo o participante se encontra, se torna difícil separar o efeito placebo (MORAES & MORAES, 2000).

Estudos Simples Cegos: são estudos nos quais o sujeito da pesquisa (voluntário) desconhece a alocação dos grupos. O objetivo é neutralizar o efeito placebo, pois o indivíduo não sabe se está tomando o medicamento novo, placebo ou medicamento de referência. A organização e a monitorização desses ensaios são mais fáceis e, algumas vezes, suficientes para reduzir os possíveis desvios quando tratamentos diferentes são comparados (MORAES & MORAES, 2000).

Estudos Duplos Cegos: nesse caso, tanto o observador quanto o participante desconhecem o grupo de estudo em que se está trabalhando, ou seja, ambos não sabem se está se avaliando o efeito do medicamento de referência ou placebo, ou se está avaliando o produto de estudo. São bem utilizados em estudos de eficácia. Há redução nos vícios de seleção e garantia de objetividade dos resultados. Contudo, há maior necessidade de organização e preparação de formas farmacêuticas idênticas para o fármaco em estudo e a referência ou placebo (MORAES & MORAES, 2000).

Estudos Triplos Cegos: são estudos sobre os quais o participante, o observador e o investigador não conhecem os tratamentos. Somente o setor de produção da indústria promotora da pesquisa conhece o conteúdo das formas farmacêuticas. Tem com finalidade neutralizar o efeito placebo, a subjetividade do observador e do investigador. Na análise dos resultados o investigador utilizará letras sem saber a que tratamento se refere (MORAES & MORAES, 2000).

1.2.1.3 Quanto à alocação de tratamento

a) Ensaio Randomizados

São estudos nos quais o paciente é alocado ao grupo controle ou experimental através de métodos estatísticos de randomização. Os métodos de aleatorização ou randomização mais empregados são as tabelas de números aleatórios e a randomização estratificada. A aleatorização é importante porque elimina os vícios de seleção. Quando os indivíduos são alocados aleatoriamente aos diferentes grupos, não há possibilidade de que preferências pessoais do investigador, no que se refere a qual é o melhor tratamento para um

determinado paciente, venham a alterar os resultados do estudo (MORAES & MORAES, 2000).

b) Ensaio Não Randomizados

São ensaios nos quais a alocação do participante é realizada através de um método sistemático predeterminado ou por decisão do investigador ou do próprio participante. Entre os métodos de alocação sistemática mais comuns, pode-se citar o de apresentação e alocação alternada (por exemplo, nos dias ímpares se escolhe um tipo de tratamento e nos dias pares se escolhe o outro tratamento). Esse método apresenta a desvantagem de permitir ao investigador conhecer previamente o tratamento que o indivíduo vai receber podendo decidir pela inclusão ou não no estudo (MORAES & MORAES, 2000).

1.2.1.4 Quanto à finalidade

Segundo o órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*), a finalidade de um ensaio clínico pode ser dividida em quatro fases.

a) Estudos Fase I

É a primeira etapa da investigação de um novo medicamento em seres humanos. Esta etapa acontece logo após a fase experimental (pré-clínica) cujos testes são realizados em animais (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1997a).

Nesta etapa são realizados fundamentalmente estudos de farmacocinética e farmacodinâmica do medicamento, avaliando a tolerância, evidência de ações farmacológicas, segurança dos esquemas posológicos, absorção, distribuição, metabolismo e excreção. São utilizados, aproximadamente, 100 voluntários sadios.

Estes estudos proporcionam informações preliminares sobre o efeito e a segurança do produto em indivíduos sadios ou em alguns casos em pacientes (estudos com fármacos antineoplásicos) e orientam as etapas posteriores da pesquisa (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1997a).

As vias de administração devem ser as mesmas que serão estudadas na prática clínica, não sendo permitido o experimento de outras vias que não tenham sido previamente ensaiadas em animais.

b) Estudos Fase II

Nesta fase, com o objetivo de estabelecer segurança e demonstrar a atividade farmacológica do medicamento em curto prazo, são selecionados cerca de 200 pacientes portadores de uma determinada enfermidade ou condição patológica de interesse.

Pode ser denominado como um estudo piloto para estudar a atividade biológica específica, controle ou profilaxia da doença. Pode-se ainda, estabelecer as relações dose-resposta, a fim de se obter sólidos antecedentes para a descrição dos estudos Fase II (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1997b).

Esta fase proporciona informações preliminares sobre eficácia do fármaco e suplementa os parâmetros de segurança obtidos na Fase I.

c) Estudos Fase III

Têm características em comum com o Estudo Fase II, porém, de maneira mais ampliada. A amostra de pacientes deve ser maior, representando a população geral que irá utilizar o medicamento quando estiver no mercado.

Os dados são obtidos por ensaios de comparação do medicamento teste com um medicamento de referência ou com um placebo.

Por ser a última fase antes da comercialização do medicamento, procura-se explorar o tipo e o perfil de reações adversas que possa apresentar, como as mais frequentes, características próprias do fármaco como: interações clinicamente relevantes, grupos de pacientes com risco para desenvolver efeitos secundários e fatores que possam alterar o seu efeito farmacológico (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2003).

d) Estudos Fase IV

Na Fase IV, pesquisas são executadas com base nas características por meio das quais foi autorizado o medicamento. Geralmente, são estudos de vigilância pós-comercialização para estabelecer o valor terapêutico, o surgimento de novas reações adversas e/ou confirmação da frequência de aparecimento das reações já descritas e estratégias de tratamento. A população não é mais selecionada, é pouco homogênea e inclui doentes raramente recrutados durante as Fases I, II ou III: pacientes que sofrem de patologias diversas, pacientes que recebem associações terapêuticas, e idosos (SPILKER, 1991).

Devem-se seguir as mesmas normas éticas e científicas aplicadas às pesquisas de fases anteriores.

No Brasil, depois que um medicamento já vem sendo comercializado, as pesquisas clínicas desenvolvidas para explorar novas indicações, novos métodos de administração ou novas associações são consideradas como pesquisas de um novo medicamento, sendo necessário realizar, novamente, as fases que sejam necessárias (MORAES & MORAES, 2000).

Certas limitações de detecção de reações adversas podem ser observadas nos ensaios clínicos Fase I, II e III como: participam poucos pacientes; excluem-se crianças, idosos, gestantes, pacientes com mais de uma enfermidade, pacientes que apresentam poucas contra-indicações potenciais para receber o novo medicamento, e os que utilizam vários medicamentos; existe um controle rígido, com uma peculiar relação entre o médico e o paciente, diferente do que se estabelece na prática clínica habitual; e os critérios diagnósticos são, em geral, mais rigorosos do que os aplicados no dia-a-dia da clínica médica (MORAES & MORAES, 2000).

Essas limitações impedem que os ensaios clínicos anteriores à Fase IV identifiquem reações adversas raras, por exemplo, as que aparecem em menos de um entre 1000 pacientes, que aparecem após um tratamento prolongado ou muito tempo depois de suspendê-lo e as que ocorrem em subgrupos específicos da população (MORAES & MORAES, 2000).

1.3 Importância e características dos fármacos

O fármaco é definido como um agente que se pretende usar no diagnóstico, mitigação, tratamento, cura ou na prevenção de doenças humanas e de animais. Uma das qualidades mais impressionantes dos fármacos é a diversidade de ações e efeitos sobre o organismo.

A grande série de agentes medicinais eficazes disponíveis hoje representa um dos maiores feitos do homem. Seria assustador conceber nossa civilização sem agentes notáveis e benéficos. Com seu uso, muitas doenças que afligem a humanidade através da história, como a varíola e a poliomielite, estão quase extintas atualmente. As doenças como diabetes, hipertensão e depressão são controladas com eficiência, hoje, com os fármacos modernos. Os procedimentos cirúrgicos seriam virtualmente impossíveis sem o benefício de anestésicos, analgésicos, antibióticos, transfusões sanguíneas, líquidos e nutrientes intravenosos (ANSEL *et al.*, 2000).

O processo de descoberta e desenvolvimento dos medicamentos é complexo. Implica na contribuição coletiva de muitos cientistas especializados, por exemplo, em química orgânica, física, química analítica, bioquímica, bacteriologia, fisiologia, farmacologia, toxicologia, hematologia, imunologia, endocrinologia, patologia, bioestatística etc.

Depois que uma nova substância é descoberta, ela é caracterizada em termos químicos e físicos, sendo preciso reunir uma grande quantidade de informações biológicas. A farmacologia básica ou a natureza e mecanismo de ação do fármaco sobre o sistema biológico precisa ser determinado, inclusive suas características tóxicas. É necessário estudar o local de ação da substância e a velocidade de absorção, seu padrão de distribuição e sua concentração no interior do organismo, a duração de sua ação, modo e velocidade de eliminação ou excreção. É preciso obter informações sobre a degradação metabólica do fármaco e sobre a atividade de todos os seus metabólitos. Deve-se realizar um estudo abrangente dos efeitos a curto e em longo prazo sobre as várias células, tecidos e órgãos do corpo. É preciso obter informações altamente específicas, como o efeito do fármaco sobre o feto em uma fêmea prenha ou sobre sua capacidade de chegar ao latente

através do leite materno. Muitos fármacos promissores foram desprezados pelo seu potencial em promover efeitos adversos (HEPLER, 1989).

Devem ser determinadas as vias de administração mais efetivas para um novo fármaco (por exemplo, oral, retal ou parenteral) estabelecendo-se diretrizes relativas à dosagem recomendada para pessoas de diversas idades, pesos e estados patológicos. Para facilitar a administração do fármaco pelas vias selecionadas, são formuladas e preparadas formas farmacêuticas apropriadas, como comprimidos, cápsulas, injetáveis, supositórios, óvulos, pomadas, aerossóis e outros. Cada uma dessas unidades destina-se a conter uma quantidade específica de princípio ativo para facilitar a administração da dose precisa (PANCORBO *et al.* 1987). Essas formas são sistemas altamente sofisticados de liberação de fármacos. Sua concepção, desenvolvimento, produção e uso são um exemplo primordial da amplificação das ciências farmacêuticas, a mescla das ciências básicas, aplicadas e clínicas com a tecnologia farmacêutica (ANSEL *et al.*, 2000).

Cada produto farmacêutico é uma formulação única. Além dos princípios ativos, uma formulação também contém diversos componentes não terapêuticos; os adjuvantes. É através de seu uso que uma formulação atinge sua composição única e a aparência física característica. É composta por materiais como diluentes, espessantes, veículos, agentes suspensores, revestimentos e desintegrantes de comprimidos, agentes estabilizantes, conservantes, flavorizantes, corantes e edulcorantes (HISTORY OF THE PHARMACOPEIA, 1995).

1.4 Nimodipino

O nimodipino ($C_{21}H_{26}N_2O_7$) é um antagonista do canal de cálcio pertencente à classe das diidropiridinas (SCRIABINE *et al.*, 1985).

É designado quimicamente como Ácido 1,4 – Dihidro – 2,6 – dimetil – 4 - (3 nitrofenil) – 3,5 – piridinodicarboxílico 2 – metoxietil – metiletil éster. Na sua forma pura é um composto amarelo, finamente cristalino, preparado por síntese química, com um peso molecular de 418,5d, insolúvel em água e solúvel em álcool. É estável ao calor, não-higroscópico e sensível à luz. (DOLLERY, 1999).

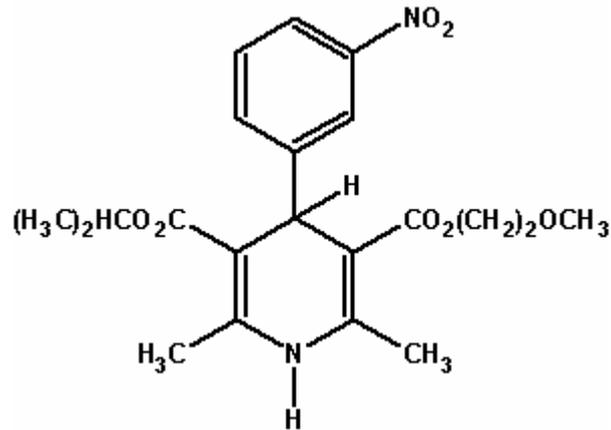


FIGURA 1-Fórmula estrutural do nimodipino

1.4.1 Farmacologia

O nimodipino é um antagonista dos canais de cálcio que tem como seu principal sítio de ação o sarcolema (TOWART & KAZDA, 1979). Seu mecanismo de ação é a estabilização dos canais de cálcio tipo-L sensível à voltagem inibindo, assim, o influxo de cálcio para manutenção da fase platô do potencial de ação. O aumento do Ca^{++} citosólico é o evento chave na manutenção do tônus cérebro vascular basal e contração das artérias cerebrais responsáveis pela despolarização e interação agonista receptor (ALBORCH *et al.*, 1995). O nimodipino é relativamente seletivo para os vasos cerebrais e muito mais efetivo nas arteríolas com diâmetro menor do que $100\mu\text{m}$ (SCHIMIDT *et al.*, 1985; TANAKA *et al.*, 1980).

Estudos em tecido isolado usando uma variedade de preparações arteriais de coelho (TOWART, 1981; TOWART & KAZDA, 1985; TOWART & PERZBORN, 1981), gato (ANDERSON *et al.*, 1983) e cachorro (MULLER-SCHWEINITZER & NEUMANN, 1983) contraídas por agonistas, demonstraram que a seletividade do nimodipino para vasos cerebrais foi aproximadamente 3-10 vezes maior em comparação com vários vasos periféricos. Nos humanos, o nimodipino apresentou seletividade três vezes maior em antagonizar a vasoconstrição induzida por potássio nos vasos da piamáter quando comparados com vasos mesentéricos (BRANDT *et al.*, 1981). Em um modelo *in vitro* de vasoespasma cerebral, o nimodipino (10^{-7} M a 10^{-5} M) inibiu 5-HT e vasoconstrição induzida por $\text{PGF}2\alpha$,

em anéis de artérias cerebrais humanas e relaxou artérias pre-contraídas com $\text{PGF}_2\alpha$ (ALBORCH *et al.*, 1992).

A base celular da seletividade cerebral não é conhecida, mas pode, em parte, ser devida a grande dependência dos vasos sanguíneos cerebrais ao cálcio exógeno para manutenção do estado de contratilidade. Estudo em membranas de fosfatidilcolina de cérebro bovino indica que o nimodipino é uma molécula anfifílica que rapidamente é transportada através da bicamada lipídica da membrana (HERBETTE *et al.*, 1994). Em ratos, picos dos níveis sanguíneo e cerebral foram encontrados 5 minutos depois de dose intraperitoneal e a meia-vida de eliminação sanguínea e cerebral estimada foi de 16,7 e 22,4 min (LARKIN *et al.*, 1992).

O nimodipino aumenta o fluxo sanguíneo cerebral em modelos animais de isquemia cerebral. Quando pequenas doses de $1\mu\text{g.Kg}^{-1}$ são dadas intravenosamente ocorre aumento do fluxo sanguíneo cerebral em cachorros. Doses de $10\mu\text{g.Kg}^{-1}$ aumentam o fluxo sanguíneo cerebral em mais de 50% (SCRIABINE *et al.*, 1985). Em um estudo controlado por placebo em porcos, altas doses ($10\mu\text{g.Kg}^{-1}$) seguido por infusão de $1\mu\text{g.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ administradas durante ressuscitação cardiopulmonar aumentaram significativamente os fluxos sanguíneos, cerebral e ventricular melhorando a taxa de ressuscitação (SCHINDLER *et al.*, 1994). Doses baixas ($5\mu\text{g.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) não atenuaram as respostas autorregulatórias cerebrais para mudança de pressão sanguínea (STANGE *et al.*, 1994).

Em um modelo experimental de hemorragia subaracnóidea em ratos, o nimodipino na dose de $0,5\mu\text{g.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ administrado por infusão venosa aumentou o fluxo sanguíneo cerebral em 33% e melhorou a autorregulação comparada com os controles (HAUERBERG *et al.*, 1995). A administração de nimodipino previamente à isquemia cerebral reduz a hipoperfusão pós-isquêmica e melhora a reposta neurológica. O tratamento em macacos após um período de 17 minutos de isquemia também melhora a reposta neurológica (NEWBERG *et al.*, 1984). Nos ratos, o pré-tratamento com $10\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de nimodipino melhora o fluxo sanguíneo hepático após a isquemia, saturação de oxihemoglobina e função hepática após interrupção do fluxo sanguíneo dos lóbulos lateral e médio (CHAVES-CARTAYA *et al.*, 1996). A administração intravenosa de 10 a $100\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de nimodipino a cachorros reduz a

pressão arterial sistêmica. Doses muito baixas de $0,3\mu\text{g.Kg}^{-1}$ aumenta a produção cardíaca (KAZDA *et al.*, 1982).

Além de sua ação sobre o músculo liso arterial, a nimodipino também bloqueia o influxo de cálcio dentro de outras células. Em células cerebelares de ratos, nimodipino diminui o pico da corrente de cálcio em 25% antagonizando o aumento do Ca^{2+} interno desencadeado pela superfusão com 15-75 mM de potássio (MARCHETTI *et al.*, 1995). Estudos de “patch voltage clamp” têm demonstrado que nimodipino bloqueia canais tipo-L voltagem-dependente nos neurônios centrais de culturas primárias de hipocampo de ratos neonatos (FANELLI *et al.*, 1994).

Nimodipino 0,3 a 30 μM produz uma depressão dose-dependente da atividade de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo ventral dos ratos (MERCURI *et al.*, 1994). A droga inibe o transporte de adenosina em membranas do córtex parietal de humanos (DECKERT *et al.*, 1993), e nas hemáceas (STRIESSNIG *et al.*, 1985). Blardi, e cols (2002) em estudo realizado com 12 pacientes afetados pela isquemia cerebral, verificou um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de adenosina após administração intravenosa (0,03 mg/Kg) e oral (30, 60 a 90 mg) de nimodipino.

1.4.2 Farmacologia clínica

Nimodipino apresenta potencial de reduzir a pressão arterial (PA) de maneira dose-dependente. Mudanças na PA são mais fáceis de ocorrer em pacientes que apresentam inicialmente elevada PA, como poderia ser esperado com um antagonista do cálcio (TETTENBORN *et al.*, 1985).

Nimodipino em dose única intravenosa de $1-30\mu\text{g/Kg}$ não apresenta efeitos sobre a pressão arterial ou na frequência cardíaca em voluntários sadios. A infusão intravenosa de $15-45\mu\text{g.Kg}^{-1}$ por um período superior a 3 horas reduz em 16,5% a pressão sanguínea sistólica em pacientes hipertensos (DOLLERY, 1999).

Dose única oral de 120mg de nimodipino a voluntários saudáveis reduz em 8 mmHg a PA sistólica. Pressão sanguínea diastólica reduz em 20 mmHg. Nimodipino 20-

40mg, três vezes ao dia, reduz a média da pressão sanguínea sistólica na posição supina em 14-18 mmHg em pacientes hipertensos; a diastólica é reduzida em ambas as posições, supina e na posição deitada (DOLLERY, 1999).

O nimodipino produz efeitos variáveis no fluxo sanguíneo cerebral em pacientes que tiveram acidente vascular cerebral. Pacientes com insuficiência cerebrovascular geralmente apresentam leve aumento no fluxo sanguíneo cerebral (TETTENBORN *et al.*, 1985).

Os efeitos do nimodipino no eletroencefalograma e no processamento de informações foi estudado no abuso de drogas. Em dois estudos separados, Herning e colaboradores (1995) testaram o efeito de doses simples e múltiplas de nimodipino, variando de 30 a 150 mg em 25 voluntários usando cocaína. A cocaína usada aumentou as ondas β do eletroencefalograma e reduziu as áreas de fluxo sanguíneo cortical. Doses simples e múltiplas de nimodipino produziram aumento significativo nas ondas α do eletroencefalograma e redução nas ondas β . Pesquisadores da Instituição Nacional de Abuso de Drogas sugerem que a administração crônica pode aliviar defeitos cognitivos observados em abusos desta substância durante a abstinência (HERNING *et al.*, 1995).

1.4.3 Farmacocinética

O método mais comum para quantificação do nimodipino em fluidos biológicos é a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons após extração simples com tolueno. O limite de detecção em plasma é $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (MUCK & BODE, 1994).

A farmacocinética, após administração intravenosa de nimodipino na dose de $30 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, foi estudada em seis voluntários. A curva de concentração plasmática *versus* tempo apresentou uma fase de distribuição inicial com uma meia-vida de cerca de 10 minutos e um lento declínio log-linear. A meia-vida de eliminação foi de $1,1 \pm 0,2\text{h}$, porém as amostras foram coletadas até 5 horas após a dose, possibilitando, assim, a perda de dados na fase de eliminação. O clearance foi $14,0 \pm 4 \text{ mL.min}^{-1}.\text{Kg}^{-1}$ e o volume de distribuição foi $0,9 \pm 0,4 \text{ L.Kg}^{-1}$ (RÄMSCH *et al.*, 1986).

A administração oral de três comprimidos de 20 mg de nimodipino mostrou que a biodisponibilidade foi 5 – 10%. A meia-vida de eliminação neste estudo foi $1,7 \pm 1,1$ h, mas o tempo de coleta foi limitado para 8 horas após a dose. A concentração plasmática máxima foi $20,6 \pm 11,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ em $0,8 \pm 0,3$ h após a administração da droga (DOLLERY, 1999).

O nimodipino é bem absorvido no trato gastrointestinal após administração oral, porém sofre extenso metabolismo de primeira-passagem resultando em concentrações plasmáticas muito baixas (ng/mL), baixa biodisponibilidade absoluta e significativa variação interindividual (LANGLEY & SORKIN, 1989). Sua cinética é linear na faixa de dose de 10-90 mg. Menos de 1% da droga é encontrada na urina de maneira inalterada. Cerca de 30 a 40% da dose administrada, por via oral, aparece na urina sob a forma de 9 metabólitos ácidos inativos (DOLLERY, 1999).

Em estudo realizado com seis pacientes com cirrose hepática observou-se clearance oral reduzido. O clearance oral foi de 187-163 L.h^{-1} em pacientes cirróticos e de $469 \pm 198 \text{ L.h}^{-1}$ em pessoas normais. A meia-vida de eliminação, após administração oral, foi $7,9 \pm 1,9$ horas em pacientes com doença hepática e $5,7 \pm 1,0$ horas em pessoas saudáveis (GENGO *et al.*, 1987).

Estudos com dose única em cobaias grávidas demonstraram que a transferência placentária do nimodipino era limitada; os níveis de radioatividade eram de 8-15 vezes mais baixos nos fetos do que na placenta (SUWELACK & WEBER, 1985). Entretanto, níveis significantes do fármaco no feto e atividade vasodilatadora foram relatados em 10 pacientes com pré-eclampsia após a administração oral de 30 mg de nimodipino a cada 4 horas até 24 horas depois de sua administração. A presença do nimodipino no leite materno não é conhecida. Não há relação entre a concentração plasmática de nimodipino e seus efeitos terapêuticos (BELFORT *et al.*, 1994).

O nimodipino parece atravessar a barreira hematoencefálica. Rämsch e cols (1986), mediram a concentração de nimodipino em amostras do líquido cefalorraquidiano tiradas de 15 pacientes com hemorragia subaracnóidea. Estes pacientes receberam uma infusão intravenosa constante de nimodipino 2 mg.h^{-1} durante 14 dias. A concentração média

da droga no líquido cefalorraquidiano, durante a infusão intravenosa, foi $0,3 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, e a média da concentração plasmática foi $76,9 \pm 34 \mu\text{g.L}^{-1}$.

TABELA 1 – Características farmacocinéticas do nimodipino

Absorção oral	53%
Metabolismo pré-sistêmico	80%
Meia-vida plasmática	
<i>Variação</i>	1,1 – 5,7 h
<i>Média</i>	8 – 9 h
Volume de Distribuição	$0,9 - 2,3 \text{ L.Kg}^{-1}$
Ligação às proteínas plasmáticas	95%

1.4.4 Metabolismo

A principal via do metabolismo do nimodipino é a desmetilação do éter etoximetoxi, deidrogenação para o análogo piridínico III, clivagem dos grupos éster por hidrólise a ácidos carboxílicos e hidroxilação do grupo metil com a conjugação de glicuronídeos subseqüentes. Apenas o metabólito análogo da diidropiridina desmetilada é ativo, mas sua atividade é 20 vezes menor do que a da nimodipino (RÄMSCH *et al.*, 1986; MEYER *et al.*, 1993).

A administração de 60 mg oral de nimodipino produz um pico de concentração plasmática de $20\mu\text{g.L}^{-1}$ em aproximadamente 30 minutos após a administração. Em comparação, o metabólito III apresenta um pico de concentração plasmática de aproximadamente $100\mu\text{g.L}^{-1}$ em aproximadamente 45 minutos após a administração da droga. O pico da concentração plasmática do metabólito II é de $50\mu\text{g.L}^{-1}$ e o do metabólito I é de $20\mu\text{g.L}^{-1}$. A área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo é boa para o metabólito III, o qual é detectado em aproximadamente $5\mu\text{g.L}^{-1}$ até 8 horas após a administração. Medidas na concentração do metabólito II são detectadas 5 horas após a dose, mas não em 8 horas, e o metabólito I não é mais detectado em 3 horas após a administração (RÄMSCH *et al.*, 1986).

1.4.5 Usos terapêuticos

O nimodipino está indicado no tratamento da hemorragia subaracnóidea (RINKEL *et al.*, 2002; SATCHURA & NILEWICZ, 2002; ROOS *et al.*, 2001; HARALANOV *et al.*, 2001; MEDELE *et al.*, 2000; QURESHI *et al.*, 2000), acidente vascular cerebral isquêmico (SOBRADO *et al.*, 2003; SVETIYI & KURKOVA, 2002; AHMED *et al.*, 2000; FOGELHOLM *et al.*, 2000), profilaxia da enxaqueca (EVERS, 1999; TITUS, 1997), distúrbios afetivos (FRYE *et al.*, 2003; GOODNICK, 2000; BALON & RAMESH, 1996; SARFATI *et al.*, 1996) analgesia/tolerância a opiáceos (JABÁ *et al.*, 2001; SANTILLAN *et al.*, 1998; SANTILLAN *et al.*, 1994).

1.4.6 Formas farmacêuticas

As preparações de nimodipino estão disponíveis para administração oral e parenteral.

1.4.6.1 Forma oral

Nimotop® cápsulas (Bayer, USA) contendo 30 mg de nimodipino.

Nimotop® comprimidos (Bayer UK) contendo 30 mg de nimodipino.

As cápsulas podem ser estocadas entre 15°C e 30°C, protegidas da luz. Os comprimidos podem ser estocados até 25°C.

1.4.6.2 Forma parenteral

A infusão intravenosa de Nimotop® (Bayer, UK) é uma solução aquosa contendo 200 µg.mL⁻¹ de nimodipino em uma garrafa de 50 mL. Os excipientes incluem 17% de macrogol e 20% de etanol.

A infusão intravenosa pode ser estocada até 25°C. A infusão deve ser protegida da luz durante a armazenagem e administração. Sua estabilidade em luz difusa e artificial é de 10 horas.

1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massa.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS *et al.*, 1997).

Para o acompanhamento de fármacos *in vivo* são utilizadas metodologias analíticas capazes de quantificar e identificar com precisão e exatidão os mesmos em fluídos biológicos. Uma das técnicas mais empregadas para este tipo de análise é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Na utilização desta técnica as amostras devem passar por um processo de purificação. Na rotina, as técnicas mais utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes no fluído biológico são: extração líquido-líquido e extração em fase sólida (LOBO, 2001).

Esse tipo de extração é vantajosa por ser simples e pela variedade de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, ocorre a desnaturação das proteínas presentes na amostra, eliminando, assim, a contaminação da coluna cromatográfica (LOBO, 2001).

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. A meta final é a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (LOBO, 2001).

A extração líquido-líquido possui algumas desvantagens: as amostras que possuem grande afinidade pela água, que são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultam em perda do analito. É necessária a utilização de solventes ultrapuros, uma vez que impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra. O grande volume de solvente utilizado acaba gerando problemas de descartes, além de ser um processo susceptível a erros e de difícil automação. Apesar destas desvantagens, a extração líquido-líquido é considerada uma técnica clássica de pré-tratamento de amostra.

Para o uso da extração líquido-líquido em fluídos biológicos primeiramente é necessária a escolha adequada do solvente orgânico e ajuste do pH da amostra para que ocorra uma boa recuperação do analito. Vários tipos de solventes orgânicos são utilizados para extração de drogas ácidas e básicas presentes na amostra de fluídos biológicos. Quanto maior a afinidade do analito pelo solvente orgânico maior a recuperação. Substâncias básicas são normalmente extraídas em pH maior que 7,0 e extração de substância ácida em pH menor que 5,0. Este tipo de extração é muito utilizado para substâncias presentes em fluídos biológicos (LOBO, 2001).

A cromatografia líquida de alta eficiência é o mais importante membro de uma família inteira de técnicas de separação. Utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. As colunas utilizadas são muito eficazes, porém oferecem grande resistência à vazão da fase móvel. Por esta razão, é necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão (até 400 bars) que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna analítica (COLLINS *et al.*, 1997).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em

vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. A detecção contínua e com grande reprodutibilidade fornecida por esta técnica eleva as análises qualitativa e quantitativa a um alto nível de exatidão e precisão.

1.6 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica analítica usada para identificar compostos desconhecidos, quantificar materiais conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais das moléculas. A detecção de compostos pode ser conseguida para quantidades tão pequenas como 10^{-12} , 10^{-15} g para um composto de massa de 1000 Dalton. Isto significa que os compostos podem ser identificados em concentrações muito baixas (uma parte em 10^{12}) em misturas quimicamente complexas.

A espectrometria de massa é uma técnica muito utilizada na identificação estrutural de biomoléculas tais como carboidratos, ácidos nucleicos e esteróides, no sequenciamento de biopolímeros tais como proteínas e oligossacarídeos, determinação de compostos de interesse biomédico e bioquímico em matrizes biológicas.

O espectrômetro de massa é um instrumento que separa íons, positivos ou negativos, produzidos a partir de átomos ou moléculas, quer sejam das mais simples às mais complexas, de acordo com a razão massa/carga (m/z).

Os princípios científicos em que a técnica se baseia são simples. A essência da técnica envolve a geração de íons que são depois detectados. Uma das técnicas de ionização, em maior expansão, é por electrospray. Há, essencialmente, três características que a diferenciam das outras técnicas de ionização. A primeira delas é a capacidade para produzir íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo, assim, a razão m/z , de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular até centenas de kDa, em praticamente todo o tipo de analisadores. Uma segunda característica é que as amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, tornando possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último e não menos importante, há o fato de ser o *electrospray* uma técnica de ionização suave, permitindo que as interações não

covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa (SIUZDAK *et al.*, 1999).

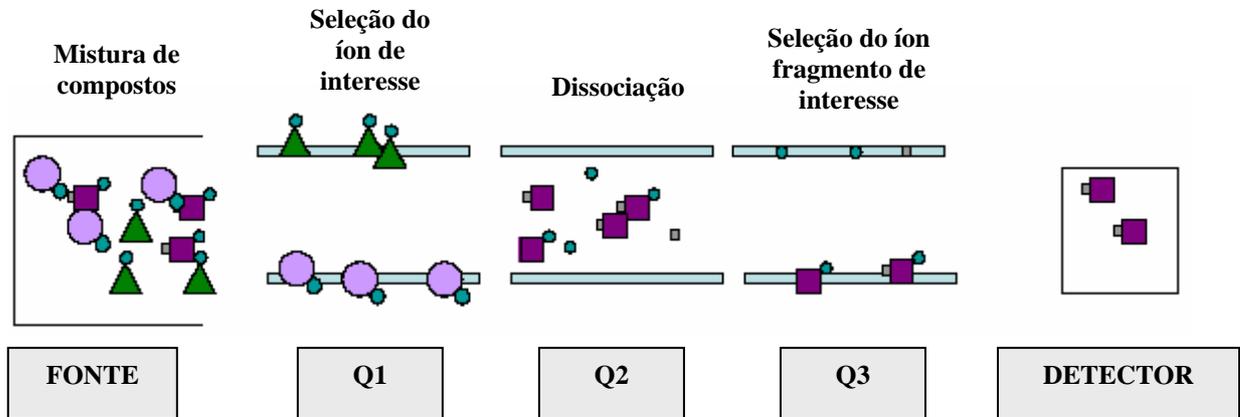


FIGURA 2 – Esquema demonstrativo da fragmentação de compostos utilizando espectrômetro de massa triplo-quadrupolo no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM).

O desenvolvimento da técnica de ionização por *electrospray* permitiu, assim, novas possibilidades para análise de compostos de elevada massa molecular de todos os tipos, incluindo proteínas, nucleotídeos e polímeros sintéticos, sendo por isso uma técnica muito usada em investigação biológica, bioquímica, farmacêutica e médica (SIUZDAK *et al.*, 1999).

A produção de íons em *electrospray* requer essencialmente dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas quase à pressão atmosférica, seguida de evaporação da gota em condições que a permitam.

As soluções são primeiramente pulverizadas eletrostaticamente com formação de gotas pequenas e altamente carregadas. A nebulização da solução é, em alguns casos, facilitada pela ajuda de um gás nebulizador. Posteriormente, as moléculas do analito são separadas do solvente na forma de íons. Este passo de formação de íons, como em muitas das técnicas de ionização consideradas suaves, é provavelmente o menos compreendido no processo global do *electrospray*. Alguns mecanismos têm sido propostos para a desadsorção de íons a partir de gotas carregadas, sendo que o modelo de resíduo de carga de Dole (1968),

aplicado a macromoléculas, foi, talvez, o primeiro a servir de base para a atual técnica de *electrospray*. Nesse modelo é considerado que, à medida que o solvente se evapora, a densidade de carga à superfície aumentará até que as forças repulsivas de Coulomb, entre as cargas superficiais, excederão a tensão superficial levando à divisão da gota inicial. Se esse processo de divisão continuar e se a solução original for suficientemente diluída, será alcançado um estado no qual cada gota conterá uma única molécula que reterá parte da carga inicial, ou seja, formará macro íons.

As fontes iônicas dos espectrômetros de massa estão, em geral, situadas numa região de alto vácuo. A fonte de IES encontra-se à pressão atmosférica e a evaporação do solvente é muitas vezes completada por intermédio de um fluxo contra corrente de um gás, em geral, argônio. Os íons gerados são, depois, transferidos desta zona de alta pressão para a zona de alto vácuo do analisador de massa.

O analisador mais utilizado, e mesmo, o primeiro a ser comercializado em *electrospray* através da espectrometria de massa, é o quadrupolo. Isto se deve, em princípio, ao fato de os quadrupolos serem relativamente baratos, fáceis de usar e capazes de fornecer bom rigor nos valores de massa medidos.

O analisador de massa quadrupolo é constituído por quatro eletrodos cilíndricos de geralmente 5-11 cm de comprimento. Cada cilindro tem aplicado uma voltagem de corrente direta e um adicional potencial de frequência de radio. Dois dos cilindros têm uma corrente direta de carga positiva, enquanto as outras duas têm carga negativa. A fase de frequência de radio é oposta para os eletrodos positivos e negativos.

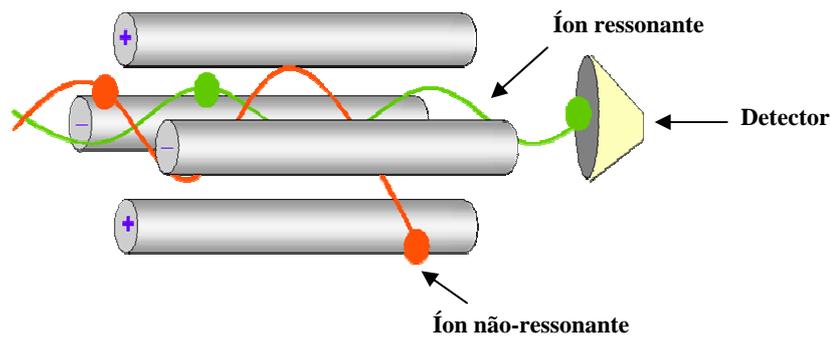


FIGURA 3 – Filtro de massa quadrupolo

É possível gerar tanto íons atômicos quanto íons moleculares de quase todos os materiais e introduzir, eficientemente, esses íons no sistema de vácuo do espectrômetro de massa para análise. Excetuando os polímeros orgânicos não polares, que são difíceis de ionizar, parece não ter limite de tamanho e complexidade das moléculas que podem ser ionizadas e analisadas. Durante a década passada, não foram introduzidos novos métodos de ionização, mas enormes avanços foram feitos na sensibilidade e utilidade deles. Esse desenvolvimento tem ocorrido em paralelo com o melhoramento dramático dos analisadores de massa, incluindo melhor resolução, acurácia, sensibilidade e velocidade de análise. A aplicação dessas técnicas tem crescido exponencialmente, particularmente nas ciências da vida (VESTAL, 2001).

1.7 Validação de métodos bioanalíticos

A bioanálise, talvez mais que muitos outros tipos de análises, envolve fatores desconhecidos tais como baixas concentrações do analito e matrizes complexas que podem conter componentes desconhecidos e variáveis.

Métodos bioanalíticos, quando bem desenvolvidos e validados, empregados para determinação quantitativa de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas, são um fator determinante na geração de dados reprodutíveis e confiáveis que são usados na avaliação e interpretação dos resultados obtidos após execução de estudos de biodisponibilidade, bioequivalência, farmacocinética, toxicocinética e química analítica.

Sabe-se que muitas técnicas analíticas já desenvolvidas e validadas são constantemente adaptadas, a fim de atender as exigências requeridas para a finalidade a ser empregada. É também importante enfatizar que cada técnica analítica possui suas próprias características que variam de analito para analito.

Validar, em análise química, é estar com o objetivo voltado para a confiabilidade analítica do método escolhido ou desenvolvido para se obter o resultado. Quando se pensa em validar ou verificar se um determinado método é confiável para o analito ou espécie a ser analisada na amostra que estará sendo utilizada, todo o sistema ao redor desta metodologia deve atender todos os critérios de confiabilidade. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados (LEITE, 2002).

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (por exemplo, estudos de equivalência farmacêutica) e em matrizes biológicas (por exemplo, estudos de bioequivalência). As técnicas mais utilizadas no desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica para quantificação de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma ou urina são a cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e estas combinadas com a espectrometria de massa (MS) tais como, LC-MS, LC-MS-MS, CG-MS e CG-MS-MS (SHAH *et al.*, 2000).

1.7.1 Pré-requisitos para validar uma metodologia bioanalítica

A realização de uma pesquisa bibliográfica é a primeira etapa para a busca do método bioanalítico. Uma vez existindo o método, ele deverá ser testado quanto a sua reprodutibilidade. Na inexistência de uma metodologia bioanalítica para um determinado fármaco, deve-se desenvolver um método estabelecendo todos os parâmetros de validação, que responda satisfatoriamente à aplicação desejável.

A pesquisa clínica com medicamentos requer a participação de voluntários humanos que não podem ser envolvidos no estudo, sem a certeza de que seus sacrifícios

resultem em um benefício para a sociedade. A certeza desses resultados para os voluntários só pode ser garantida se o método analítico para realização do estudo tiver sido desenvolvido previamente de forma a assegurar que os fluídos biológicos obtidos dos voluntários serão devidamente analisados (ANVISA, 2002).

No desenvolvimento de um método é necessário verificar toda a metodologia de preparação da amostra, a qual envolve os processos de extração, separação, purificação, identificação e quantificação do fármaco na matriz biológica. Para tanto, alguns estudos preliminares de validação devem ser efetuados visando à determinação dos seguintes parâmetros: exatidão (repetitividade), precisão (reprodutibilidade), recuperação, linearidade (curva de calibração), especificidade e estabilidade (BRASIL, 2003a).

1.7.1.1 Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão de um método analítico descreve a proximidade dos resultados médios obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro (concentração) do fármaco. A exatidão e precisão são determinadas pela análise de amostras em replicata, contendo quantidades conhecidas do analito. A exatidão e precisão devem ser medidas usando um mínimo de 5 determinações por concentração. Um mínimo de três concentrações (controles de qualidade baixo, médio e alto) pertinente a toda faixa de estudo é recomendado. A precisão e exatidão determinadas a cada nível de concentração não devem exceder 15% em coeficiente de variação (CV) exceto no limite mínimo de quantificação, o qual não devemos desviar mais de 20% em CV (BRESSOLE *et al.*, 1996).

A precisão e exatidão são posteriormente subdivididas em precisão/exatidão “intralote”, que fornece a precisão e exatidão durante uma única corrida analítica, e precisão/exatidão “inter lote” que mede a precisão e exatidão ao longo do tempo, podendo envolver diferentes analistas, equipamentos, reagentes e laboratórios (BRESSOLE *et al.*, 1996).

Uma vez que o método analítico foi validado para uso rotineiro, sua exatidão e precisão devem ser monitoradas regularmente para assegurar que o método continua a ter um desempenho satisfatório.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média determinada}}$$

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

1.7.1.2 Recuperação

A Recuperação de um analito em um ensaio é a resposta do detector de uma quantidade de analito adicionada e ou separada de uma matriz biológica. A recuperação está ligada à eficiência do método analítico de separação, dentro dos limites de variabilidade. A recuperação de um analito não precisa ser 100%, mas a quantidade de analito recuperado e do padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutível. Experimentos para recuperação devem ser feitos comparando resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta) com soluções-padrão não extraídas nas mesmas concentrações representando 100% de recuperação (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

O percentual recuperado deve ser tal que não interfira na quantificação da corrida analítica que se segue. O percentual de recuperação desejado é, na realidade, função da relação da detectabilidade do método com o limite de quantificação necessário. Por exemplo, se em função da faixa de concentração pertinente ao ensaio for necessário obter um limite de quantificação na matriz biológica antes da separação de 10 ng/mL e em meio biológico pós-separação detectar-se com confiabilidade 6 ng/mL, a recuperação necessária será de no mínimo 60% (ANVISA, 2002).

1.7.1.3 Curva de calibração/linearidade

O método analítico em desenvolvimento deve atender aos requisitos de sensibilidade e detectabilidade planejados para o fármaco em função das suas concentrações plasmáticas na curva farmacocinética. Dessa forma, visando a determinação da faixa de concentração onde a resposta é linear e o respectivo limite de quantificação, é necessário determinar a relação concentração do fármaco *versus* resposta do detector - curva de calibração (KIMANANI, 1998).

Deve-se gerar uma curva de calibração para cada fármaco e corrida analítica, a qual será usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. Um número suficiente de padrões deve ser usado para definir adequadamente a relação entre concentração e resposta. Uma curva de resposta deve ser preparada na mesma matriz biológica que as amostras de um estudo, adicionando na matriz as concentrações conhecidas do analito. O número de padrões usados na construção de uma curva de resposta será uma função dos valores analíticos esperados no estudo e da relação analito/resposta. Uma curva de calibração deve consistir de uma amostra “branco” (matriz processada sem o padrão interno), uma amostra “zero”, se pertinente, (matriz processada com o padrão interno) e seis ou mais amostras intermediárias cobrindo a faixa esperada, incluindo o limite de quantificação (BOULANGER, *et al.*, 2003).

1.7.1.4 Limite de quantificação

Estabelecido por meio da análise da matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de quantificação deve ser, no mínimo, 5 vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo no tempo de retenção do fármaco (BRASIL, 2003a).

1.7.1.5 Limite de detecção

Estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o limite de detecção seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base (BRASIL, 2003a).

1.7.1.6 Especificidade/seletividade

Seletividade é a habilidade de um método analítico em diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes na amostra denominados interferentes. Os interferentes podem ser originários de fontes endógenas (metabólitos e/ou precursores; produtos de degradação do fármaco; co-administração de fármacos, vitaminas e/ou seus metabólitos, produtos de interação de fármaco, componente biológico e outras substâncias que ocorrem naturalmente em fluidos biológicos, isto é, hormônios, proteínas, lipídios, substâncias dietéticas, etc) e/ou exógenas (impurezas dos reagentes usados, substâncias liberadas pelos recipientes em uso ou resultantes de lavagem inadequadas de vidrarias, equipamentos e instrumentos).

Os níveis de interferentes devem ser avaliados antes de iniciar o desenvolvimento do método. Uma vez que o método esteja no estágio de validação, o teste de seletividade deve assegurar níveis e reprodutibilidade dos interferentes e o seu impacto na precisão e exatidão do método em relação ao limite de quantificação (ANVISA, 2002).

Para a seletividade, análises de amostras branco da matriz biológica apropriada (plasma, urina ou outra matriz) devem ser obtidas de, pelo menos, seis fontes. Cada amostra branco deve ser testada para interferentes, e a seletividade deve ser assegurada no limite de quantificação (BRAGGIO *et al.*, 1996).

Substâncias potencialmente interferentes numa matriz biológica incluem componentes endógenos da matriz, metabólitos, produtos de decomposição e durante o estudo, medicação tomada concomitantemente e outros possíveis interferentes. Se o método for usado para quantificar mais de um analito, cada analito deve ser testado para assegurar que não há interferência. Para verificar este item, recomenda-se que sejam utilizadas as seguintes

amostras: 04 lotes de plasma normal, 01 lote de plasma lipêmico e 01 lote de plasma hemolisado (HARTMANN *et al.*, 1998).

Para verificar a interferência, trabalhar com adição de padrão sobre os plasmas em três concentrações distintas (alta, média e baixa) em triplicata por concentração (BRASIL, 2003a).

1.7.1.7 Estabilidade

O desenvolvimento do método é a etapa mais importante nos estudos analíticos de bioequivalência/farmacocinética, visto que o comportamento dos fármacos nas matrizes biológicas depende dos níveis de interferentes que interagem com a molécula ativa. Um outro aspecto a ressaltar é a mudança dos constituintes da matriz biológica submetida a processo de estocagem levando em consideração o tempo e a temperatura. Assim sendo, produtos de degradação, complexação, oxidação, metabólitos e outras substâncias alteram a resposta de um método se o mesmo não for suficientemente seletivo para os estudos com matrizes biológicas frescas e envelhecidas (DADGAR, *et al.*, 1995).

Os estudos prévios de estabilidade em matrizes biológicas são essenciais para fornecer os parâmetros de adequabilidade do método em amostras envelhecidas e condições de armazenamento das amostras para os estudos analíticos. Tais estudos permitem a confiabilidade necessária ao método, pois os resultados a serem fornecidos não correrão riscos de serem rejeitados por erros de metodologia, quando a amostra é submetida a processo de envelhecimento. Por outro lado, o armazenamento da amostra em uma dada temperatura por um tempo determinado deve ser baseado em dados científicos que possam afirmar que, naquelas condições de estocagem, o fármaco não sofrerá alteração.

A estabilidade de fármacos em fluidos biológicos é uma função do tempo e da temperatura de estocagem, das propriedades químicas do fármaco, matriz e recipiente (CAUSON, 1997). A estabilidade de um analito numa matriz particular e recipiente é relevante apenas para aquela matriz e recipiente e não deve ser extrapolada para outros tipos de matrizes e recipientes. Os procedimentos de estabilidade devem avaliar a estabilidade do fármaco durante a coleta e manuseio da amostra, após estocagem de longa duração

(congelamento na temperatura de estocagem pretendida), estocagem de curta duração (temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e processo analítico. As condições usadas nos experimentos de estabilidade devem ser previamente estabelecidas. O procedimento deve também incluir uma avaliação da estabilidade do analito na solução estoque (DADGAR & BURNETT, 1995; SALEM *et al.*, 2004).

1.8 Justificativa

O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, mais eficazes e seguros, contribui para o aumento da utilização dos medicamentos que se tornaram uma importante ferramenta terapêutica nas mãos dos profissionais da saúde que são os responsáveis por parte significativa da melhoria da qualidade e expectativa de vida da população.

A confiabilidade dos medicamentos é assegurada através das definições de rígidos critérios de qualidade adequados para a análise de concessão de registro desses medicamentos, previstos na legislação. A garantia desses padrões de qualidade constitui uma ferramenta para a segurança e a confiabilidade dos medicamentos (SOARES, 2002).

Para garantir que a qualidade dos medicamentos no Brasil, a legislação brasileira foi baseada nas regulamentações da Comunidade Européia, dos E.U.A. (FDA- Food and Drug Administration) e a do Canadá (Health Canada).

O desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação de fármacos em matrizes biológicas quer seja sangue total, plasma, soro ou urina, é uma ferramenta de grande importância para o controle de qualidade dos medicamentos. é um fator determinante na geração de dados reprodutíveis e confiáveis após execução de estudos farmacocinéticos

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ❖ Desenvolver e validar um método sensível, rápido e específico para quantificação de nimodipino em plasma humano.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar as vantagens da determinação analítica do nimodipino realizada pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa em relação aos métodos descritos.
- ❖ Avaliar o perfil farmacocinético de duas formulações de nimodipino administrado em voluntários sadios de ambos os sexos participantes de um estudo de biodisponibilidade comparativa.

MATERIAIS

3 MATERIAIS

3.1 Desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica

3.1.1 Materiais utilizados

Para o desenvolvimento, validação e aplicação da metodologia bioanalítica proposta foram utilizados aparelhos, padrões, reagentes e amostras biológicas, descritos nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6.

TABELA 2 - Material utilizado na etapa analítica.

Descrição	Fabricante/País
Pipetas de volume variável	Gilson Pipetman, França
Pipetas de plástico descartáveis	Sigma, França
Ponteiras plásticas para pipetas (capacidade 5-200 μ L)	Axygen, USA
Ponteiras plásticas para pipetas (capacidade 200-1000 μ L)	Axygen, USA
Tubos de ensaio 120 x 11 mm	Unilab, Brasil
Mesa agitadora (Finemixer)	Fine PCR, Coréia
Misturador (Vortex)	Phoenix, USA
Balança analítica	Precisa 40SM-200A, Alemanha

TABELA 3 - Componentes do HPLC.

Componente	Fabricante/Modelo
Bomba analítica	HP, Quat Pump Series 1100
Auto-injetor	HP, ALS Series 1100
Coluna analítica	Varian [®] Polaris, C ₁₈ (3 μ m, 50 x 2,0 mm)
Pré-coluna	Securityguard [™] , C ₁₈ (4,0 x 3,0 mm)

TABELA 4 - Componentes do Espectrômetro de Massa.

Componente	Fabricante/Modelo
Espectrômetro de Massa	Micromass, Quattro Micro TM
Gerador de Nitrogênio	Dominick Hunter, UHPLCMS 18
Programa	Micromass, Mass Lynx 3,5

TABELA 5 - Padrões utilizados na etapa analítica.

Descrição	Finalidade	Fabricante
Nimodipino	Analito	ICN Biomedicals
Dibucaína	Padrão interno	Twinbrook Parkway Rockville

TABELA 6 - Reagentes utilizados na etapa analítica.

Descrição	Finalidade
Acetato de Amônio (grau p.a)	Constituinte da fase móvel
Água (purificada através de Milli-Q)	Preparo da solução de acetato de amônio utilizada na fase móvel
Acetonitrila (grau HPLC)	Preparo da fase móvel e da solução padrão de nimodipino
Metanol (grau HPLC)	Preparo da solução padrão de dibucaína
Acetato de Etila (grau p.a)	Extração líquido-líquido
Hexano (grau p.a)	Extração líquido-líquido

Foram utilizadas quantidades apropriadas de plasmas humanos, oriundos de voluntários distintos, sob as seguintes condições: 4 lotes de plasma humano normal, 1 lote de plasma humano hiperlipêmico e 1 lote de plasma humano hemolisado.

3.2 Aplicação do método para estudo farmacocinético em 24 voluntários sadios

3.2.1 Material utilizado

TABELA 7 - Material utilizado na etapa clínica.

Material Utilizado para Coleta	Fabricante
Agulhas descartáveis 25x8	BD – USA
Agulhas 21G x 1 Vacutainer	BD – USA
Alcool 70%	HUWC-UFC
Algodão	Johnson and Johnson – USA
Coletores de fezes	Fornecido pelo Laboratório Louis Pasteur
Coletores de urina	Fornecido pelo Laboratório Louis Pasteur
Pipetas ajustáveis (100µL, 200µL, 1000µL)	Gilson Pipetman, França
Ponteiras plásticas para pipetas (capacidade 5-200µL)	Unilab, Brasil
Ponteiras plásticas para pipetas (capacidade 200-1000µL)	Unilab, Brasil
Seringas descartáveis de 10ml	BD – USA
Suporte para conexão da agulha	BD – USA
Tubos Vacutainer	BD – USA
Tubos plásticos para armazenar plasma (tipo “corning”)	Corning Costar Corporation – Canadá

TABELA 8 - Equipamentos utilizados na etapa clínica.

Aparelhos	Fabricante
Termômetro thermo flat	Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda – Brasil
Esfignomanômetro Tyco 7050 - 14	Tyco – USA
Estetoscópio	Lytman – USA
Eletrocardiógrafo	Dixtal – Brasil
Balança	Balmak - Brasil
Centrífuga	Eppendorf
Freezer horizontal – 20°C	Eletrolux - Brasil

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica

4.1.1 *Validação pré-estudo do método bioanalítico*

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método bioanalítico atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados (BRASIL, 2003).

4.1.1.1 *Padrão interno*

A escolha do padrão interno utilizado no processo de validação e desenvolvimento do método bioanalítico proposto deu-se através da análise de sua estrutura química, bem como do fármaco em estudo. Os critérios utilizados para a escolha do padrão interno foram: presença de grupos funcionais similares em ambas às estruturas; semelhança quanto às características químicas de cada molécula; e composição química elementar. Através desta análise preliminar foi escolhido, como padrão, interno a dibucaína.

4.1.1.2 *Condições de detecção no espectrômetro de massa no modo MS/MS*

Escolhido o padrão interno, iniciou-se a avaliação das condições cromatográficas e do espectrômetro de massas ideais para o desenvolvimento do estudo.

O espectrômetro de massa foi calibrado antes do início das análises, utilizando uma solução de nimodipino de 10 µg/mL e dibucaína 5 µg/mL para avaliar a integridade dos cromatogramas, os íons moleculares e a performance do espectrômetro.

A espectrometria de massa foi executada utilizando-se um aparelho do tipo triplo quadrupolo modelo Quattro II (Micromass, Manchester, UK) equipado com uma interface de ionização de pressão atmosférica com *electrospray* (API-ES), operando em íon positivo usando um fluxo cruzado (cross-flow) como o “counter” eletrodo (Micromass).

O espectrômetro de massa equipado com interface de *electrospray* operado no modo positivo (ES+) e programado para monitorar múltiplas reações (MRM): 418,6 > 342,6 m/z para monitoramento do nimodipino e 344,2 > 271,0 m/z para o monitoramento da dibucaína. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram de 100°C e 300°C, respectivamente. O fluxo de nitrogênio no cone foi de 90 L/h e na dessolvatação 400 L/h, tendo como pressão de argônio para a dissociação $2,5 \times 10^{-3}$ mbar. Os valores de voltagem do capilar, cone e energia de colisão foram, respectivamente: 4,2 KV, 15 V e 10 eV para o nimodipino e 4,2 KV, 20 V e 21 eV para a dibucaína.

4.1.1.3 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se um HPLC modelo 1100 da Hewlett-Packard, com bomba binária, desgaseificador, auto-injetor, coluna analítica (Varian® Polaris C₁₈; 3 µm, 50 x 2,0 mm) e uma pré-coluna (Securityguard™ C₁₈; 4,0 x 3,0 mm), mantidas a temperatura ambiente (20°C).

O cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas no modo MS/MS foi programado para operar com fluxo de 0,12 mL/min, volume de injeção de 10 µL e o tempo total de corrida foi ajustado para 4,5 min.

4.1.1.4 Extração das amostras (extração líquido-líquido)

Estabelecidas as condições do equipamento, iniciaram-se os testes de extração das amostras. Inicialmente foram testados os seguintes solventes orgânicos: hexano/acetato de etila (1:1 v/v); hexano/butanol (99:1 v/v); hexano/álcool isoamílico (9:1 v/v); éter/diclorometano (7:3 v/v).

Os procedimentos de extração líquido-líquido das amostras foram aplicados não apenas para as amostras dos voluntários analisadas, mas também para os padrões das curvas de calibração e amostras de controle de qualidade. Para a extração do analito (nimodipino) e do padrão interno (dibucaína) das amostras biológicas, os seguintes passos foram seguidos (Figura 4):

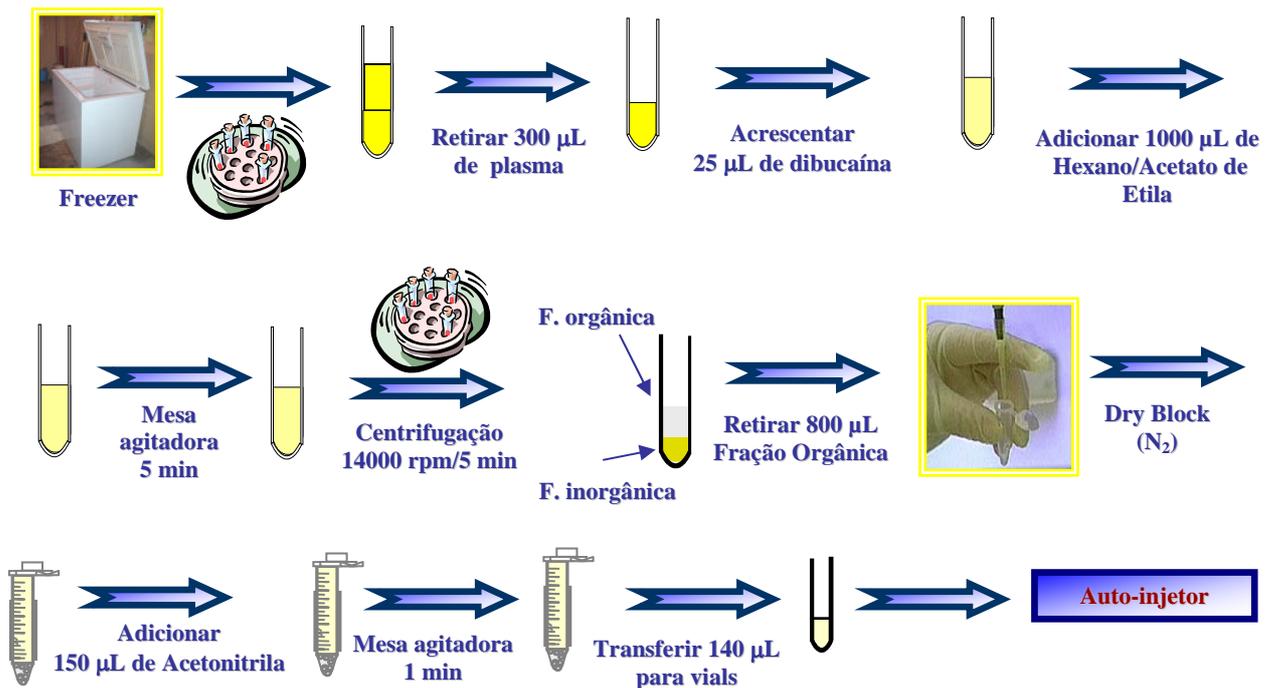


FIGURA 4 – Esquema do procedimento de extração líquido-líquido

- As amostras foram retiradas do freezer e descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 14000 rpm por cinco minutos. Em seguida foram colocados em tubos eppendorff 300 µL de plasma, 25 µL da solução do padrão interno (dibucaína 50 ng/mL), 1000 µL da solução extratora e agitou-se por 5 minutos na mesa agitadora (controle de velocidade ajustado na posição 9);
- Centrifugou-se em 14000 rpm, durante 5 minutos a temperatura ambiente;
- Transferiram-se 800 µL do sobrenadante (fase orgânica) para tubos eppendorff, evaporou-se o solvente sob fluxo de nitrogênio a 37°C, ressuspenso-se o resíduo

em 150 μL de acetonitrila e agitou-se por 1 minuto na mesa agitadora (controle de velocidade ajustado na posição 9);

- d) Transferiu-se 140 μL das amostras para “inserts” de vidro descartáveis e injetou-se alíquotas de 10 μL no sistema cromatográfico.

Todas as etapas de extração das amostras biológicas foram realizadas em uma capela de fluxo laminar vertical, para evitar exposição às soluções de reagentes tóxicos e voláteis.

As amostras foram analisadas em duplicata. A escolha do solvente extrator, que seria utilizado no estudo, foi feita através da análise da recuperação da droga e do padrão interno. O cálculo da recuperação do fármaco é feito comparando-se as áreas dos picos do nimodipino das amostras extraídas do plasma com as áreas dos picos do nimodipino 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ preparado em solução (solução não extraída). Dentre os solventes testados o hexano/acetato de etila (1:1 v/v) apresentou recuperação mais adequada.

4.1.1.5 Soluções padrão

Após as fases de testes de extração e das condições do equipamento, foi iniciado o processo de preparação das soluções padrão utilizadas no estudo.

Todas as soluções padrão preparadas foram transferidas para frascos de plástico rotulados, com batoque e tampa de rosca, armazenadas na geladeira a +4 °C e substituídas após sete dias do preparo.

4.1.1.5.1 Solução padrão de nimodipino

Uma massa correspondente a 5 mg de nimodipino foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (50 mL) e preparada em acetonitrila para a obtenção de uma solução de concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (solução estoque). A partir da solução estoque preparou-se uma solução de nimodipino (solução de trabalho) através de diluição apropriada em acetonitrila, para obter de solução de concentração 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 9).

TABELA 9 – Soluções de nimodipino utilizadas no pré-estudo, validação e estudo.

Concentração final de nimodipino em solução (µg/mL)	Volume pipetado mL/Concentração da solução de nimodipino (µg/mL)	Volume final (mL)	Fator de diluição
100	-	-	-
10	1 / 100	10	1:10

4.1.1.5.2 Solução padrão de dibucaína (padrão interno)

Uma massa correspondente a 5 mg de dibucaína foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (50 mL) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração 100 µg/mL (solução estoque). A partir da solução estoque, preparou-se uma solução de dibucaína (solução de trabalho) através de diluição apropriada em acetonitrila, para obter de solução de concentração 50 ng/mL (Tabela 10).

TABELA 10 – Soluções de dibucaína utilizadas no pré-estudo, validação e estudo.

Concentração final de dibucaína em solução (µg/mL)	Volume pipetado µL/Concentração da solução de dibucaína (µg/mL)	Volume final (mL)	Fator de Diluição
100	-	-	-
0,05	50 / 100	100	1:2000

4.1.1.6 Preparo da fase móvel acetonitrila - acetato de amônio 0,02 mol/L (80:20 v/v)

Em um béquer colocou-se 0,62 g de acetato de amônio e dissolveu-se o sal em 400 mL de água. Após homogeneização, a solução foi filtrada, transferida para um recipiente de vidro e, antes do uso, desgaseificada. Em outro recipiente de vidro colocou-se acetonitrila, previamente filtrada, e desgaseificou-se. A mistura dos componentes da fase móvel foi realizada através de uma bomba analítica modelo HP/Quat Pump Serie 1100.

4.1.1.7 *Preparação dos padrões da curva de calibração*

A curva de calibração inclui a análise de uma amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), uma amostra zero (matriz biológica com adição de padrão interno) e de amostras contendo padrão interno e padrão do fármaco contemplando a faixa prevista de concentrações que se pretende analisar. Os padrões de calibração foram preparados adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano.

Para o preparo do padrão de nimodipino 100 ng/mL (em plasma), uma alíquota de 400 µL da solução de nimodipino 10 µg/mL (preparada em acetonitrila) foi transferida para um tubo de vidro. O solvente foi seco sob fluxo de nitrogênio a 37°C e o resíduo foi ressuspendido em 40 mL de pool de plasma branco. A partir desta solução, foram feitas diluições com pool de plasma branco, para o preparo dos padrões da curva de calibração nas seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 2; 10; 25 e 40 ng/mL (Tabela 11).

Os padrões da curva de calibração foram fracionados em alíquotas de 300 µL, armazenadas em tubos tipo eppendorff devidamente rotulados e estocados a -20°C até a sua utilização. Uma única amostra, para cada uma das concentrações, foi descongelada para cada ensaio, fornecendo volume suficiente para as análises.

Os valores dos pontos da curva de calibração foram escolhidos mediante análise prévia do plasma de um dos voluntários. Obtidas as concentrações plasmáticas a partir da análise do plasma, delineou-se uma faixa de concentrações que abrangesse o menor e o maior valor quantificado do fármaco (nimodipino).

TABELA 11 – Preparo da curva de calibração para o nimodipino.

Nível	Amostra	Concentração no plasma (ng/mL)	Volume pipetado (µL)/Concentração da solução de nimodipino preparada em plasma (ng/mL)	Volume final (mL)	Fator de diluição
B	Branco	0	-	-	-
Z	Zero	0	-	-	-
1	Nimodipino	0,1	200 (10 ng/mL)	20	1:100
2	Nimodipino	0,5	100 (100 ng/mL)	20	1:200
3	Nimodipino	2	400 (100 ng/mL)	20	1:50
4	Nimodipino	10	2000 (100 ng/mL)	20	1:10
5	Nimodipino	25	5000 (100 ng/mL)	20	1:4
6	Nimodipino	40	8000 (100 ng/mL)	20	1:2,5

4.1.1.8 Preparação das amostras dos controles de qualidade

Todas as amostras dos controles de qualidade foram preparadas adicionando-se o analito a ser analisado ao plasma humano. Para o preparo dos controles de qualidade limite de quantificação, controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM) e controle de qualidade alto (CQA), alíquotas de 200 µL (da solução de nimodipino 10 ng/mL, preparada em plasma) e 90, 4500 e 10500 µL (da solução de nimodipino 100 ng/mL, preparada em plasma), respectivamente, foram colocadas em tubos de vidro e os volumes completados com pool de plasma branco (Tabela 12).

As amostras dos controles de qualidade foram fracionadas em alíquotas de 300 µL, armazenadas em tubos tipo eppendorff devidamente rotulados e estocados a -20°C até a sua utilização. Uma única amostra, para cada uma das concentrações, foi descongelada para cada ensaio, fornecendo volume suficiente para as análises.

TABELA 12 – Preparo dos controles de qualidade.

CQ	Analito	Concentração no plasma (ng/mL)	Volume pipetado (μ L)/Concentração da solução de nimodipino preparada em plasma (ng/mL)	Volume Final (mL)	Fator de Diluição
LQ	Nimodipino	0,1	200 (10 ng/mL)	20	1:100
CQB	Nimodipino	0,3	90 (100 ng/mL)	30	1:333,3
CQM	Nimodipino	15	4500 (100 ng/mL)	30	1:6,67
CQA	Nimodipino	35	10500 (100 ng/mL)	30	1:2,86

As concentrações das amostras dos controles de qualidade e os critérios utilizados para a definição de tais concentrações estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 – Definição dos controles de qualidade (CQ).

Tipo do CQ	Identificação CQ	Definição de faixa	Valor definido (ng/mL)
CQ-LQ	LQ	Mesma concentração do LQ	0,1
CQ baixo	CQB	Menor ou igual a 3 x LQ	0,3
CQ médio	CQM	Aproximadamente a média entre CQB e CQA	15
CQ alto	CQA	75-90% da maior concentração da curva de calibração	35

4.1.2 Validação do método

4.1.2.1 Determinação do limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação do método analítico foi definido levando-se em consideração a sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão do método.

Para a determinação do LQ, foram feitas análises da matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e

exatidão aceitáveis. Com isto, tentou-se assegurar que os menores valores possíveis fossem analisados, por meio de repetições de análises, com valores sucessivamente menores, quando os inicialmente escolhidos fossem quantificados com precisão e exatidão aceitáveis.

A determinação do LQ do método proposto seguiu os seguintes critérios:

- a) *A resposta de pico para o LQ deve ser, no mínimo, 5 vezes maior que qualquer interferência na amostra branco no tempo de retenção do fármaco;*
- b) *O pico de resposta do fármaco no LQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão, através da análise de, no mínimo, cinco amostras dos padrões.*

4.1.2.2 *Curva de calibração/linearidade*

Para a determinação da curva de calibração analisaram-se amostras extraídas da matriz biológica em seis concentrações distintas. A curva de calibração incluiu a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão interno e do padrão do fármaco), amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e mais seis amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno contemplando o limite de variação esperado. As amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno foram analisadas em triplicata.

As concentrações dos padrões foram definidas em testes preliminares, incluindo a primeira quantificação de amostras, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas.

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

- a) *Desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal do LQ, em pelo menos duas das triplicatas;*
- b) *Desvio menor ou igual a 15% em relação a concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração, em pelo menos duas das triplicatas;*

- c) *No mínimo 4 de 6 concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios descritos, incluindo o LQ e a maior concentração da curva de calibração;*
- d) *O coeficiente de correlação será aceito se for igual ou maior do que 0,98.*

4.1.2.3 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e a exatidão do método bioanalítico, quatro concentrações distintas, CQB, CQM, CQA e LQ foram analisadas. Cada amostra foi analisada em quintuplicata. A precisão e a exatidão foram determinadas em um mesmo lote (precisão e exatidão intralote) e em lotes diferentes (precisão e exatidão interlotes). As análises foram realizadas em três baterias para cada parâmetro.

4.1.2.3.1 Precisão e exatidão intralote

A precisão e exatidão intralote foram definidas segundo os seguintes critérios:

- a) *Precisão: para os controles CQB, CQM e CQA o coeficiente de variação (CV) não deveria exceder 15%, e para o LQ admitiram-se valores menores ou iguais a 20%;*
- b) *Exatidão: o valor da exatidão para as amostras CQB, CQM e CQA não deve exceder $\pm 15\%$ do valor nominal e para o LQ admitiu-se desvios menores ou iguais a 20%.*

4.1.2.3.2 Precisão e exatidão interlote

A precisão e a exatidão interlote seguiu os mesmos critérios de validação para a precisão e exatidão intralote.

4.1.2.4 Especificidade

Para avaliar a especificidade, foram analisadas amostras de plasma humano branco obtidos de seis indivíduos do Hospital da Universidade São Francisco – Bragança Paulista nas condições descritas na Tabela 14. Cada amostra branco foi testada utilizando os procedimentos de extração e as condições cromatográficas propostas, para avaliar interferência no tempo de retenção do fármaco ou do padrão interno e os resultados foram comparados com aqueles obtidos com uma solução padrão do analito (nimodipino) em concentração próxima ao Limite de quantificação.

TABELA 14 – Amostras do fluido biológico (plasma).

Indivíduo	Descrição	Lote
1	Plasma humano normal	39252/1
2	Plasma humano normal	39081/1
3	Plasma humano normal	39529/1
4	Plasma humano normal	39595/1
5	Plasma humano hiperlipêmico	39359/1
6	Plasma humano hemolisado	12119/5

4.1.2.5 Recuperação

O cálculo da recuperação do fármaco é feito comparando-se as áreas dos picos do nimodipino (controles de qualidade baixo, médio e alto) das amostras extraídas do plasma com as áreas dos picos do nimodipino preparado em solução (solução não extraída). As áreas correlacionadas com a concentração, considerando-se que as áreas obtidas para os controles baixo, médio e alto, preparados em solução (amostras não extraídas) correspondem, respectivamente, as concentrações nominais de 3; 15 e 35 ng/mL.

O cálculo da recuperação do padrão interno é feito de maneira análoga, ou seja, comparando-se as áreas do pico da dibucaína extraída do plasma com as áreas dos picos da dibucaína preparada em solução (amostra não extraída) na concentração de 50 ng/mL.

4.1.2.6 *Estudo de estabilidade do fármaco no fluido biológico*

Os procedimentos de estabilidade avaliaram a estabilidade do analito no plasma humano sob condições distintas de temperatura e acomodação, bem como sua estabilidade em soluções de estoque.

A estabilidade nos fluidos biológicos é dependente das condições de armazenamento, das propriedades químicas da droga, da matriz empregada (plasma humano) e sistema de armazenamento. O resultado do presente teste é relevante somente sob as mesmas condições e não deve ser extrapolado para outras matrizes e sistemas de armazenamento.

Para o teste de estabilidade, uma série de amostras padrão foi preparada da solução estoque (preparada recentemente no mesmo solvente utilizado para a análise). Os respectivos controles de qualidade baixo, médio e alto, incluindo todos os analitos e padrões internos, foram usados. Amostras do plasma humano de cada concentração foram preparadas em volume suficiente para ter alíquotas múltiplas. Três alíquotas de cada concentração foram processadas e quantificadas imediatamente para fornecer valores de referência (frescos) e outras três alíquotas para cada concentração foram processadas para os testes desejados.

4.1.2.6.1 *Estabilidade no tempo e condições de análise (curta duração)*

Para avaliar a estabilidade do fármaco no tempo e condições de análise, as amostras processadas foram mantidas dentro do auto-injetor à temperatura ambiente. Cada amostra de controle de qualidade foi analisada em triplicata nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 10 horas a qual excede o tempo em que as amostras poderiam ser mantidas em temperatura ambiente depois de serem descongeladas e antes de serem analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise de amostras recém-preparadas.

4.1.2.6.2 Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo

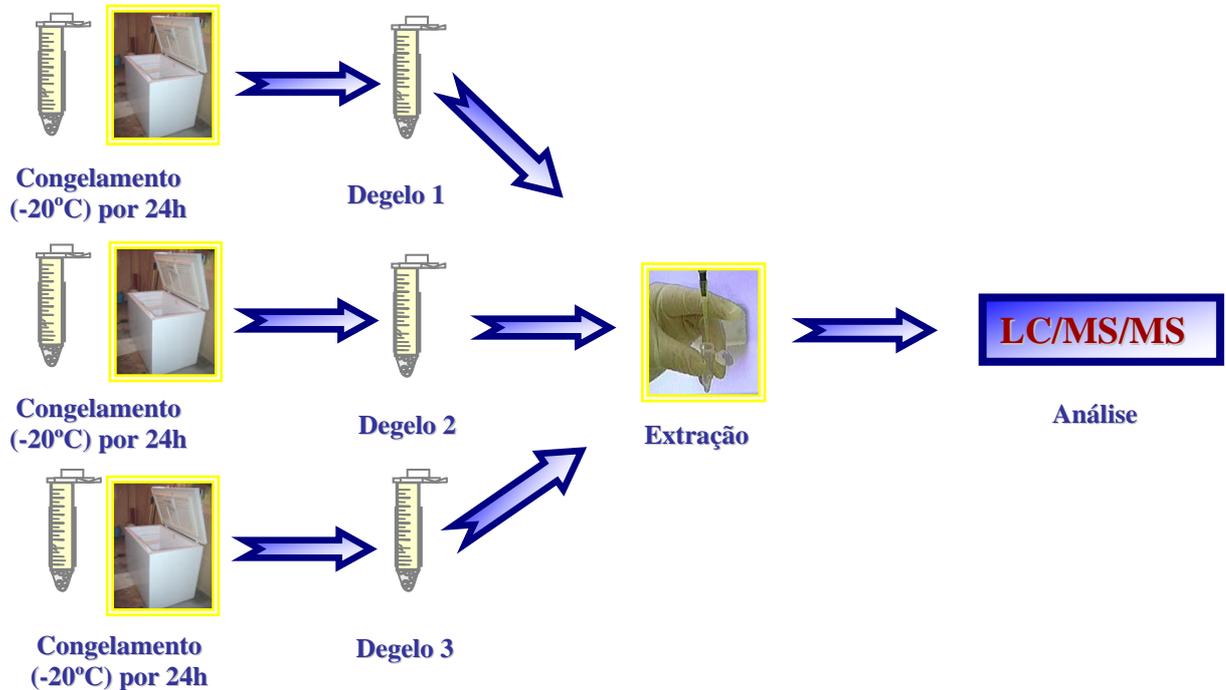


FIGURA 5 – Esquema dos ensaios de estabilidade em ciclos de congelamento de descongelamento

Para avaliar a estabilidade do nimodipino, durante três ciclos de congelamento e descongelamento, foram analisadas cinco amostras de cada controle de qualidade nas seguintes condições: *Degelo 01* - as amostras foram congeladas a -20°C e mantidas nesta temperatura por 24 horas. *Degelo 02* - Após este tempo, as amostras foram submetidas ao descongelamento natural, à temperatura ambiente, extraídas e imediatamente analisadas. Depois de completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -20°C , mantidas nesta temperatura por mais 24 horas, descongeladas, extraídas e analisadas. *Degelo 03* - O mesmo procedimento foi repetido mais uma vez, com o intuito de completar o 3º ciclo de congelamento e descongelamento (Figura 5).

4.1.2.6.3 Estabilidade de longa duração

Para avaliar a estabilidade do fármaco, em plasma, em condições de longa duração, o tempo de armazenamento deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a data da primeira coleta de amostra e a análise da última amostra dos voluntários (Figura 6).

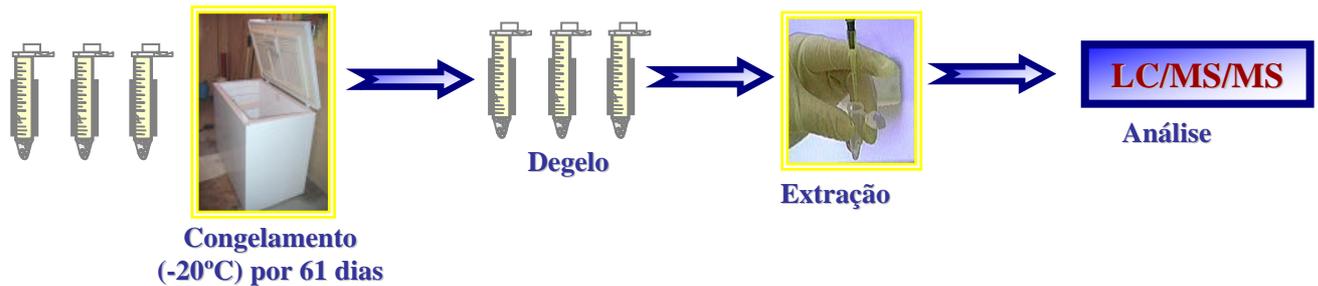


FIGURA 6 – Esquema dos ensaios de estabilidade de longa duração

A estabilidade de longa duração foi realizada no dia 22/10/03, utilizando-se amostras que ficaram armazenadas a -20°C , por um período de 61 dias. Este tempo de armazenamento é superior ao intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última amostra dos voluntários. As amostras de longa duração foram descongeladas a temperatura ambiente sendo em seguida extraídas da matriz biológica e analisadas no sistema cromatográfico.

Para verificação desta estabilidade, utilizaram-se cinco amostras de cada controle de qualidade determinadas durante o processo de validação da metodologia analítica proposta. As concentrações de todas as amostras de estabilidade foram comparadas com as concentrações de amostras recém-preparadas.

4.1.2.6.4 Estabilidade das soluções padrão

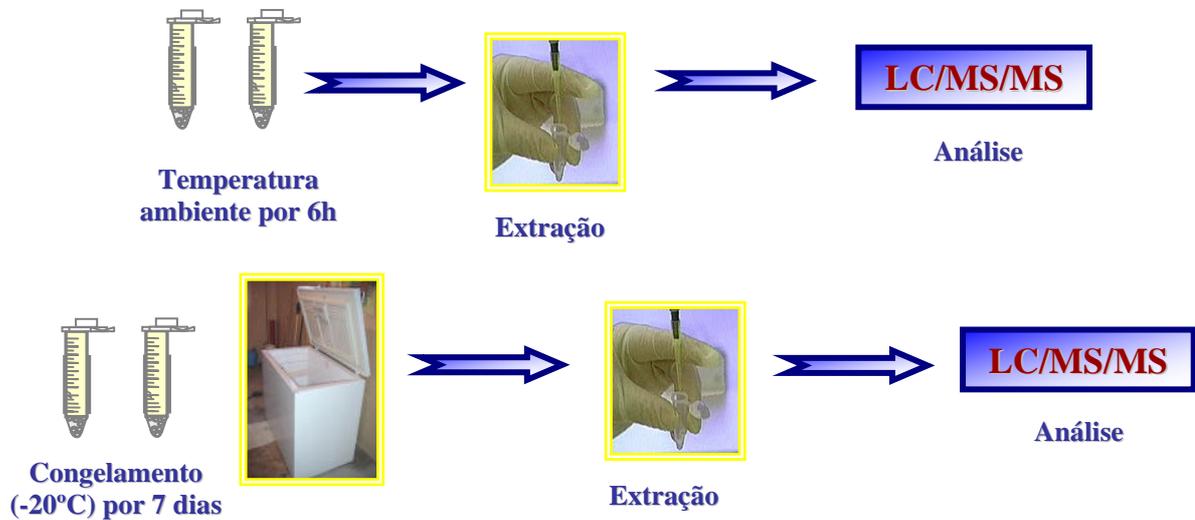


FIGURA 7 – Esquema dos ensaios de estabilidade das soluções padrão

A estabilidade das soluções padrão do fármaco recém preparadas e não processadas a temperatura ambiente foi avaliada a partir de, no mínimo, 6 horas após a preparação. Em seguida, as amostras foram extraídas e analisadas no sistema cromatográfico.

Realizou-se também a análise de amostras após sete dias de congelamento. Depois do descongelamento natural, a temperatura ambiente, as amostras foram extraídas e imediatamente analisadas. Os resultados deste teste devem ser comparados com aqueles obtidos utilizando-se soluções recentemente preparadas do fármaco e do padrão interno (Figura 7).

4.2 Aplicação do método para estudo farmacocinético em 24 voluntários sadios

4.2.1 Delineamento do estudo

A pesquisa consistiu de um estudo aberto, randomizado, com 2 tratamentos, 2 períodos (2 seqüências), nos quais os voluntários (12 homens e 12 mulheres, não grávidas)

receberam, em cada período distinto, a formulação teste ou a formulação referência, seguida por um copo de água de 200mL havendo, por conseguinte, dois braços de tratamento.

As formulações foram administradas em dose única por via oral, seguida de coletas de sangue de pelo menos 3 meias-vidas. Os períodos de tratamento devem obedecer a um intervalo mínimo de 7 meias-vidas entre eles (*wash-out*). Planejou-se um intervalo mínimo de cinco dias entre as internações.

Depois da seleção, foram observados por um período de pelo menos duas semanas sem fazer uso de qualquer medicação. Os voluntários qualificados para participar do estudo foram internados por dois períodos de aproximadamente 36 horas, com pelo menos cinco dias de intervalos entre os internamentos. Em cada internamento, os voluntários receberam, em jejum, a formulação referência ou a formulação teste.

4.2.2 Seleção dos voluntários

A avaliação clínica inicial (pré-estudo) consistiu em uma história clínica a fim de pesquisar sintomas relativos a alergias, manifestações relativas aos olhos, nariz, ouvidos, orofaringe, sistema respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, geniturinário, sistema nervoso central, linfo-hematopoético, endócrino e metabólico, musculoesquelético e dermatológico. Aspectos relativos à estabilidade emocional, antecedente de hipersensibilidade à drogas, antecedentes cirúrgicos, antecedentes patológicos familiares e outros, considerados importantes no momento, também foram investigados.

No exame físico foram registrados: a altura (em centímetros), o peso corporal (em kilogramas), com posterior cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), e a temperatura axilar (em graus Celsius). Exame dos segmentos corporal foi efetuado, avaliando-se o aspecto geral, a pele, cabeça e pescoço, olhos, ouvidos, nariz, boca, orofaringe, tórax e pulmões, coração, abdômen, coluna vertebral, genitália, linfonodos, extremidades.

4.2.3 Sinais vitais

No período de realização do pré-estudo, pós-estudo e durante o estudo clínico a pressão arterial diastólica e sistólica, a frequência de pulso e a temperatura axilar foram aferidas e registradas no Formulário de Relato de Caso (CRF).

4.2.4 Exame cardiológico

Eletrocardiograma convencional com 12 derivações foi realizado juntamente com os outros exames laboratoriais antes e após o final da etapa clínica. Os parâmetros: SÂP (vetor resultante da despolarização atrial), SÂQRS (vetor resultante da despolarização ventricular), SÂT (vetor resultante da repolarização ventricular), ritmo e frequência cardíaca, duração do complexo QRS e dos intervalos P-R e Q-T, foram registrados.

Foram observadas também a presença de distúrbios da condução intraventricular e atrioventricular, sinais de sobrecargas de câmaras atriais e ventriculares. O laudo final era referido como normal, anormal não clinicamente significante ou anormal com significado clínico.

4.2.5 Exames laboratoriais

Os seguintes exames laboratoriais foram realizados nos períodos pré-estudo (período de avaliação para seleção de voluntários saudáveis) e pós-estudo (período após o segundo e último internamento).

a) Análise Hematológica: Hemoglobina, Hematócrito, Contagem total e diferencial de leucócitos, Contagem de plaquetas e Velocidade de Hemossedimentação (VHS).

b) Análise bioquímica: Uréia, Creatinina, Bilirrubina Total, Proteína Total, Albumina, Glicose em jejum, Fosfatase alcalina, Aspartato-amino-transferase (AST), Alanina-amino-transferase (ALT), Colesterol total, Triglicérides, Ácido úrico e Gama GT.

c) Sumário de urina

d) Parasitológico de Fezes

e) Análise sorológica: Hepatite B, Hepatite C, HIV (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS) e teste sorológico para gravidez (Beta-HCG) para voluntários do sexo feminino.

Exames realizados somente no pré-estudo: Parasitológico de Fezes, Análise Sorológica.

4.2.6 Valores de referência dos exames laboratoriais

Os valores utilizados como referência para os exames laboratoriais foram fornecidos pelo laboratório de patologia clínica responsável por estas análises, Laboratório Louis Pasteur .

Os parâmetros de normalidade para o parasitológico de fezes, análise sorológica para hepatite B, C e HIV devem consistir de resultados negativos.

4.2.7 Critérios de inclusão

Os seguintes critérios devem ser satisfeitos para que o voluntário possa participar do estudo:

1. Homem ou Mulher com idade entre 18 a 50 anos. As mulheres não poderiam estar grávidas e nem em regime de amamentação.
2. Voluntário com índice de massa corpórea maior do que 19 e menor do que 28.
3. Boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo médico, de acordo com as regras definidas no protocolo, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico e psicológico, ECG e exames laboratoriais complementares.
4. Capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos e com intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os

requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2.8 Critérios de exclusão

A resposta positiva a qualquer um dos seguintes critérios excluirá o voluntário do estudo:

1. O voluntário tem sabidamente uma hipersensibilidade ao fármaco estudado (nimodipino) ou a compostos quimicamente relacionados; história de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer droga.
2. História ou presença de doenças hepáticas ou gastrointestinais ou outra condição que interfere com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo da droga.
3. Uso de terapia de manutenção com qualquer droga, excetuando-se anticoncepcionais por via oral.
4. Tem história de doença hepática, renal, pulmonar, gastrintestinal, epiléptica, hematológica ou psiquiátrica; tem hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;
5. Achados eletrocardiográficos não recomendados, a critério do investigador, para participação no estudo.
6. Os resultados dos exames laboratoriais complementares estão fora dos valores considerados normais, de acordo com as normas deste protocolo, a menos que sejam considerados não clinicamente significativos pelo investigador.
7. Voluntário é fumante;
8. O voluntário ingere mais do que 5 xícaras de café ou chá por dia;
9. Tem história de abuso de álcool ou drogas;
10. Fez uso de medicação regular dentro das 2 semanas que antecederam o início deste estudo, ou fez uso de qualquer medicação uma semana antes do início deste estudo;
11. Foi internado por qualquer motivo até 8 semanas antes do início do primeiro período de tratamento deste estudo;

12. Tratamento dentro dos 3 meses prévios ao início do tratamento deste estudo com qualquer droga que se conheça ter um potencial tóxico bem definido nos grandes órgãos.
13. O voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentro dos três meses que antecedem o início do tratamento deste estudo;
14. O voluntário doou ou perdeu 450 mL ou mais de sangue dentre dos três meses que antecederam o estudo ou que doou mais de 1500 mL dentro dos 12 meses anteriores ao início do tratamento deste estudo.
15. Teste positivo de gravidez para as voluntárias mulheres.
16. O voluntário tem qualquer condição que o impede de participar do estudo pelo julgamento do investigador

4.2.9 Critérios para retirada do estudo

Solicitação, por parte do voluntário, para se retirar do estudo a qualquer momento

1. Voluntário não deseja continuar no estudo por razões pessoais (ou mesmo sem relatar a razão);
2. Voluntário não deseja continuar no estudo devido os eventos adversos da droga de estudo (efeitos não desejáveis possivelmente relacionados ao fármaco em estudo)
3. Voluntário não deseja continuar por razões outras que não efeitos adversos por exemplo indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo.
4. Não aderência às exigências do protocolo.
5. Eventos adversos ou sintomas ou sinais de possível toxicidade
6. Doença intercorrente requerendo medicação.
7. Resposta positiva à reavaliação de qualquer um dos critérios de exclusão, no momento da admissão ao primeiro período de tratamento ou em ocasião subsequente.
8. Qualquer outra condição que, a juízo do investigador, seja do interesse para manutenção da saúde do voluntário.

4.2.10 *Entrada do voluntário no estudo*

Os voluntários foram aceitos no estudo somente quando considerados saudáveis como determinado pela história médica, exame físico e exames laboratoriais que antecederam o início do estudo.

Uma vez avaliada a higidez, os voluntários foram submetidos a uma entrevista para avaliação das condições emocionais para participar da investigação. Após todas as dúvidas terem sido esclarecidas aos voluntários, e os mesmos tendo concordado com o protocolo clínico, foi assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II) para participação no estudo.

4.2.11 *Internamento*

Os voluntários foram orientados para se apresentarem para internamento, na Unidade de Farmacologia Clínica – UNIFAC – da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, aproximadamente às 21:00 horas da noite anterior à administração do medicamento, e que permanecesse até 36 horas após a administração da medicação.

4.2.12 *Restrições*

Todos os voluntários chegaram à Unidade de Farmacologia Clínica tendo feito uma refeição normal (jantar). A partir das 21:00 horas, da noite do dia do internamento, os voluntários ficaram em jejum até a manhã seguinte e durante o período de 3 horas após a administração da medicação quando um desjejum foi servido. O almoço foi servido entre 5 e 6 horas após a administração e o jantar após 12 horas. Não foram permitidos outros alimentos no período de internação. Nos dois períodos os voluntários tiveram as refeições padronizadas, e líquidos *ad libitum* após as refeições, mas bebidas contendo xantinas (incluindo chá, café e cola) foram evitados.

Não foi permitido fumar durante o período do internamento. Medicamentos concomitantes foram evitados quando possível, mas em caso de necessidade, foram

registradas em formulário apropriado. O consumo de álcool foi limitado durante o período de estudo e evitado completamente durante as 48 horas que antecederam cada coleta de sangue.

TABELA 15 - Produtos estudados.

	Formulação A Teste	Formulação B Referência
Nome	Nimodipino	Nimotop®
Ingrediente ativo	Nimodipino	Nimodipino
Forma	Comprimidos	Comprimidos
Concentração	30 mg	30 mg
Lote	Nimo 30LG02	3026G
Validade	Março/2002	Fevereiro/2004
Data de Fabricação	Março/2002	Fevereiro/2001
Fabricante	EMS Indústria Farmacêutica Ltda	Bayer S.A

4.2.13 Esquema experimental

Os voluntários receberam, em cada um dos períodos de internamento, os seguintes produtos de acordo com a tabela de randomização (Anexo III):

Formulação teste – Nimodipino comprimido de 30 mg.

Formulação referência – Nimotop® comprimido de 30 mg.

4.2.14 Coletas de sangue

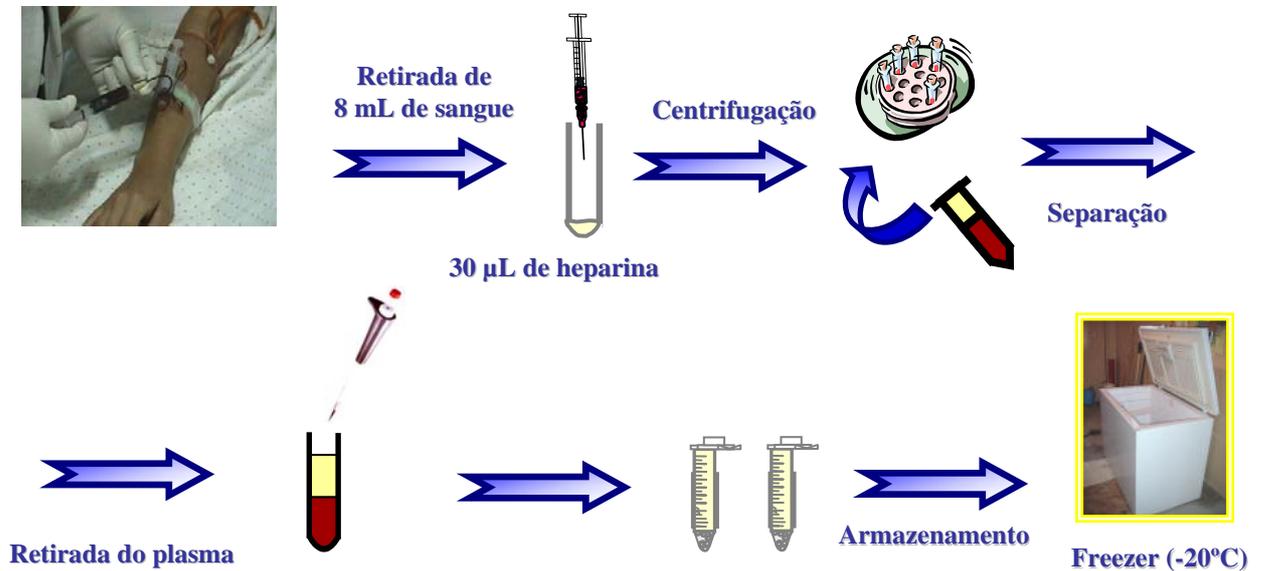


FIGURA 8 – Esquema do procedimento de coleta de sangue e separação de amostras plasmáticas

As coletas de sangue para determinação das concentrações plasmáticas de nimodipino foram obtidas, através de "butterfly" (escalpe) ou cateter venoso heparinizado, introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário, imediatamente antes da administração de uma das preparações de nimodipino e nos seguintes intervalos a partir da administração: 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 1, 1:15, 1:30, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 36, e 48 horas.

A cada intervalo, foram coletados 9mL de sangue e colocados em tubos *vacuteiner* de vidro contendo 30µL de heparina. Em seguida, foram centrifugadas a 1900 g durante 15 minutos, o plasma foi separado e colocado em dois tubos de plástico devidamente identificados. Em seguida, os tubos foram devidamente armazenados em freezer, numa temperatura de -20°C , até sua análise (Figura 8).

Quarenta e oito horas após a última coleta de sangue, os voluntários foram reavaliados clínica e laboratorialmente (período de pós-estudo).

4.2.15 Avaliação da segurança

Foi solicitado aos voluntários que relatassem qualquer evento adverso e a sua data de ocorrência, para que fosse acompanhado clínica e laboratorialmente até que os parâmetros alterados voltassem ao normal. Foi também solicitada informação se houve ou não a necessidade de medicação adicional. As perguntas realizadas para saber se os voluntários tiveram algum evento adverso foram limitadas a perguntas gerais, tais como: *Como vai você?*

4.2.15.1 Definições de efeitos adversos quanto à intensidade

Leve - Experiência adversa facilmente tolerada

Moderada - Experiência adversa desagradável o bastante para interferir na atividade cotidiana.

Severa - Experiência adversa que impossibilita a realização da atividade cotidiana normal.

4.2.15.2 Relacionamento suposto com a droga experimental

Sem relação - A experiência adversa definitivamente não está relacionada à droga em estudo.

Desconhecida - Há outras causas mais prováveis e não há suspeitas de que a droga seja a causa.

Possível - Não foi demonstrado um relacionamento de causa e efeito direto entre a droga e a experiência adversa, porém, há uma possibilidade razoável de que a droga esteja envolvida.

Provável - Há um relacionamento direto de causa e efeito entre a experiência e a droga em estudo.

4.2.16 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o termo de consentimento, foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará, credenciado pelo CONEP - Conselho Nacional de Saúde/MS.

O Estudo será conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste (1996) e Edimburgo (2000), assim como as regulamentações locais (Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS-MS, bem como Resolução 135/03 da ANVISA).

4.2.16.1 Termo de consentimento livre e esclarecido

Segundo a Declaração do Congresso Nacional de Bioética (SIBI), realizado em junho de 2000, o art. 11º, dedicado aos temas da pesquisa e experimentação, relata que “os sujeitos das experimentações deverão dar seu consentimento livre e esclarecido e plenamente informado”.

Os voluntários selecionados para esse estudo receberam explanação sobre a natureza e os objetivos do estudo. Foi enfatizado que o trabalho teria a finalidade de pesquisa e que o voluntário não poderia esperar qualquer efeito terapêutico. O voluntário também tinha conhecimento da sua liberdade para se retirar a qualquer momento do estudo sem que isto lhe cause qualquer prejuízo no seu atendimento junto à Unidade de Farmacologia Clínica ou ao Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará. Foi solicitado a cada voluntário que, caso concordasse com o protocolo de estudo, assinasse o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a participação do estudo.

4.2.16.2 Confidencialidade

Os resultados da avaliação médica, o eletrocardiograma e os exames laboratoriais foram registrados em folha individual de cada voluntário. Todas as informações obtidas durante o estudo, referente ao estado de saúde dos voluntários ficaram disponíveis aos

médicos do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará. Uma cópia dos exames laboratoriais realizados no período pré e pós-estudo foi fornecida aos voluntários, quando solicitada.

4.2.17 *Análise do perfil farmacocinético do nimodipino*

Parâmetros farmacocinéticos (Tabela 16) tais como área sob a curva do tempo zero ao infinito ($AUC_{0-\infty}$), do tempo zero a 48 horas (ASC_{0-48}), concentração máxima atingida (C_{max}), tempo para atingir a concentração máxima (T_{max}), meia-vida plasmática ($t_{1/2}$) foram calculados.

TABELA 16 - Parâmetros farmacocinéticos

$AUC_{[0-48h]}$	Área sob a curva de concentração do fármaco <i>versus</i> tempo; do tempo 0 (zero) ao tempo 48h, calculada pelo método trapezoidal.
$AUC_{[0-inf]}$	Área sob a curva de concentração do fármaco <i>versus</i> tempo; do tempo 0 (zero) ao tempo infinito, calculada pelo método trapezoidal; onde $ASC[0-inf] = ASC[0-48h] + Ct48/\lambda_z$.
C_{max}	Pico de concentração máxima do fármaco, obtido diretamente dos dados.
T_{max}	Tempo para atingir o C_{max} .
$t_{1/2}$	Meia-vida de eliminação.

4.2.18 *Análise estatística*

4.2.18.1 *Material*

Os programas utilizados para esse tipo de análise foram o WinNonlin Professional Network Edition, versão 3.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA), Programa de Bioequivalência para Estudos Cruzados em dois Períodos versão 2.0 (autor: Herman P Wijnand, Bs Oss, The Netherlands), Microsoft Excel version 97 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) e GraphPad Prism version 2.00 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

4.2.18.2 Métodos

A meia-vida foi calculada através da fórmula ($t_{1/2} = \ln 2/K$). A concentração plasmática máxima observada (C_{\max}) e o tempo para obter esta concentração (T_{\max}) foram obtidos diretamente da curva. A área sob a curva de concentração plasmática de nimodipino *versus* tempo de 0 a 48 horas (ASC_{0-48}) foi calculada através do método trapezoidal. A extrapolação dessa área para o infinito ($ASC_{0-\infty}$) foi feita adicionando o valor da relação C_{48}/K (onde C_{48} é a concentração plasmática obtida da coleta de 48 horas e K , que é a constante de eliminação) a ASC_{0-48h} .

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica

Os dados apresentados nesta seção mostram os resultados obtidos com os procedimentos laboratoriais utilizados para demonstrar que o método analítico descrito é adequado e confiável para as análises propostas.

O método analítico proposto foi desenvolvido e validado segundo os seguintes critérios:

- a) *Validação pré-estudo, incluindo os parâmetros: especificidade, linearidade, precisão e exatidão.*
- b) *Definição dos parâmetros do estudo: limite de quantificação, concentração dos padrões de calibração e das amostras de controle de qualidade.*
- c) *Determinação da estabilidade das amostras*

5.1.1 Método bioanalítico

Determinação de nimodipino em plasma humano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no modo MS/MS utilizando dibucaína como padrão interno.

5.1.2 Princípio do método

Nimodipino e o padrão interno dibucaína foram extraídos do plasma humano por meio de extração líquido-líquido utilizando hexano/acetato de etila (1:1 v/v). Após a extração, as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio a 37°C, ressuspendidas em acetonitrila e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção por Espectrometria de massas.

5.1.3 Determinação do Limite de quantificação (LQ)

Os resultados das corridas analíticas, realizadas com três lotes de plasma contaminados com nimodipino 0,1 ng/mL, permaneceram dentro dos critérios exigidos para determinação da menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. Deste modo, a resposta do pico para o LQ foi 5 vezes maior que qualquer interferência na amostra branco no tempo de retenção do fármaco, sendo esta resposta identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão. Cada lote de plasma foi analisado em quintuplicata.

Como pode ser observado na Tabela 19, a precisão e a exatidão intralote variaram de 0 a 5,71% e 96 a 110% respectivamente. Quanto aos resultados da Tabela 22, podemos observar que a precisão interlote foi de 7% e exatidão interlote de 103%. Dentro destas condições de análise, o valor encontrado para o LQ foi de 0,1 ng/mL.

5.1.4 Curva de calibração/linearidade

Para definir a relação entre a resposta do instrumento (área do analito/área do padrão interno) e a concentração conhecida do analito, foi gerada uma curva de calibração com seis padrões contendo o fármaco e padrão interno.

O método atendeu as especificações descritas tendo sido linear nas concentrações testadas de 0,1, 0,5, 2, 10 , 25 até 40 ng/mL, e permitiu linearidade até 40 ng/mL com um coeficiente de correlação (r^2) maior que 0,98 ($r=0,993824$) como mostrado na Figura 9.

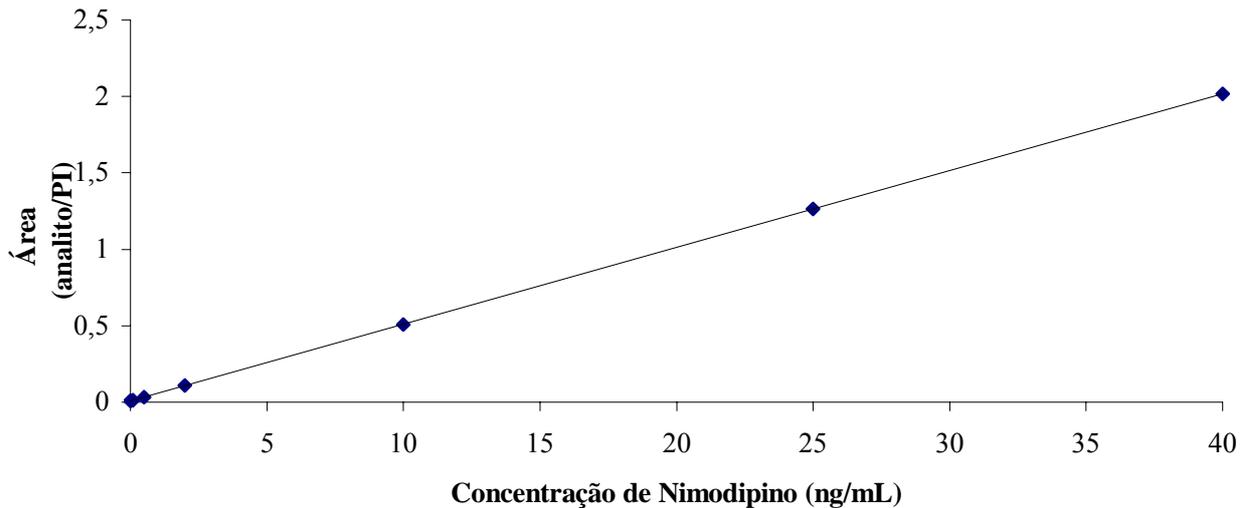


FIGURA 9 - Linearidade da curva de calibração realizada com seis diferentes concentrações de nimodipino ($r^2 = 0,993824$).

A linearidade da metodologia foi validada uma vez que as análises, em triplicata, dos seis padrões de calibração apresentaram desvio menor que 20% em relação à concentração nominal do limite de quantificação (0,1 ng/mL), desvio menor que 15% em relação a concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração (0,5, 2, 10, 25 e 40 ng/mL) e coeficiente de correlação maior que 0,993 (Tabelas 17a, 17b).

TABELA 17a – Dados da curva de calibração linear do nimodipino

Padrão	Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Experimental (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Nimodipino	0,10	0,10	10,00	100,00
	0,10	0,09		
	0,10	0,11		
Nimodipino	0,50	0,49	2,00	100,00
	0,50	0,51		
	0,50	0,50		
Nimodipino	2,0	1,92	2,18	95,33
	2,0	1,94		
	2,0	1,86		

TABELA 17b – Dados da curva de calibração linear do nimodipino (continuação)

Padrão	Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Experimental (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Nimodipino	10,0	9,23	0,76	92,97
	10,0	9,29		
	10,0	9,37		
Nimodipino	25,0	24,95	4,46	105,20
	25,0	26,88		
	25,0	27,07		
Nimodipino	40,0	42,57	0,24	106,21
	40,0	42,51		
	40,0	42,37		

Equação da curva de calibração: $y = 0,0502682 x + 0,00630674$ ($r = 0,993824$)

A Tabela 18 mostra os resultados dos cálculos dos desvios nominais para as curvas de calibração das corridas analíticas realizadas para a quantificação do nimodipino no plasma dos vinte e quatro voluntários participantes do estudo.

O desvio nominal para cada concentração dos padrões de calibração permaneceu dentro dos requisitos de validação exigidos tanto para o limite de quantificação (0,1ng/mL) quanto para os outros padrões de calibração (0,5-40 ng/mL) como pode ser visto nas Tabelas 18a, 18b, 18c e 18d.

TABELA 18a – Desvios nominais dos padrões das curvas de calibração

Corrida analítica voluntários	Valor nominal (ng/mL)	Valor encontrado (ng/mL)	Desvio nominal (%)
01 e 02 (análise)	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,52	4,00
	2,0	1,90	-5,00
	10,0	9,27	-7,30
	25,0	25,86	3,44
	40,0	42,36	5,90

TABELA 17b – Desvios nominais dos padrões das curvas de calibração (continuação)

Corrida analítica voluntários	Valor nominal (ng/mL)	Valor encontrado (ng/mL)	Desvio nominal (%)
02 (repetição)	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,49	-2,00
	2,0	1,99	-0,50
	10,0	9,77	-2,30
	25,0	25,77	3,08
	40,0	40,88	2,20
03 e 04	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,52	4,00
	2,0	1,99	-0,50
	10,0	9,40	-6,00
	25,0	25,40	1,60
	40,0	40,63	1,58
05 e 06	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,50	0,00
	2,0	1,91	-4,50
	10,0	9,35	6,50
	25,0	26,14	4,56
	40,0	42,47	6,18
07 e 08	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,51	2,00
	2,0	2,00	0,00
	10,0	9,37	-6,30
	25,0	25,91	3,64
	40,0	40,71	1,78
09 e 10	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,51	2,00
	2,0	2,03	1,50
	10,0	9,71	-2,90
	25,0	25,29	1,16
	40,0	40,19	0,47

TABELA 17c – Desvios nominais dos padrões das curvas de calibração (continuação)

Corrida analítica voluntários	Valor nominal (ng/mL)	Valor encontrado (ng/mL)	Desvio nominal (%)
11 e 12	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,52	4,00
	2,0	1,94	-3,00
	10,0	9,44	-5,60
	25,0	25,34	1,36
	40,0	41,66	4,15
13 e 14	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,51	2,00
	2,0	2,03	1,50
	10,0	9,63	-3,70
	25,0	24,95	-0,20
	40,0	40,31	0,78
15 e 16	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,50	0,00
	2,0	20,1	0,50
	10,0	9,64	-3,60
	25,0	25,11	0,44
	40,0	41,01	2,53
17 e 18	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,51	2,00
	2,0	1,87	-6,50
	10,0	11,05	10,50
	25,0	23,74	-5,04
	40,0	39,62	-0,95
19 e 20	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,49	-2,00
	2,0	2,01	0,50
	10,0	9,68	-3,20
	25,0	25,52	2,08
	40,0	40,90	2,25

TABELA 17d – Desvios nominais dos padrões das curvas de calibração (continuação)

Corrida analítica voluntários	Valor nominal (ng/mL)	Valor encontrado (ng/mL)	Desvio nominal (%)
21 e 22	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,48	-4,00
	2,0	1,96	-2,00
	10,0	9,76	-2,40
	25,0	25,75	3,00
	40,0	41,88	4,70
23 e 24	0,10	0,10	0,00
	0,50	0,48	-4,00
	2,0	1,98	-1,00
	10,0	9,86	-1,40
	25,0	25,46	1,84
	40,0	41,82	4,55

5.1.5 Precisão e exatidão

5.1.5.1 Precisão e exatidão intralote

Para obter a precisão e a exatidão, foram utilizadas 4 concentrações distintas dentro da faixa das concentrações esperadas, incluindo o limite de quantificação e as concentrações do controle de qualidade. Por definição, o coeficiente de variação (CV), para a precisão, não pode exceder 15% para cada concentração analisada (tolerância até 20% da concentração do limite de quantificação). Em se tratando da exatidão, deve estar dentro de 15% do valor atual em relação à média das amostras de cada concentração (tolerância até 20% da concentração do limite de quantificação).

As análises da precisão e exatidão intralote do limite de quantificação são apresentadas na Tabela 19. Como podemos observar, a precisão dos três lotes analisados variou de 0 a 5,71% e a exatidão de 96 a 110%. Estes resultados demonstram que estes valores permaneceram dentro da variação permitida.

TABELA 19 - Análise Intralote do controle de qualidade LQ

Replicatas	LQ (Lote 1)	LQ (Lote 2)	LQ (Lote 3)
1	0,11	0,09	0,10
2	0,11	0,10	0,11
3	0,11	0,10	0,11
4	0,11	0,10	0,10
5	0,11	0,09	0,10
Média	0,11	0,096	0,104
DP	0,00	0,01	0,01
CV (%)	0,00	5,71	5,27
Exatidão (%)	110,00	96,00	104,00

Concentração nominal: LQ= 0,10 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação

As precisões e as exatidões intralote para os três controles de qualidade baixo médio e alto foram 8,57%, 0,81%, 1,37% e 100,67%,109,09%, 109,72%, respectivamente. Os resultados foram calculados a partir da média das concentrações experimentais obtidas com a análise de 5 amostras de cada controle de qualidade como apresentado na Tabela 20.

TABELA 20 - Análise Intralote dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA

Replicatas	CQB	CQM	CQA
1	0,27	16,13	38,41
2	0,30	16,43	37,70
3	0,31	16,39	38,91
4	0,29	16,41	38,08
5	0,34	16,46	38,91
Média	0,30	16,36	38,40
DP	0,03	0,13	0,53
CV (%)	8,57	0,81	1,37
Exatidão (%)	100,67	109,09	109,72

Concentração nominal: CQB= 0,30 ng/mL, CQM= 15,0 ng/mL e CQA= 35,0 ng/mL

Na Tabela 21 estão apresentados os resultados dos ensaios realizados para a precisão e exatidão intralote do método analítico utilizando-se plasmas lipêmico e hemolisado. Para o plasma lipêmico contaminado com as concentrações dos três controles de qualidade baixo, médio e alto observamos os seguintes valores de precisão (CV%) respectivamente: 2,6%, 3,87% e 0,67%. Para a exatidão os resultados foram de 107,33%,

101,4%, 109,63% respectivamente. As corridas analíticas realizadas com plasma hemolisado resultaram nos seguintes valores de precisão para CQB, CQM e CQA, respectivamente: 3,5%, 1,34% e 1,39%. Os resultados da exatidão foram: 108,67%, 92,25% e 93,77%. Foi verificado um alto grau de precisão e exatidão intra-lote para as referidas concentrações

TABELA 21 - Análise intralote dos controles de qualidade do nimodipino em plasmas lipêmico e hemolisado

Réplicas	Plasma Lipêmico			Plasma Hemolisado		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
1	0,33	14,62	38,43	0,34	13,64	32,51
2	0,31	15,85	38,24	0,31	14,14	32,25
3	0,32	14,68	38,11	0,32	13,76	33,43
4	0,33	15,11	38,78	0,33	13,81	32,93
5	0,32	15,79	38,30	0,33	13,84	32,97
Média	0,32	15,21	38,37	0,33	13,84	32,82
DP	0,01	0,59	0,26	0,01	0,19	0,45
CV(%)	2,60	3,87	0,67	3,50	1,34	1,39
Exatidão (%)	107,33	101,40	109,63	108,67	92,25	93,77

Concentração nominal: CQB= 0,30 ng/mL, CQM= 15,0 ng/mL e CQA= 35,0 ng/mL

5.1.5.2 Precisão e exatidão interlote

As análises da precisão e exatidão interlotes são apresentadas nas Tabelas 22 e 23. Foi incluída no cálculo, a análise do limite de quantificação que apresentou 7% e 103%, respectivamente. Os controles de qualidade baixo-médio-alto tiveram para esses parâmetros, os seguintes resultados: 5,46%, 4,12% e 3,37%, e 102,89%, 106,60% e 109,69%, respectivamente.

TABELA 22 - Análise interlote do controle de qualidade LQ

	LQ (ng/mL)
Média	0,103
DP	0,01
CV (%)	7,00
Exatidão (%)	103,00

Concentração nominal: LQ= 0,10 ng/mL,

TABELA 23 - Análise interlote dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA

Réplicas	CQB (lote 1)	CQB (lote 2)	CQB (lote 3)	CQM (lote 1)	CQM (lote 2)	CQM (lote 3)	CQA (lote 1)	CQA (lote 2)	CQA (lote 3)
1	0,27	0,30	0,29	16,13	15,35	16,39	38,41	37,53	39,76
2	0,30	0,31	0,32	16,43	15,48	17,06	37,70	36,97	39,68
3	0,31	0,31	0,31	16,39	15,32	16,42	38,91	37,95	40,06
4	0,29	0,32	0,32	16,41	15,04	16,08	38,08	36,76	39,73
5	0,34	0,32	0,32	16,46	14,67	16,23	38,91	35,76	39,68
Média	0,30	0,31	0,31	16,36	15,17	16,44	38,40	36,99	39,78
DP	0,03	0,01	0,01	0,13	0,32	0,37	0,53	0,83	0,16
CV (%)	8,57	2,68	4,18	0,81	2,13	2,28	1,37	2,25	0,40
Exatidão (%)	100,67	104,0	104,0	109,09	101,15	109,57	109,72	105,70	113,66
				CQB	CQM	CQA			
Média				0,31	15,99	38,39			
DP				0,02	0,66	1,29			
CV (%)				5,46	4,12	3,37			
Exatidão (%)				102,89	106,60	109,69			

Concentração nominal: CQB= 0,30 ng/mL, CQM= 15,0 ng/mL e CQA= 35,0 ng/mL

5.1.6 Especificidade

O método proposto mostrou-se específico, pois a análise das amostras dos seis lotes de plasma humano (quatro de plasma normal, um lipêmico e um hemolisado) mostrou que não foi encontrada interferência significativa no tempo de retenção do fármaco ou do padrão interno quando se compararam os cromatogramas obtidos do plasma humano branco,

lipêmico e hemolisado Figura 10. O eixo da ordenada representa a resposta do aparelho (%) e a abcissa representa o tempo de retenção da substância analisada.

Podemos observar, de acordo com os cromatogramas E e F, a presença de um pico após análise do plasma lipêmico e hemolisado respectivamente. A presença deste pico não é relevante uma vez que os resultados das determinações plasmáticas não apresentaram alterações nos tempos de retenção do fármaco estudado e do padrão interno (Figura 11).

A Figura 11 também fornece além do tempo de retenção do analito e do padrão interno, a relação massa/carga (m/z) dos íons individuais gerados pelas condições especificadas tanto do analito (nimodipino) quanto do padrão interno (dibucaína). Assim, o analito apresentou tempo de retenção de 2,3 min e m/z 418,6 > 342,6 e o padrão interno apresentou tempo de retenção de 2,6 min e m/z 344,2 > 271,0. Os tempos de retenção permaneceram inalterados durante todo o procedimento de validação e quantificação do fármaco.

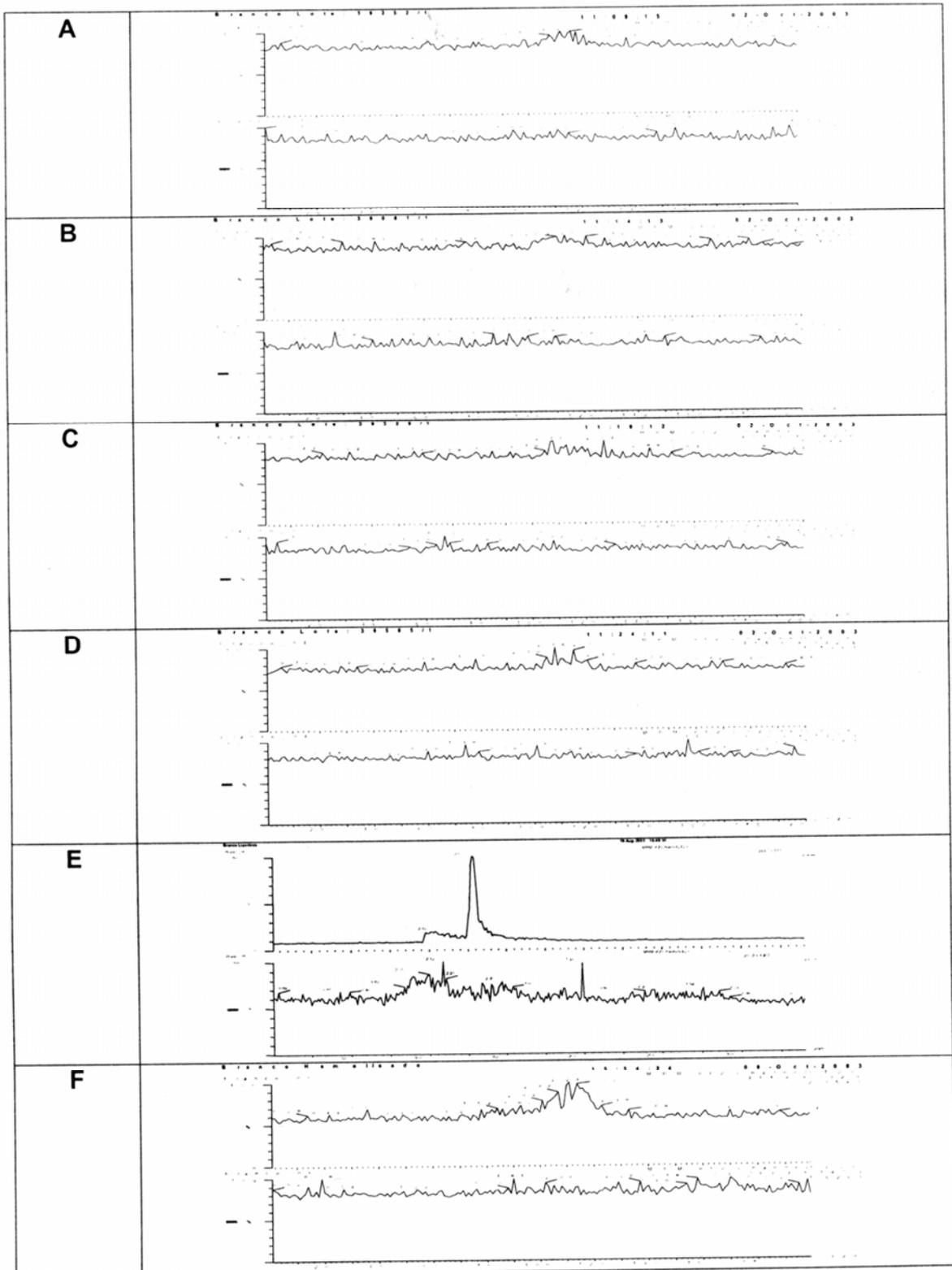


FIGURA 10 - Cromatogramas do plasma humano: A) Plasma branco normal, lote 39252/1, B) Plasma branco normal, lote 39081/1, C) Plasma branco normal, lote 39529/1, D) Plasma branco normal, lote 39595/1, E) Plasma branco Lipêmico, lote 39359/1, F) Plasma branco hemolisado, lote 12119/5.

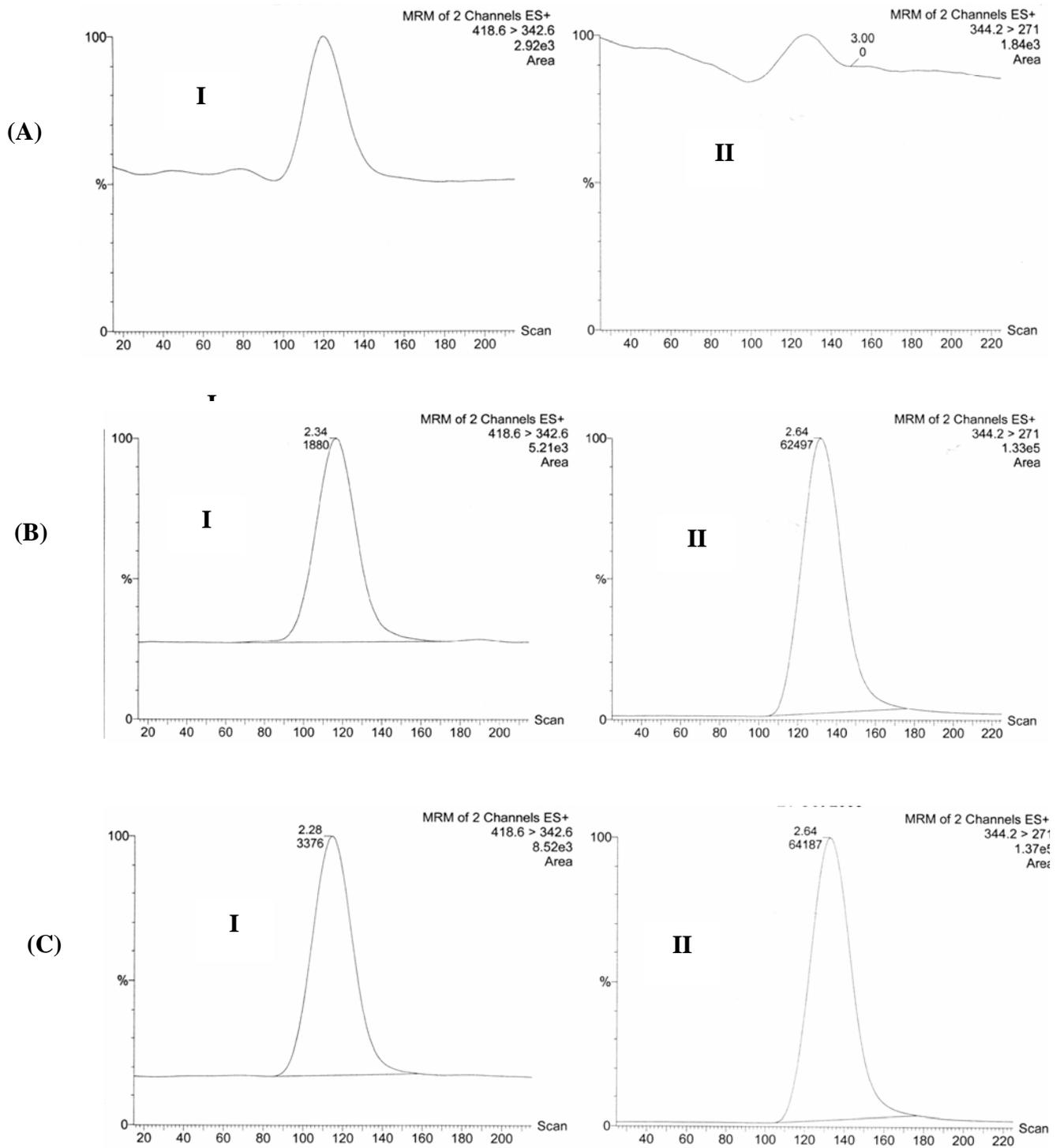


FIGURA 11 - Cromatogramas (MRM) de nimodipino determinado por LC-MS-MS: (A) Amostra de plasma humano branco; (B) Plasma branco contaminado com nimodipino e dibucaína (IS); (C) Plasma humano coletado 0.25 h após administração oral de nimodipino (30 mg) em voluntários saudáveis. Pico I, nimodipino; pico II, dibucaína.

5.1.7 Recuperação

Tendo em vista os critérios de validação para a eficiência do procedimento de extração utilizado no método analítico, a Tabela 24 apresenta os resultados das análises de recuperação do fármaco e do padrão interno.

Como pode ser observado na tabela, o analito apresentou as seguintes percentagens de recuperação referentes as análises do CQB, CQM e CQA, respectivamente: 71,5%, 70,51% e 74,02%. O padrão interno utilizado na metodologia proposta apresentou 84,06% de recuperação.

TABELA 24 - Percentagem de recuperação do fármaco e do padrão interno

Réplicas	Nimodipino			Dibucaína
	CQB	CQM	CQA	50 ng/mL
1	0,21	10,67	24,01	39,37
2	0,22	10,57	26,01	41,04
3	0,21	10,56	26,63	42,47
4	0,21	10,31	26,26	42,46
5	0,22	10,77	26,64	44,81
Média	0,21	10,58	25,91	42,03
DP	0,01	0,17	1,09	2,01
CV (%)	3,09	1,64	4,23	4,78
Recuperação (%)	70,0	70,51	74,02	84,06

Concentração nominal: CQB= 0,30 ng/mL, CQM= 15,0 ng/mL e CQA= 35,0 ng/mL

5.1.8 Estabilidade no tempo e condições de análise (curta duração)

Os resultados das análises com os controles de qualidade para verificação da estabilidade de curta duração estão apresentados na Tabela 25. Como pode ser observado, as variações em relação às concentrações nominais encontram-se dentro da faixa permitida de 15% até o tempo de 10 horas.

TABELA 25 - Estabilidade do nimodipino em plasma no auto-injetor (20°C)

T (h)	CQB (1)	CQB (2)	CQB (3)	CQM (1)	CQM (2)	CQM (3)	CQA (1)	CQA (2)	CQA (3)
0	0,33	0,33	0,33	16,80	16,94	16,81	39,05	39,36	39,04
1	0,32	0,33	0,31	16,58	16,76	16,64	39,72	39,44	39,90
2	0,33	0,34	0,34	17,00	16,89	17,10	38,51	38,89	39,19
3	0,34	0,34	0,33	17,03	17,22	17,12	39,56	39,72	38,88
4	0,34	0,34	0,32	16,63	16,38	16,68	39,14	38,74	38,95
5	0,32	0,34	0,34	17,07	17,07	17,02	39,89	38,31	38,32
10	0,34	0,31	0,31	16,26	16,61	16,40	37,91	37,26	37,30
Média	0,33	0,33	0,33	16,77	16,84	16,82	39,11	38,82	38,80
DP	0,01	0,01	0,01	0,30	0,28	0,27	0,71	0,84	0,81
CV (%)	2,71	3,34	3,91	1,77	1,68	1,60	1,80	2,15	2,09
Exatidão (%)	110,48	110,95	108,57	111,78	112,26	112,16	111,75	110,91	110,85

Concentração nominal: CQB= 0,30 ng/mL, CQM= 15,0 ng/mL e CQA= 35,0 ng/mL

A Tabela 26 apresenta as variações obtidas quando são comparados os valores médios de CQB, CQM e CQA obtidos no tempo 0 h com os valores médios de CQB, CQM e CQA obtidos no tempo 10 h. Os resultados obtidos estão abaixo do desvio permitido de 15% para os três controles analisados mostrando, assim, que as amostras permaneceram estáveis dentro do auto-injetor durante o período de 10 horas.

TABELA 26 - Média e desvios obtidos no estudo de estabilidade do nimodipino em plasma submetido à análise no auto-injetor (20°C)

T (0 h)	CQB	CQM	CQA	T (10 h)	CQB	CQM	CQA
Média	0,33	16,85	39,15	Média	0,32	16,42	37,49
DP	0,00	0,08	0,18	DP	0,02	0,18	0,36
CV (%)	0,00	0,46	0,46	CV (%)	5,41	1,07	0,97
					CQB	CQM	CQA
Variação entre o tempo de 0 a 10 h (%)					3,03	2,53	4,24

Concentração nominal: CQB= 0,30 ng/mL, CQM= 15,0 ng/mL e CQA= 35,0 ng/mL

5.1.9 Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo

As Tabelas 27, 28 e 29 apresentam os resultados das análises feitas com as amostras do controles de qualidade contendo nimodipino submetidos aos três ciclos de congelamento e descongelamento. A finalidade destes testes foi verificar a ocorrência de degradação de fração significativa do fármaco durante os ciclos.

TABELA 27 - Estudo de estabilidade do nimodipino em plasma submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para o controle de qualidade baixo

Réplicas	Amostras recém-preparadas	CQB		
	CQB	Degelo 1	Degelo 2	Degelo 3
1	0,33	0,33	0,32	0,30
2	0,32	0,33	0,32	0,32
3	0,33	0,32	0,34	0,29
4	0,33	0,32	0,33	0,32
5	0,31	0,32	0,32	0,33
Média	0,32	0,32	0,33	0,31
DP	0,01	0,01	0,01	0,02
CV (%)	2,76	1,69	2,74	5,27
Exatidão (%)	108,00	108,00	108,67	104,00

Concentração nominal: CQB= 0,30 ng/mL

TABELA 28 - Estudo de estabilidade de nimodipino em plasma submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para o controle de qualidade médio.

Réplicas	Amostras recém-preparadas	CQM		
	CQM	Degelo 1	Degelo 2	Degelo 3
1	16,81	16,86	16,22	16,31
2	16,52	16,76	16,66	16,41
3	16,32	16,89	16,73	16,10
4	16,82	16,52	16,38	16,08
5	16,55	16,79	16,28	16,39
Média	16,60	16,76	16,45	16,26
DP	0,21	0,15	0,23	0,16
CV (%)	1,28	0,87	1,39	0,97
Exatidão (%)	110,69	111,76	109,69	108,39

Concentração nominal: CQM= 15 ng/mL

TABELA 29 - Estudo de estabilidade de nimodipino em plasma submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para o controle de qualidade alto.

	Amostras recém-preparadas	CQA		
Réplicas	CQA	Degelo 1	Degelo 2	Degelo 3
1	39,50	39,30	39,86	38,26
2	38,24	39,00	39,64	38,63
3	37,97	39,82	39,92	38,79
4	36,76	39,13	38,80	38,72
5	37,41	39,50	39,21	38,72
Média	37,98	39,35	39,49	38,62
DP	1,02	0,32	0,47	0,21
CV (%)	2,70	0,82	1,20	0,55
Exatidão (%)	108,50	112,43	112,82	110,35

Concentração nominal: CQA= 35,0 ng/mL

Na Tabela 30 são apresentadas às variações das médias para cada controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) em cada ciclo de descongelamento e congelamento em relação às médias obtidas para as amostras recém-preparadas.

TABELA 30 - Variação das médias dos controles de qualidade nos ciclos de congelamento e degelo em relação às médias das amostras recém-preparadas

	CQB			CQM			CQA		
	Degelo1	Degelo2	Degelo3	Degelo 1	Degelo 2	Degelo 3	Degelo 1	Degelo 2	Degelo 3
Variação (%)	0,00	-0,62	3,70	-0,96	0,90	2,08	-3,62	-3,98	-1,71

Concentração nominal: CQB= 0,30 ng/mL, CQM= 15,0 ng/mL e CQA= 35,0 ng/mL

A Tabela 31 traz uma comparação das variações das médias dos CQB, CQM e CQA para amostras recém-preparadas (Tabelas 27, 28 e 29) e as médias dos CQB, CQM e CQA, em cada ciclo de congelamento e degelo (Tabelas 27, 28 e 29). Como pode ser observada na Tabela 30, a quantificação do fármaco após cada ciclo, comparando-se as variações entre as médias dos CQB, CQM e CQA para amostras recém-preparadas e a média dos CQB, CQM e CQA em cada ciclo de congelamento e degelo podemos observar que estas foram menores que 15% em relação às concentrações nominais.

5.1.10 Estabilidade de longa duração

A Tabela 31 apresenta os resultados das análises realizadas com as amostras recém-preparadas (a fresco) e com as amostras de longa duração, ou seja, amostras preparadas no início da etapa clínica deste estudo.

TABELA 31 - Estabilidade de longa duração para o nimodipino no fluido biológico

Réplicas	Amostras Recém Preparadas			Amostras de longa duração		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
1	0,28	14,61	35,02	0,27	15,13	36,88
2	0,28	14,87	36,00	0,28	16,48	38,55
3	0,29	14,72	35,34	0,26	16,17	37,23
4	0,28	15,04	35,04	0,28	16,29	38,29
5	0,28	14,75	35,18	0,28	16,31	37,19
Média	0,28	14,80	35,32	0,27	16,08	37,63
DP	0,00	0,16	0,40	0,01	0,54	0,74
CV (%)	1,59	1,11	1,14	3,26	3,36	1,97
Exatidão (%)	94,00	98,65	100,90	91,33	107,17	107,51

Concentração nominal: CQB= 0,30 ng/mL, CQM= 15,0 ng/mL e CQA= 35,0 ng/mL

As variações obtidas, quando são comparados os valores médios de CQB, CQM e CQA para as amostras recém preparadas com os valores médios de CQB, CQM e CQA para as amostras armazenadas durante 61 dias, estão abaixo dos desvios permitidos de 15% para os três controles analisados verificando-se, assim, a estabilidade do nimodipino analisado no plasma no período em que as amostras permaneceram armazenadas a -20°C apresentando, portanto, estabilidade de longa duração.

5.1.11 Estabilidade das soluções padrão

Na Tabela 32 estão apresentados os resultados das análises realizadas com amostras recém preparadas e não processadas, que foram mantidas em espera na bancada durante seis horas (a temperatura ambiente) e depois foram extraídas e analisadas no sistema cromatográfico. A Tabela 32 também apresenta os resultados obtidos com as amostras depois

de sete dias de congelamento. Depois do descongelamento natural as amostras foram extraídas e imediatamente analisadas.

TABELA 32 - Estabilidade das soluções padrão para o nimodipino

Réplicas	Amostras Recém preparadas			Amostras analisadas após 6 h a temperatura ambiente			Amostra após de 7 dias de congelamento		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
1	0,33	16,81	39,50	0,31	16,61	38,78	0,29	14,53	34,25
2	0,32	16,52	38,24	0,33	16,12	39,83	0,30	14,46	34,16
3	0,33	16,32	37,97	0,33	16,89	39,66	0,29	14,55	33,89
4	0,33	16,82	36,76	0,32	16,33	39,64	0,29	14,51	33,49
5	0,31	16,55	37,41	0,34	16,89	39,76	0,28	14,99	33,57
Média	0,32	16,60	37,98	0,33	16,57	39,53	0,29	14,608	33,87
DP	0,01	0,21	1,02	0,01	0,34	0,43	0,01	0,22	0,34
CV (%)	2,76	1,28	2,70	3,50	2,06	1,08	2,44	1,48	1,00
Exatidão (%)	108,0	110,69	108,50	108,67	110,45	112,95	96,67	97,39	96,78

Concentração nominal: CQB= 0,30 ng/mL, CQM= 15,0 ng/mL e CQA= 35,0 ng/mL

Comparando-se os valores médios obtidos para os controles de qualidade baixo, médio e alto para as amostras não processadas, permanecidas em bancada durante seis horas a temperatura ambiente, e para as amostras analisadas após sete dias de congelamento com aqueles obtidos para as amostras recém-preparadas, nota-se que as variações são menores que 15% para todos os controles de qualidade indicando, assim, a estabilidade das soluções padrão.

5.1.12 Resultados da Análise Farmacocinética

Na Tabela 33 estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos médios, usando um intervalo de confiança de 90%, obtidos das análises plasmáticas de 24 voluntários para as formulações de nimodipino 30 mg. Comparando-se as médias dos parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração das formulações, podemos observar uma diferença entre T_{max} e C_{max} tanto para a média quanto no intervalo de confiança (IC) de 90%.

Observamos, também, que a média de ASC_{0-48h} (padrão = 57,22, teste = 60,67) é maior ou igual que 80% da média de $ASC_{0-\infty}$ (padrão 80% = 57,29, teste 80% = 58,54), para o medicamento padrão e teste.

TABELA 33 – Média e intervalo de confiança (90%) dos parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração de 30 mg de nimodipino

Parâmetros Farmacocinéticos	NIMODIPINO	
	Formulação Teste	Formulação Referência
ASC_{0-48h} (ng*h*mL⁻¹)		
Média Geométrica	60,67	57,22
(IC 90%)	(51,61-69,74)	(50,88-63,57)
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL⁻¹)		
Média Geométrica	73,18	71,62
(IC 90%)	(64,67-81,69)	(65,58-77,65)
C_{max} (ng*mL⁻¹)		
Média Geométrica	9,48	18,76
(IC 90%)	(7,40-11,55)	(14,99-22,54)
$T_{1/2}$ (h)		
Média Geométrica	27,83	32,78
(CI 90%)	(23,46-32,20)	(27,22-38,35)
T_{max} (h)		
Média Geométrica	2,34	0,98
(IC 90%)	(1,77-2,90)	(0,65-1,32)

A Figura 12 apresenta a curva média da concentração plasmática *versus* tempo após a administração de uma das formulações de nimodipino 30 mg em 24 voluntários sadios. De acordo com a figura, como podemos observar, ocorreu clara diferença entre os valores de T_{max} e C_{max} das formulações estudadas.

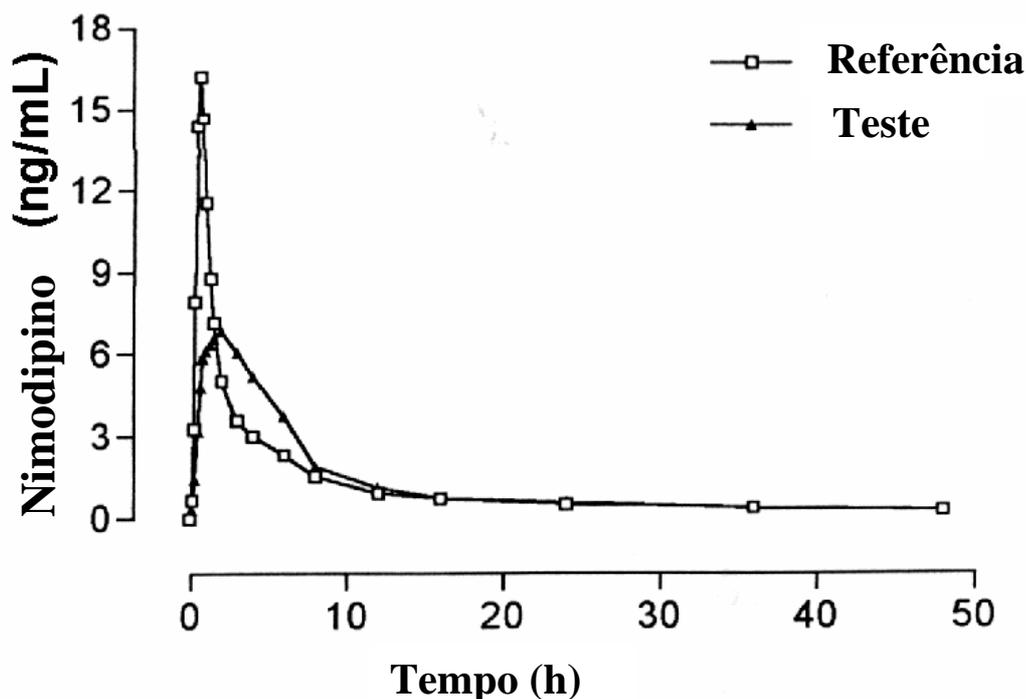


FIGURA 12 - Curvas de concentrações plasmáticas (ng/mL) *versus* tempo (h) após a administração de uma das formulações de 30mg de nimodipino em 24 voluntários saudáveis.

Para avaliar as variações inter (seqüência) e intra-individual (período) para a concentração máxima e a área sob a curva, utilizou-se de uma análise de variância para obter a variabilidade dos dados, em um delineamento cruzado padrão 2x2, como mostra as Tabelas 34 e 35.

TABELA 34 - ANOVA para $\ln(C_{max})$.

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor de p
Inter-individual					
Seqüência	1	1,3058	1,3058	2,6333	0,1188
Resíduos (Inter)	22	10,9093	0,4958	2,5235	0,0174
Intra-individual					
Fármaco	1	4,1027	4,1027	20,8794	0,0001
Período	1	1,3241	1,3241	6,7386	0,0164
Resíduos (Intra)	22	4,3229	0,1964		
Total	47	21,9649			

TABELA 35 - ANOVA para In(ASC_(0-48h)).

Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor de p
Inter-individual					
Seqüência	1	0,0168	0,0168	0,0777	0,7829
Resíduos (Inter)	22	4,7590	0,2163	5,5403	8,391E-05
Intra-individual					
Fármaco	1	0,0238	0,0238	0,6113	0,4426
Período	1	0,0614	0,0614	1,5747	0,2226
Resíduos (Intra)	22	0,8589	0,0390		
Total	47	5,7201			

Verifica-se que, tanto para C_{max} como para $ASC_{(0-48h)}$, o efeito de seqüência não é significativo, pois o valor de p é maior que 0,05 (valor de p = 0,1188 para C_{max} e valor de p = 0,7829 para $ASC_{(0-48h)}$). Constata-se, através desses dados, que há uma variação inter-individual não significativa entre os valores encontrados para C_{max} e para $ASC_{(0-48h)}$.

Nota-se também que o efeito de período é significativo (valor de p = 0,0164) para C_{max} , mas não é para $ASC_{(0-48h)}$ (valor de p = 0,2226). Isso demonstra que a variabilidade intra-individual representou um fator de interferência na absorção do fármaco e conseqüentemente, alteração da biodisponibilidade de uma das formulações. Deve-se ressaltar que entre as administrações houve um “washout” maior do que 7 meias vidas, suficiente para a completa eliminação do medicamento.

Na Tabela 36, estão apresentados os resultados de T_{max} os quais demonstraram que existe diferença entre as médias de T_{max} teste e o T_{max} referência (valor-p = 0,002), com 95% de confiança.

TABELA 36 – Análise da diferença individual de T_{max} (teste menos referência)

Diferença de T_{max} (teste-referência)	IC 90%	Valor-p
1,36	(0,71-2,00)	0,002

Na Tabela 37 estão apresentados os dados com intervalo de confiança de 90% para C_{max} e para ASC_{0-48h} , observando que o intervalo para C_{max} não está contido no intervalo de 80 a 125%.

TABELA 37 – Média, IC (90%) e razão das médias de C_{max} e ASC_{0-48h} .

Razão Teste/Referência	Média Geométrica	IC 90%	CV (%)	Poder do teste	Bioequivalência
C_{max}	55,73	(44,73-69,42)	46,59	23,79	NÃO
ASC_{0-48h}	104,56	(94,80-115,32)	19,94	19,94	SIM

Dados transformados em logaritmo natural.

5.2 Aplicação do método para estudo farmacocinético em 24 voluntários sadios

Foram selecionados 24 voluntários saudáveis, adultos, de ambos os sexos, com idade de 20 a 40 anos ($25,4 \pm 6,19$), e índice de massa corporal (IMC) de 19,7 a 27,6 Kg/m^2 ($22,8 \pm 2,17$).

Os voluntários qualificados para participar do estudo foram internados por períodos de aproximadamente 36 horas, com pelo menos cinco dias de intervalo entre os internamentos.

Os voluntários foram acompanhados clinicamente durante todo o período do estudo. A avaliação de sinais vitais como pulso, pressão sanguínea sistólica e diastólica foi realizada durante intervalos regulares, de acordo com protocolo clínico, mantendo-se dentro dos padrões de normalidade. Todos os voluntários concluíram o estudo, não havendo nenhuma desistência ou retirada.

As duas formulações de nimodipino foram bem toleradas pelos voluntários. As reações adversas, observadas durante os dois períodos de internação, estão relacionadas na Tabela 38.

TABELA 38 - Eventos adversos relatados pelos voluntários durante os dois períodos de internação.

Voluntário	Descrição	Severidade			Atribuída a droga?				Ação adotada
		Leve	Mod.	Sev.	Sim	Pos	Não	Des	
01. AC060367	1. Náusea	(x)	()	()	()	(x)	()	()	Bromoprida
	2. Cefaléia	(x)	()	()	()	(x)	()	()	Paracetamol
09. SA020575	1. Cefaléia	(x)	()	()	()	(x)	()	()	Cefaliv®
10. LA160477	1. Cefaléia	(x)	()	()	()	(x)	()	()	Cefaliv®
	2. Cefaléia	(x)	()	()	()	(x)	()	()	Neosaldina®
15. JR051079	1. Cefaléia	(x)	()	()	()	(x)	()	()	Observação
17. JG170483	1. Cefaléia	(x)	()	()	()	(x)	()	()	Observação
	2. Cefaléia	(x)	()	()	()	(x)	()	()	Observação
24. AF191083	1. Cefaléia	(x)	()	()	()	(x)	()	()	Observação

O evento adverso mais relatado pelos voluntários durante os internamentos foi cefaléia. Dos vinte e quatro voluntários que concluíram o estudo, seis (25%) apresentaram este evento adverso.

Os exames clínicos e laboratoriais, pós-estudo, não apresentam alterações significativas, quando comparadas aos exames laboratoriais realizados no pré-estudo. Os exames foram avaliados individualmente quanto à média aritmética dos voluntários e comparados aos valores de referência apresentados pelo laboratório. (Tabelas 39, 40, 41, 42 e 43).

TABELA 39 - Resultados hematológicos das determinações laboratoriais das 12 voluntárias do sexo feminino (média \pm SD) antes e após os dois períodos de internação.

Hematologia	Pré-estudo		Pós-estudo		Normal
	Média \pm SD		Média \pm SD		
Hemoglobina (g%)	12,93	\pm 0,51	11,81	\pm 0,56	11,2 - 16,4
Eritrócitos (%)	4,26	\pm 0,25	3,86	\pm 0,25	3,9 - 5,8
Hematócrito (Ht%)	32,2	\pm 7,28	34,9	\pm 1,73	36 - 47
Eritrócitos	4,26	\pm 0,25	3,86	\pm 0,25	3,9 - 5,8
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	6,20	\pm 1,20	6,56	\pm 1,44	5 - 10
<i>Contagem diferencial</i>					
Bastões	1	\pm 0	1	\pm 0	1 - 3
Segmentados	52,58	\pm 4,48	52,75	\pm 7,78	40 - 75
Linfócitos	33,58	\pm 4,96	34,25	\pm 5,94	20 - 45
Monócitos	7,91	\pm 1,24	7,33	\pm 1,61	2 - 10
Basófilos	0,75	\pm 0,45	0,66	\pm 0,49	0 - 1
Eosinófilos	4,16	\pm 1,69	4	\pm 2	1 - 6
<i>Outros</i>					
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	281,71	\pm 67,81	278,66	\pm 56,81	150 - 450

TABELA 40 - Resultados hematológicos das determinações laboratoriais dos 12 voluntários do sexo masculino (média \pm SD) antes e após os dois períodos de internação.

Hematologia	Pré-estudo		Pós-estudo		Normal
	Média \pm SD		Média \pm SD		
Hemoglobina (g%)	14,8	\pm 0,45	14,03	\pm 0,37	13,5 – 18
Eritrócitos (%)	4,84	\pm 0,17	4,63	\pm 0,16	4,5 - 6,5
Hematócrito (Ht%)	42,94	\pm 1,30	41,04	\pm 1,28	40 – 54
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	6,30	\pm 1,20	6,68	\pm 1,63	5 – 10
<i>Contagem diferencial</i>					
Bastões	1	\pm 0	1	\pm 0	0 – 3
Segmentados	50,66	\pm 7,21	52,66	\pm 7,08	40 – 75
Linfócitos	30,41	\pm 8,02	31,16	\pm 6,26	1 – 6
Monócitos	8,08	\pm 3,17	7,83	\pm 1,80	0 – 1
Basófilos	0,16	\pm 0,38	0,50	\pm 0,52	20 - 45
Eosinófilos	6,0	\pm 3,04	6,75	\pm 2,86	2 - 10
<i>Outros</i>					
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	267,91	\pm 70,42	276,91	\pm 69,50	150 - 450

TABELA 41 - Resultados bioquímicos das determinações laboratoriais das 12 voluntárias do sexo feminino (média \pm SD) antes e após os dois períodos de internação.

Bioquímica	Pré-estudo		Pós-estudo		Normal
	Média	\pm SD	Média	\pm SD	
Colesterol Total (mg/dL)	162	\pm 24,71	161,08	\pm 29,56	\leq 200
Triglicérides (mg/dL)	89,75	\pm 30,50	90,08	\pm 42,22	\leq 150
Proteínas Totais (g/dL)	7,24	\pm 0,35	6,93	\pm 0,30	6,3 - 8,2
Albumina (g/dL)	4,20	\pm 0,20	4,61	\pm 1,20	3,4 - 4,8
Globulinas (g/dL)	3,03	\pm 0,23	2,82	\pm 0,23	-
Ácido Úrico (mg/dL)	4,15	\pm 0,72	3,92	\pm 0,56	2,5 - 5,7
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,64	\pm 0,24	0,53	\pm 0,19	Até 1,1
Fosfatase Alcalina (U/L)	153	\pm 52,04	137,08	\pm 39,26	< 240
γ GT (U/L)	18,66	\pm 9,26	16,25	\pm 7,96	5 - 36
TGO (AST) (U/L)	18,33	\pm 2,96	18,05	\pm 4,70	Até 32
TGP (ALT) (U/L)	19,84	\pm 10,04	19,05	\pm 11,98	Até 31
Uréia (mg/dL)	23,06	\pm 4,37	22,87	\pm 6,09	10 - 50
Creatinina (mg/dL)	0,66	\pm 0,10	0,61	\pm 0,13	0,7 - 1,2
Glicose em jejum (mg/dL)	81	\pm 8,10	79,16	\pm 9,92	70 - 105

TABELA 42 - Resultados bioquímicos das determinações laboratoriais dos 12 voluntários do sexo masculino (média \pm SD) antes e após os dois períodos de internação.

Bioquímica	Pré-estudo		Pós-estudo		Normal
	Média \pm SD		Média \pm SD		
Colesterol Total (mg/dL)	156,83	\pm 30,36	160,33	\pm 26,32	\leq 200
Triglicérides (mg/dL)	90,83	\pm 41,53	92,08	\pm 37,29	\leq 150
Proteínas Totais (g/dL)	7,48	\pm 0,36	7,24	\pm 0,28	6,3 - 8,2
Albumina (g/dL)	4,49	\pm 0,24	4,36	\pm 0,37	3,4 - 4,8
Globulinas (g/dL)	2,99	\pm 0,28	2,82	\pm 0,24	-
Ácido Úrico (mg/dL)	5,93	\pm 0,91	5,67	\pm 0,91	3,4 - 7,0
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,69	\pm 0,27	0,78	\pm 0,28	Até 1,1
Fosfatase Alcalina (U/L)	186,25	\pm 42,31	164,33	\pm 32,80	$<$ 270
γ GT (U/L)	23,41	\pm 13,22	21,08	\pm 12,64	8 - 61
TGO (AST) (U/L)	18,91	\pm 2,81	21,9	\pm 5,46	Até 38
TGP (ALT) (U/L)	20,94	\pm 9,40	23,36	\pm 14,47	Até 41
Uréia (mg/dL)	26,86	\pm 4,16	32,26	\pm 14,27	10 - 50
Creatinina (mg/dL)	0,86	\pm 0,13	0,80	\pm 0,11	0,7 - 1,2
Glicose em jejum (mg/dL)	85,5	\pm 5,88	86	\pm 9,17	70 - 105

TABELA 43 - Determinações laboratoriais do sumário de urina dos 24 voluntários de ambos os sexos (média \pm SD) antes e após os dois períodos de internação.

Sumário de urina	Pré-estudo		Pós-estudo		Normal
	Média \pm SD		Média \pm SD		
Densidade	1021,3	\pm 7,5	1025,2	\pm 6,2	1005-1030
PH	5,7	\pm 0,5	5,9	\pm 0,5	5,0-8,0
Albumina	-	-	-	-	negativo
Glicose	-	-	-	-	negativo
Cetona	-	-	-	-	negativo
<i>Microscopia</i>					
Leucócitos	< 1,58	\pm 1,05	< 1,33	\pm 0,70	0-3
Hemácias	< 0,75	\pm 1,67	< 0,33	\pm 1,16	0
Cilindros	-	-	-	-	0-5
Céls. epiteliais	2,37	\pm 2,08	1,62	\pm 1,09	0-5
Cristais	-	-	-	-	-
Bactérias	-	-	-	-	-
<i>Outros</i>					

Os dados clínicos de cada voluntário foram registrados em ficha apropriada que consta dos critérios de admissão, história médica pré-estudo, exame físico geral pré e pós-estudo, resultado ECG pré e pós-estudo, ficha de administração, coleta de sangue e aferição de sinais vitais do 1º e 2º internamentos, registro de eventos adversos, utilização de medicamentos para os eventos adversos, término prematuro do estudo, determinações laboratoriais e comentários adicionais.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A validação de um método bioanalítico deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (FINDLAY *et al.*, 2000; SHAH *et al.*, 2000; MEI *et al.*, 2003; KIMANANA, 1998; HARTMANN *et al.*, 1998). Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise (BRASIL, 2003a).

A utilização de métodos bioanalíticos para a determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos e matrizes biológicas representa um papel significativo na avaliação e interpretação dos resultados de estudos de bioequivalência, biodisponibilidade e farmacocinéticos (LINDHOLM *et al.*, 2003; CAUSON, 1997; BRESSOLLE *et al.*, 1996; DAGDAR *et al.*, 1995; CHAMBERLAIN, 1995).

Várias técnicas bioanalíticas têm sido aplicadas para a detecção e quantificação de nimodipino em fluidos biológicos. Cromatografia gasosa (CG) com captura de elétrons (JACKOBSEN *et al.*, 1986; KROL *et al.*, 1984), detecção nitrogênio-fósforo (ROSSEEL *et al.*, 1990) foram técnicas utilizadas para determinação de nimodipino em plasma. Estes métodos apresentaram limite de quantificação (sensibilidade) de 5 ng/mL utilizando 1 mL de plasma. Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (QUIAN & GALLO, 1992; AYMARD *et al.*, 1998; BLARDI *et al.*, 2002) e detecção eletroquímica (LOPÉZ *et al.*, 2000) tiveram uma sensibilidade de 1 ng/mL utilizando 1 mL de plasma, entretanto, estes métodos apresentaram um tempo total de corrida maior que 10 minutos.

Fischer e cols., (1993) desenvolveram um método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa combinada com cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quirál para a separação e determinação dos enantiômeros do nimodipino. A metodologia analítica empregada mostrou sensibilidade de 0,1 ng/mL usando 0,5 mL de plasma. Este método apresentou maior sensibilidade que os métodos anteriormente citados, no entanto, o tempo total de análise de uma única amostra de plasma foi cerca de 30 minutos tornando-se, assim, uma técnica analítica fora dos padrões adequados para a análise

de um grande número de amostras biológicas como, por exemplo, em um estudo farmacocinético. Mück, (1995) validou uma metodologia para quantificação plasmática do nimodipino através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (LC-MS-MS). Este método apresentou um limite de quantificação de 0,5 ng/mL utilizando 1 mL de plasma, porém o método foi desenvolvido para quantificação dos enantiômeros do nimodipino.

Qiu e cols., (2004) desenvolveram e validou uma técnica analítica sensível e específica para quantificação de nimodipino em plasma humano. O método desenvolvido através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa, mostrou sensibilidade de 0,24 ng/mL usando 0,5 mL de plasma. A análise de uma única amostra de plasma foi realizada em 4 minutos e mais de 120 amostras foram processadas diariamente.

O processamento de um grande número de matrizes biológicas, que geralmente é requerido em estudos de farmacocinética, bioequivalência e biodisponibilidade, necessita de procedimentos analíticos rápidos, sensíveis específicos e seletivos. Entretanto, muitos métodos analíticos descritos, utilizados para determinação de fármacos, ainda precisam ser aperfeiçoados para atender às definições de rígidos critérios do controle de qualidade de medicamentos previstos na legislação.

A técnica bioanalítica descrita foi desenvolvida e validade de acordo com os critérios exigidos pela Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

Primeiramente, o analito (nimodipino) e o padrão interno dibucaína foram introduzidos diretamente no espectrômetro de massa usando uma fonte de ionização por *electrospray* operando no modo positivo (ESI+). Parâmetros tais como temperatura da fonte e dessolvatação, fluxo dos gases do cone, voltagem do capilar, cone e energia de colisão e pressão de argônio para a dissociação foram otimizados a fim de se obter o íon molecular protonado mais abundante tanto do analito quanto do padrão interno. Os íons moleculares protonados mais abundantes foram escolhidos através da análise dos seus respectivos espectros de massas, estando o equipamento calibrado para monitorar múltiplas reações (MRM). A energia de colisão mais adequada foi determinada observando-se a resposta

máxima para o pico do fragmento do íon molecular mais abundante. A fonte de ionização por *electrospray*, avaliada durante o estágio inicial do desenvolvimento do método, ofereceu alta sensibilidade e boa linearidade com um volume de injeção de 0,12mL/min e um curto tempo de corrida.

As condições cromatográficas foram investigadas com o objetivo de otimizar sensibilidade, simetria e o tempo dos picos cromatográficos. Os componentes da fase móvel foram também otimizados em diferentes percentagens de solventes orgânicos. A utilização da fase móvel acetonitrila – solução de acetato de amônio 0,02 mol/L (80:20 v/v) mostrou estabilidade dos picos cromatográficos tanto na sua simetria quanto na sua área assegurando, assim, uma curta corrida cromatográfica e boa sensibilidade do método.

Vários métodos de extração líquido-líquido e extração de fase sólida, procedimento que aumenta os custos e o tempo da análise, são descritos para extração de nimodipino em plasma humano (MÜCK & BODE, 1994). Durante o processo de validação, diferentes condições de extração líquido-líquido foram avaliadas incluindo diferentes solventes orgânicos. Quatro solventes extratores foram avaliados (hexano/acetato de etila 1:1, hexano/butanol 99:1, hexano/álcool isoamílico 9:1, éter dietílico/diclorometano 7:3). Dentre os solventes testados, o hexano/acetato de etila 1:1 ofereceu melhores valores de recuperação tanto do fármaco quanto do padrão interno. A recuperação de um analito em um ensaio é a resposta do detector de uma quantidade de analito adicionada e ou separada de uma matriz biológica. A recuperação está ligada à eficiência do método analítico de separação, dentro dos limites de variabilidade (SHAH *et al.*, 2000).

O método analítico descrito para a determinação de nimodipino confirma que o LC-MS-MS está de acordo com os conceitos de alta sensibilidade, alta especificidade e rápido processamento de amostras requerido para um estudo farmacocinético. A sensibilidade mostrou-se bem mais eficiente (LQ=0,1ng/mL) em relação a outros métodos descritos como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV, HPLC com detecção eletroquímica, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS-MS), cromatografia gasosa (CG) com captura de elétrons, CG com detecção nitrogênio-fósforo e CG acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) cujos limites de quantificação descritos variam de 0,25 a 5 ng/mL (MÜCK, 1994; AYMARD *et al.*, 1998; BLARDI *et al.*, 2002; LOPÉZ *et al.*, 2000; FISCHER *et al.*, 1993; MÜCK, 1995; QIU *et al.*, 2004). Com o limite de

quantificação de 0,1 ng/mL encontrado pelo método proposto, as concentrações plasmáticas de nimodipino podem ser determinadas até 48 horas após administração oral de 30 mg do medicamento. Assim, o presente método ofereceu sensibilidade o bastante para realização de estudos farmacocinéticos, estabelecimento da relação entre a dose administrada e efeito farmacológico e identificar doses que produzam respostas tóxicas em humanos.

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais em idênticas condições de ensaio e a exatidão, o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um aceito como referência. Um método bioanalítico é considerado preciso e exato quando as análises dos controles de qualidade baixo, médio, alto e limite de quantificação mostrarem valores não excedentes a $\pm 15\%$ do valor nominal analisado e para o limite de quantificação este desvio não deve exceder $\pm 20\%$ tanto para as mesmas corridas (Intra-ensaio) quanto para corridas analíticas diferentes (Inter-ensaio) (BRASIL, 2003a; GUIDELINE FOR INDUSTRY, 2001; BRESSOLLE *et al.*, 1996; DADGAR & BURNETT, 1995).

Nossos resultados apresentaram variações de 0 a 5,71% para a precisão intra-ensaio e 7% para a precisão inter-ensaio do limite de quantificação (LQ). A exatidão intra-ensaio referente a este parâmetro variou de 96 a 110% e exatidão inter-ensaio foi de 103%.

As análises dos controles de qualidade apresentaram desvios que variaram de 0,81 a 8,57% para a precisão intra-ensaio e 3,37 a 5,46% para a precisão inter-ensaio. A exatidão intra e inter-ensaio variaram de 100,67 a 109,72% e 102,89 a 109,69% respectivamente.

Nossos resultados da análise da estabilidade não apresentaram sinais de degradação do fármaco em estudo. É possível no entanto, concluir que não houve degradação dentro do tempo utilizado no teste, o que é sustentado pela avaliação da variação dos controles de qualidade durante o estudo. O objetivo desse teste de estabilidade é antecipar a identificação de possíveis problemas. Há comprovação com base nos controles de qualidade de que não ocorreram problemas de estabilidade nas corridas analíticas, já que os controles de qualidade mantiveram-se dentro dos níveis esperados e estas foram, portanto validadas constituindo provas suficientes para aceitação dos resultados e comprovação da estabilidade das amostras.

Para avaliar a estabilidade das amostras, durante as análises, são exigidos testes de estabilidade de curta e longa duração, estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo e estabilidade das soluções padrão. A avaliação da estabilidade do fármaco no tempo e condições de análise (curta duração) é realizada deixando as amostras imediatamente após descongelamento e preparação dentro do auto-injetor em temperatura ambiente por 10 horas. Os valores encontrados não apresentam uma importância significativa, vale salientar, no entanto, que o tempo do material em bancada (curta duração) não costuma exceder 1 hora e é o mesmo utilizado para o preparo dos controles de qualidades. Portanto, qualquer degradação afetaria da mesma forma os controles de qualidade empregados, levando a não validação das corridas. Podendo-se concluir, portanto, que não houve degradação dentro do tempo utilizado para o teste, o que é igualmente sustentado pela avaliação da variação dos controles de qualidade durante a condução do estudo.

Quanto aos dados da estabilidade de longa duração, consideramos a variação pouco significativa, uma vez que as variações obtidas, quando comparadas com os valores médios dos controles de qualidade baixo, médio e alto para as amostras recém-preparadas com os valores médios de CQB, CQM e CQA para as amostras armazenadas durante 61 dias estão abaixo dos desvios permitidos de 15% para os três controles analisados. Assim, as amostras dos voluntários sofreram o mesmo grau de degradação, o que não interfere na avaliação dos parâmetros farmacocinéticos relativos ao fármaco em estudo.

A estabilidade do nimodipino em amostras de plasma submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento mostrou estabilidade do fármaco uma vez que foram quantificados a cada ciclo de degelo. A avaliação foi feita comparando-se as variações entre as médias dos CQB, CQM e CQA para amostras recém - preparadas e a média dos CQB, CQM e CQA em cada ciclo de congelamento e descongelamento.

Quanto à estabilidade das soluções padrão, comparando-se os valores médios obtidos para os controles de qualidade baixo, médio e alto para as amostras não processadas, permanecidas em bancada durante seis horas à temperatura ambiente, e para as amostras analisadas após sete dias de congelamento com aqueles obtidos para as amostras recém-preparadas, nota-se que as variações são menores que 15% para todos os controles de qualidade indicando, assim, a estabilidade das soluções padrão.

A metodologia validada foi aplicada para determinação dos parâmetros farmacocinéticos de duas formulações de nimodipino 30 mg em um estudo de biodisponibilidade comparativa.

As razões das médias geométricas do C_{\max} e ASC_{0-48h} da formulação de comprimidos de nimodipino 30mg pelo Nimotop[®] 30mg foi de 55,73% e 104,56%, respectivamente. O intervalo de confiança de 90% foi de 44,80 – 69,42% e 94,80 - 115,32%, respectivamente.

Tendo em vista que $ASC_{(0-\infty)}$ consiste de um valor estimado, representativo da extensão total de absorção do fármaco, e que a $ASC_{(0-48h)}$ representa a extensão de absorção quantificada na metodologia em estudo, a relação desses dois valores deve ser maior ou igual a 80%. Nossos resultados demonstraram que a média de ASC_{0-48h} (padrão = 57,22, teste = 60,67) é maior ou igual que 80% da média de $ASC_{0-\infty}$ (padrão 80% = 57,29, teste 80% = 58,54), para o medicamento padrão e teste, conforme preconiza a RE n° 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (BRASIL, 2003a)

De acordo com o FDA e ANVISA medicamentos são considerados bioequivalentes quando a razão das médias de C_{\max} e $ASC_{(0-t)}$ apresentarem-se entre 80–125% (considerando um intervalo de confiança de 90%). Os resultados estatísticos demonstraram que a formulação de nimodipino 30 mg não foi bioequivalente à formulação Nimotop[®] quanto à taxa de absorção (C_{\max}) após uma única administração.

A comprovação da equivalência farmacêutica das formulações permite que as formulações avaliadas possam ser utilizadas nos testes de bioequivalência, a fim de garantir a sua intercambialidade. A avaliação da qualidade *in vitro* das formulações consiste na identificação e na determinação do teor ou da potência da substância ativa da fórmula, além da avaliação de parâmetros físico-químicos da forma farmacêutica, tais como: determinação de peso, dureza friabilidade, uniformidade de doses unitárias, desintegração, dissolução e presença de contaminantes. (SOARES, 2002).

Apesar das formulações serem equivalentes farmacêuticos, nossos resultados demonstraram diferenças nos valores de T_{\max} e C_{\max} , tanto para a média quanto para o intervalo de confiança de 90%, não evidenciando a intercambialidade entre os produtos

estudados. As alterações farmacocinéticas observadas podem ser justificadas por possíveis variações farmacotécnicas ocorridas durante o processo de formulação, tais como diferentes matérias-primas ou quantidade distinta de excipientes empregados, tamanho da partícula ou da forma cristalina do excipiente, lipo ou hidrossolubilidade, hidratação entre outros (ANSEL *et al.*, 2000).

De acordo com a literatura, a meia-vida de eliminação do nimodipino é de aproximadamente 8-9 horas, entretanto, devido a seu extenso metabolismo de primeira passagem, esta faixa diminui rapidamente para 1-2 horas. Estudos anteriores (QIU *et al.*, 2004; HE *et al.*, 2004; BLARDI *et al.*, 2002; YAN *et al.*, 1990 RÄMISCH *et al.*, 1986) confirmam estes dados, no entanto, o cronograma de coletas utilizado nestes estudos foi de no máximo 10 horas possibilitando, assim, a perda de dados na fase de eliminação do fármaco.

Nossos resultados demonstraram, no entanto, que o valor médio da meia-vida para as duas formulações testadas foi 30,3 horas. Tal diferença pode ser justificada pela maior sensibilidade do método (LQ = 0,1 ng/mL) em relação aos métodos utilizados em estudos anteriores, onde foi possível a detecção de níveis plasmáticos com precisão e exatidão (até 48 horas) para um intervalo de tempo onde anteriormente não seria possível a quantificação.

Sabe-se que as coletas de sangue para estudos farmacocinéticos de bioequivalência devem compreender 3–5 meias-vidas, então, baseado nestes valores, compreende-se o esquema de coleta dos estudos anteriores que coletavam somente até 10 horas, já que se considerava que neste horário praticamente todo o nimodipino já teria sido eliminado (BRASIL, 2003b).

Nosso estudo realizou coletas de sangue até 48 horas após a administração. Observou-se, também, na quantificação das amostras plasmáticas correspondentes ao horário de 48 horas que todos os voluntários apresentaram níveis plasmáticos detectáveis de nimodipino, no entanto, a maioria já apresentava valores mais próximos ao limite de quantificação.

A maior sensibilidade apresentada na análise permitiu que as concentrações plasmáticas fossem determináveis até 48 horas após sua administração, o que não seria possível nos demais métodos devido aos valores dos limites de quantificação obtidos que só

permitiam a quantificação dos níveis de nimodipino até 10 horas após a administração do fármaco.

Uma vantagem da sensibilidade do método descrito é que permite ao investigador administrar doses mais baixas da medicação testada e com isso aumentar o grau de segurança para os voluntários do estudo, o que diminui a probabilidade de aparecimento de um número maior de eventos adversos, já que esses na maioria das vezes são dose-dependente.

A sensibilidade do método analítico é um fator determinante da dose utilizada no estudo farmacocinético. Esse estudo utilizou a dose de 30 mg, no entanto, nos estudos realizados por QIU *et al.*, 2004; HE *et al.*, 2004; BLARDI *et al.*, 2002, empregou-se doses que variaram de 30 a 90 mg de nimodipino.

Esses novos achados sobre a meia-vida de eliminação podem ajudar a explicar a ausência de uma relação concentração-efeito, além de algumas alterações na utilização de nimodipino na prática clínica, como à diminuição das doses empregadas para tratamento ao qual é empregado.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (LC-MS-MS) é uma técnica analítica muito utilizada atualmente em indústrias farmacêuticas na quantificação de fármacos e compostos de interesse biomédico em matrizes biológicas tais como sangue total, plasma ou urina. Apesar de existir muitos métodos analíticos específicos, muitos requerem volumes consideráveis de amostras biológicas ou não são economicamente viáveis para serem empregados na rotina de um laboratório.

O método bioanalítico (LC-MS-MS) desenvolvido e validado para determinação de nimodipino em plasma humano atende a todos os requisitos exigidos para a realização de estudos que requeiram a determinação de nimodipino ou diidropiridinas em plasma humano, mostrando-se ser um método rápido, sensível e seletivo.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A metodologia analítica desenvolvida e validada mostrou-se precisa, pois os coeficientes de variação para os controles de qualidade, baixo, médio e alto permaneceram abaixo de 15% e abaixo de 20% para o limite de quantificação com a mesma concentração do limite de detecção.

Verificou-se exatidão, pois os valores médios permaneceram dentro dos 15% do valor nominal para o controle de qualidade baixo, médio e alto e não se desviou mais que 20% do limite de quantificação.

O método é considerado sensível, pois o menor limite de quantificação do método (LQ=0,1ng/mL) apresentou um coeficiente de variação inferior a 20%.

O método mostrou-se específico já que não houve interferência nos tempos de retenção dos picos do analito e do padrão interno superior a 20% da resposta do limite de quantificação.

A estabilidade do método foi assegurada, através dos testes de estabilidade de curta duração, estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de longa duração e estabilidade das soluções padrão, onde se verificou não haver degradação do fármaco na matriz biológica estudada.

O método analítico utilizado LC-MS-MS para quantificação do nimodipino em plasma humano desenvolvido e validado apresenta vantagens sobre os já descritos.

As formulações de nimodipino avaliadas em estudo farmacocinético apresentaram diferentes biodisponibilidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, N.; NÄSMAN, P.; WAHLGREN, N.G. Effect of intravenous nimodipine on blood pressure and outcome after acute stroke. **Stroke**. V. 31; p. 1250-1255, 2000.

ALBORCH, E.; SALON, J.B.; TORREGROSA, G. Calcium channels in cerebral arteries. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 68, p. 1-34, 1995.

ALBORCH, E.; SALOM, J.B.; PERALES, A.J.; *et al.* Comparison of the anticonstrictor action of dihydropyridines (nimodipine and nicardipine) and Mg^{2+} in isolated human cerebral arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 229, p. 83-89, 1992.

ANDERSSON, K.E.; EDVINSSON, L.; MACKENZIE, E.T.; SKARBY, T.; YOUNG, A.R. Influence of extra-cellular calcium and calcium agonists on contractions induced by potassium and prostaglandin $F_{2\alpha}$ in isolated cerebral and mesenteric arteries of the cat. **British Journal of Pharmacology**, v. 79, p. 135-140, 1983.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L. V. **Farmacotécnica. Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: premier, 2000.

ANVISA. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade bioequivalência/agência nacional de vigilância sanitária**. Gerência-geral de inspeção e controle de medicamentos e produtos. Brasília: 2002.

AYMARD, G.; CAYRE-CASTEL, M.; FERNANDEZ, C.; LACOMBLEZ, L.; DIQUET, B. High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet and fluorimetric detection for the simultaneous determination of tacrine, nimodipine, and their respective metabolites in the plasma of patients with Alzheimer disease. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 20, p. 422-429, 1998.

BALON, R.; RAMESH, C. Calcium channel blockers for anxiety disorders? **Ann Clin. Psychiatry**. v. 8; p. 215-220, 1996.

BELFORT, M.A.; SAADE, G.R.; MOISE, K.J.Jr. *et al.* Nimodipine in the management of pre-eclampsia: maternal and fetal effects. **American Journal of obstetrics and Gynecology**, v. 171, p. 417-424, 1994.

BLARDI, P.; URSO, R.; DE LALLA, A.; VOLPI, L.; PERRI, T.D.; AUTERI, A. Nimodipine: Drug pharmacokinetics and plasma adenosine levels in patients affected by cerebral ischemia. **Clinical Pharmacological & Therapeutics**, v. 72, p. 556-561, 2002.

BOULANGER, B.; CHIAP, W.; CROMMEN, J.; HUBERT, P.H. An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 32; p. 753-765, 2003.

BRAGGIO, S.; BARNABY, R.J.; CUGOLA, M. A strategy for validation bioanalytical methods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 14; p. 375-388, 1996.

BRANDT, L.; ANDERSSON, K.E.; EDVINSSON, L.; LJUNGGREN, B. Effects of extracellular calcium and of calcium antagonists on the contractile responses of isolated human pial and mesenteric arteries. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 1, p. 339-347, 1981.

BRASIL. Resolução Nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003a.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada da ANVISA (RDC) Nº 135, de 29 de maio de 2003. Estabelece regulamento técnico para medicamento genérico. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003b.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **Journal of chromatography B**, v. 686; p. 3-10, 1996.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689; p. 175-180, 1997.

CHAMBERLAIN, J. **Special problems with biological fluids, the analysis of drugs in biological fluids**, second ed., CRC PRESS INC., USA, p. 35-66, 1995.

CHAVEZ-CARTAYA, R.E.; PINO DESOLA, G.; RAMIREZ-ROMERO, P.; CALNE, R.Y.; JAMIESON, N.V. Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: the role of nimodipine. **Journal of Surgical Research**, v. 60, p. 199-206, 1996.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos** 7 ed. Campinas, SP: UNICAMP, 1997.

DADGAR, D.; BURNETT, P.A.; CHOC, M.G; GALLICANO, K.; HOOPER, J.W. Application issues in biological method validation, sample analysis and data reporting. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13; p. 89-97, 1995.

DADGAR, D.; BURNETT, P.A. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14; p. 23-31, 1995.

DECKERT, J.; BEREZNAI, B.; HENNEMANN, A.; *et al.* Nimodipine inhibits [³H] nitrobenzylthioinosine binding to the adenosine transporter in human brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 238, p. 131-133, 1993.

DOLLERY, C. in Churchill Livingstone (Editor), **Therapeutic Drugs**, United Kingdom, 1999, Vol.2, pp. N96-N100.

EVERS, S.; Drug treatment of migraine in children: a comparative review. **Pediatric Drugs**. V. 1; p. 7-18, 1999.

FANELLI, R.J.; MCCARTHY, R.T.; CHISHOLM, J. Neuropharmacology of nimodipine: from single channels to behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 747, p. 336-350, 1994.

FINDLAY, J. W. A.; SMITH, W. C.; LEE, W.; NORDBLOM, G. D.; DESILVA, I. DAS, B. S.; KHAN, M. N.; BOWSER, R. R. Validation of immunoassays for bioanalysis: A pharmaceutical industry perspective. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 21; p. 1249–1273, 2000.

FISCHER, C.; SCHONBERGER, F.; MUCK, W.; HEUCK, K.; EICHELBAUM, M. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 82, p. 244, 1993.

FOGELHOLM, R.; ERILÄ, T.; PALOMÄKI, H.; MURROS, K.; KASTE, M. Effect of nimodipine on final infarct volume after acute ischemic stroke. **Cerebrovasc. Dis.** V. 10; p. 189-193, 2000.

FRYE, M.A.; PAZZAGLIA, P.J.; GEORGE, M.S.; LUCKENBAUGH, D.A.; VANDERHAM, E.; DAVIS, C.L.; RUBINOW D.R.; POST, R.M. Low CSF somatostatin associated with response to nimodipine in patients with affective illness. **Biol. Psychiatry**. v. 53; p. 180-183, 2003.

GENGO, F.M.; FAGAN, S.C.; KROL, G.; BERNHARD, H. Nimodipine disposition and haemodynamic effects in patients with cirrhosis and age-matched controls. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 23, p. 47-53, 1987.

GOODNICK, P.J.; The use of nimodipine in the treatment of mood disorders. **Bipolar Disord.** v. 2; p. 165-173, 2000.

GUIDANCE FOR INDUSTRY, Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, **Food and Drug Administration**, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), May 2001.

GUIDANCE FOR INDUSTRY, General Considerations for the Clinical Evaluations of Drugs, US Department of Health and Human Services, **Food and Drug Administration**, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), February 1997a.

GUIDANCE FOR INDUSTRY, INDs for Phase 2 and Phase 3 Studies, US Department of Health and Human Services, **Food and Drug Administration**, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), May 2003.

GUIDANCE FOR INDUSTRY, M3 Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals, US Department of Health and Human Services, **Food and Drug Administration**, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), July 1997b.

HARALANOV, L.; KLISSURSKI, M.; STAMENOVA, P. Functional methods for evaluation the occurrence of delayed ischemic deficit in patients with subarachnoid hemorrhage. **Eur. J. Med. Res.**, v. 6; p. 185-189, 2001.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L.; McDOWALL, R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 17; p. 193-218, 1998.

HAUERBERG, J.; RASMUSSEN, G.; JUHLER, M.; GJERRIS, F. The effect of nimodipine on autoregulation of cerebral blood flow after subarachnoid haemorrhage in rat. **Acta Neurochirurgica**, v. 132, p. 98-103, 1995.

HE, Z.; ZHONG, D.; CHEN, X.; LIU, X.; TANG, X.; ZHAO, L. Development of dissolution medium for nimodipine tablets based on bioavailability evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 487-491, 2004.

HEPLER, C. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care, **Am. J. Pharm.**, v. 53, p 7S-15S, 1989.

HERBETTE, L.G.; MASON, P.E.; SWEENEY, K.R.; TRUMBORE, M.W; MASON, R.P. Favorable amphiphilicity of nimodipine facilitates its interactions with brain membranes. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 241-249, 1994.

HERNING, R.I.; GUO, X.; LANGE, W.R. The effects of nimodipine on the EEG of substance abusers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 765, p. 143-151, 1995.

HERNING, R.I.; GUO, X.; LANGE, W.R. Nimodipine improves information processing in substance abusers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 765, p. 152-159. 1995.

HISTORY OF THE PHARMACOPEIA OF THE UNITED STATES, in United States Pharmacopeia 23rd revision, Rockville, md, **United Pharmacopeial Convention inc.** 1995

JABA, I.M.; LUNCANU, I.; MUNGIU, O.C. Opióides tolerance and dependence-pharmacological aspects. **Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Lasi.**, v. 105; p. 444-450, 2001.

JACKOBSEN, P.; MIKKELSEN, E.O.; LAURSEN, J.; JENSEN, F. Determination of nimodipine by gas chromatography using electron-capture detection; external factors influencing nimodipine concentration during intravenous administration. **Journal of Chromatography**, v. 374, p. 383-387, 1986.

KAZDA, S.; GARTHOFF, B.; KRAUSE, H.P.; SCHLOSSMANN, K. Cerebrovascular effects of the calcium antagonistic dihydropyridine derivative nimodipine in animal experiments. **Arzneimittel-Forschung**, v. 32, p. 331-338, 1982.

KIMANANI, E.K. Bioanalytical calibration curves: proposal for statistical criteria. **Journal of pharmacological and biomedical analysis**, v. 16; p. 1117-1124, 1998.

KROL, G.J.; NOE, A.J.; YEH, S.C.; RAEMSCH, K.D. Gas and liquid chromatographic analyses of nimodipine calcium antagonist in blood plasma and cerebrospinal fluid. **Journal of Chromatography**, v. 305, p.105-118, 1984.

LANGLEY M S, SORKIN F M, Nimodipine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic proprieties and therapeutic potential in cerebrovascular disease. **Drugs**, v. 37, p. 669-699, 1989.

LARKIN, J.G.; THOMPSON, G.G.; SCOBIE, G.; *et al.* Dihydropyridine calcium antagonists in mice: blood and brain pharmacokinetics and efficacy against pentylentetrazol seizures. **Epilepsia**, v. 33, p. 760-769, 1992.

LEGAUT, C.; FURBERG, C.D.; WAGENKNECHT, L.E.; *et al.* Nimodipine neuroprotection in cardiac valve replacement: report of an early terminated trial. **Stroke**, v. 27, p. 593-598, 1996.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4 ed. Campinas, SP: Átomo, 2002. 1068p.

LOBO, N.C. Desenvolvimento De Um Método Analítico De Norfloxacin Em Plasma De Voluntários Sadios Usando Cromatografia Líquida De Alta Eficiência No Modo Reverso **Dissertação de Mestrado**, Universidade São Francisco Bragança Paulista – SP, p. 8-39, 2001.

LINDHOLM, J.; JOHANSSON, M.; FORNSTEDT, T. Guidelines for analytical method development and validation of biotechnological synthesis of drugs production of a hydroxyprogesterone as model. **Journal of Chromatography B**, v. 791, p. 323-336, 2003.

LÓPEZ, J.A.; MARTINEZ, V.; ALONSO, R.M.; JIMENEZ, R.M. High-Performance liquid chromatography with amperometric detection applied to the screening of 1,4-dihydropyridines in human plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p. 105-114, 2000.

MARCHETTI, C.; AMICO, C.; USAI, C. Functional characterization of the effect of nimodipine on the calcium current in rat cerebellar granule cells. **Journal of Neurophysiology**, v. 73, 1169-1180, 1995.

MEDELE, R.J.; SCHMID-ELSAESSER, R.; STEIGER, H.J. Therapy of subarachnoid hemorrhage. First aid already on site. **MMW Fortschr Med**. v. 142, p. 29-31, 2000.

MEI, H.; HSIEH, Y.; NARDO, C.; XU, X.; WANG, S.; KORFMACHER, K. NG, W.A. Rapid commun. **Mass Spectrom.**, v. 17; p. 97-103, 2003.

MERCURI, N.B.; BINCI, A.; CALABRESI, P.; *et al.* Effects of dihydropyridine calcium antagonists on rat midbrain dopaminergic neurones. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, p. 831-838, 1994.

MEYER H, WEHINGER E, BOSSERK F, SCHERLINGH D. Nimodipine: synthesis and metabolic pathway. **Arzneimittel – Forshubg**, v. 33, p. 106-112, 1993.

MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. Ensaio clínico de medicamentos no Brasil. **Fármacos & Medicamentos**, v.06, p. 36-40, 2000.

MÜCK, W.M.; BODE, H. Bioanalytics of nimodipine-an overview of methods. **Pharmazie**, v. 49, p. 130-139, 1994.

MÜCK, W.M. Enantiospecific determination of nimodipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 712, p. 45-53, 1995.

MULLER-SCHWEINITZER, E.; NEUMANN, P. In vitro effects of calcium antagonists PN200-110, nifedipine, and nimodipine on human and canine cerebral arteries. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 3, p. 354-361, 1983.

NEWBERG, L.A.; STEEN, P.A.; MILDE, J.H.; GISVOLD, S.E.; LANIER, W.L. Effects of nimodipine on cerebral blood flow and neurologic function following complete global ischemia in dogs and primates. In: **First International Nimotop Symposium Schattauer Verlag**. Stuttgart, 1984.

PANCORBO, S. A.; CAMPAGNA, K. D.; DAVEMPORT, J. K., Task Force Report of Competency Statements for Pharmacy Practice, **Am. J. Pharm.**, Ed. 51:196-206, 1987.

QIAN, M.; GALLO, J.M. High-performance liquid chromatography determination of the calcium channel blocker nimodipine in monkey plasma. **Journal of Chromatography**, v. 578, p. 316-320, 1992.

QIU, F.; CHEN, X.; LI, X.; ZHONG, D. Determination of nimodipine in human plasma by a sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **Journal of Chromatography B**, v. 802, p. 291-297, 2004.

QURESHI, A.L.; SUAREZ, J.L.; BHARDWAJ, A.; YAHIA, A.M.; TAMARGO, R.J.; ULATOWSKI, J.A. Early predictors of outcome in patients receiving hypervolemic and hypertensive therapy for symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. **Crit. Care Med.**, v. 28; p. 824-829, 2000.

RÄMSCH, K.; GRAEFE, K.H.; SCHERLING, D.; SOMMER, J.; ZIEGLER, R. Pharmacokinetics and metabolism of calcium-blocking agents nimodipine, nitrendipine and nimodipine. **American Journal of Nephrology**, v. 6, p. 73-80, 1986.

RINKEL, G.J.; FEIGIN, V.L.; ALGRA, A.; VERMEULEN, M.; VAN GIJN, J. Calcium antagonists for aneurismal subarachnoid haemorrhage. **Cochrane database Syst. Rev.**, v. 2000, CD000277, 2002.

ROOS, Y.B.; LEVI, M.; CARROLL, T.A.; BEENEN, L.F.; VERMEULEN, M. Nimodipine increases fibrinolytic activity in patients with aneurismal subarachnoid hemorrhage. **Stroke**, v. 32; 1860-1862, 2001.

ROSSEEL, M.T.; BOGAERT, M.G.; HUYGHENS, L. Determination of calcium antagonist nimodipine in plasma by capillary gas chromatography and nitrogen detection. **Journal of Chromatography**, v. 533, p. 224-228, 1990.

SALEM, I.I.; IDREES, J.; AL TAMIMI, J.I. Determination of loratadine in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34; p. 141-151, 2004.

SANTILLAN, R.; HURLÉ, M.A.; ARMIJO, J.A.; DE LOS MOZOS, R.; FLÓREZ, J. Nimodipine-enhanced opiate analgesia in cancer patients requiring morphine dose escalation: a double-blind, placebo-controlled study. **Pain**, v. 76; p. 17-26, 1998.

SANTILLAN, R.; MAESTRE, J. M.; HURLÉ, M.A.; FLÓREZ, J. Enhancement of opiate analgesia by nimodipine in cancer patients chronically treated with morphine: a preliminary report. **Pain**, v. 58; p. 129-132, 1994.

SARFATI, Y.; SPADONE, C.; VANELLE, J.M.; LÔO, H. Calcium antagonists and lithium in preventive treatment of manic-depressive disorder. **Encephale**, v. 22; p. 149-153, 1996.

SATACHURA, K.; DANILEWICZ, B. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Current possibilities of prevention and treatment. **Przegl. Lek.** V. 59; p. 46-8, 2002.

SCHMIDT, J.; SANTILLAN, G.G.; SAEED, M.; DALMIERI, D.; BING, P.J. The effect of nimodipine, a calcium antagonist on intracortical arterioles in the cat brain. **Current Therapeutic Research**, v. 38, p. 94-103, 1985.

SCHINDLER, I.; WEINDLMAYR-GOETTEL, M.; SUSANI, M.; STEINBEREITHNER, K. Effects of nimodipine on regional blood flow in heart and brain during cardiopulmonary resuscitation in pigs. **Anesthesia and Analgesia**, v. 78, p. 87-93, 1994.

SCRIABINE, A.; BATTYE, R.; HOFFMEISTER, F.; *et al.* Nimodipine New Drugs Annual: **Cardiovascular Drugs**, v. 3, p.197-218, 1985.

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

SIUZDAK, G.; HOLLENBECK, T.; BOTHNER, B. Preparative Mass Spectrometry with Electropray Ionization. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 34, p. 1087-1088, 1999.

SOARES, AKAS. Biodisponibilidade comparativa de três formulações de captopril **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Ceará - CE, p. 107, 2002.

SOBRADO, M.; LÓPEZ, M.G.; CARCELLER, F.; GARCÍA, A.G.; RODA, J.M. Combined nimodipine and citicoline reduced infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 118; p. 107-113, 2003.

SPIPKER, B. in Raven Press (Editor), **Guide to clinical trials**, United States of America 1991, p. XX-XXIV.

STANGE, K.; LAGERKRANSER, M.; SOLLEVI, A. Nimodipine does not affect the cerebral autoregulatory response in the anesthetized pig. **Journal of Neurosurgical Anesthesiology**, v. 6, p. 116-121, 1994.

STRIESSNIG, J.; ZERNIG, G.; GLOSSMANN, H. Human red-blood cell Ca^{2+} antagonist binding sites. Evidence for an unusual receptor coupled to the nucleoside transport. **European Journal of Biochemistry**, v. 150, p. 67-77, 1985.

SUWELACK, D.; WEBER, H. Assessment of enterohepatic circulation of radioactivity following a single dose of ^{14}C nimodipine in the rat. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetic**, v. 10, p. 231-239, 1985.

SVETYI, L.I.; KURKOVA, K.S.; Comparative clinic-pharmacological characteristics of nimodipine, nifedipine and foridon in the treatment of patients with ischemic stroke in late rehabilitative and residual periods. **Klin. Med. (Mosk)**. v. 80; p. 47-51, 2002.

TANAKA, K.; GOTOH, F.; MURAMATSU F.; *et al.* Effects of nimodipine (BAYe9736) on cerebral circulation in cats. **Arzneimittel-Forschung**, v. 30, p. 1494-1497, 1980.

TETTENBORN, D.; DYCKA, J.; VOLBERG, E.; DUDDEN, P. Blood pressure and heart rate during treatment with nimodipine in patients with subarachnoid hemorrhage. **Neurochirurgia**, v. 28, p. 84-86, 1985.

TITUS, F.; The treatment of migraine. **Rev. Neurol.** v. 25; p. 295-300, 1997.

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

TOWART, R.; KAZDA, S. The cellular mechanism of action of nimodipine (BAYe9736), a new calcium antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 67, p. 409-410, 1979.

TOWART, R.; KAZDA, S. Effects of calcium antagonist nimodipine on isolated cerebral vessels. In: Betz *et al* (eds) **Nimodipine: pharmacological and clinical proprieties**. Schattauer Verlag, Stuttgart, p. 147-161, 1985.

TOWART, R. The selective inhibition of serotonin-induced contractions of rabbit cerebral vascular smooth muscle by calcium antagonist dihydropyridines. **Circulation Research**, v. 48, p. 650-657, 1981.

TOWART, R.; PERZBORN, E. Nimodipine inhibits carbocyclic-induced contractions of cerebral arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 69, p. 213-215, 1981.

TOWART, R. Predilective relaxation by the calcium antagonist nimodipine (BAYe9736) of cerebral blood vessels, contracted with autologous blood. **British Journal of Pharmacology**, v. 74, p. 268-269, 1981.

VESTAL, M.L. Methods of Ion Generation. *Chemistry Review*, v. 101, p. 361-375, 2001

YAN, X.F.; DING, D.Y.; LIU, R.J. Studies on the bioavailability and pharmacokinetics of nimodipine tablet in human body. **Yao Xue Xue Bao**, v. 28, p.45-49, 1993.

GLOSSÁRIO

GLOSSÁRIO

Fármaco - é a substância química de constituição definida que pode ter aplicação em Farmácia, seja como preventivo, seja como curativo, seja como agente de diagnóstico; a ser aceita esta definição, a matéria prima mineral, vegetal ou animal da qual se podem extrair uma ou mais bases medicamentosas não é fármaco, pois sua constituição química não é necessariamente conhecida.

Índice de Massa Corpórea (IMC) - é a razão do peso (Kg) pela altura (m) ao quadrado. É o melhor indicador de obesidade, pois enfatiza a adiposidade relativa dos indivíduos e minimiza os efeitos da altura..

Medicamento - produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É uma forma farmacêutica terminada que contém o fármaco, geralmente em associação com adjuvantes farmacotécnicos.

Área sob a Curva da Concentração Plasmática *versus* Tempo (ASC) - relaciona-se com a quantidade ou a extensão de absorção da droga pode ser calculado pelo método trapezoidal e expresso em unidades de concentração vezes tempo.

Área sob a Curva do Tempo Zero ao Tempo T (ASC_{0-t}) - relaciona-se com a quantidade da droga absorvida do tempo zero ao tempo t, onde t é a última coleta determinada experimentalmente.

Área sob a Curva da Concentração Plasmática *versus* Tempo, de Zero ao Infinito ($ASC_{0-\infty}$) - relaciona-se com a quantidade ou a extensão de absorção da droga. A quantidade da absorção sistêmica da droga é diretamente relacionada com ASC que é geralmente calculado pelo método trapezoidal e expresso em unidades de concentração vezes tempo.

Concentração Máxima Atingida no Plasma (C_{max}) - concentração mais elevada da droga atingida na circulação sangüínea após administração de um fármaco. Relaciona-se a intensidade da resposta farmacológica. O C_{max} ideal deve estar dentro da janela terapêutica.

Meia Vida de Eliminação da Droga ($t_{1/2}$) - representa o tempo em que a concentração da droga no plasma é reduzida à metade. Calcula-se através do logaritmo neperiano (\ln) de 2 ($\ln 2 = 0,693$) dividido pela constante de eliminação. $t_{1/2} = \ln 2 / K$.

Tempo correspondente à Concentração Máxima Atingida no Plasma (T_{max}) - tempo correspondente para que o fármaco atinja a concentração máxima (C_{max}).

Amostra - termo geral que abrange: controles, brancos, amostras processadas e desconhecidas.

Amostra branco – amostra de uma matriz biológica na qual nenhum analito foi adicionado, utilizada para avaliar a especificidade do método bioanalítico.

Amostra de Controle de Qualidade (CQ) – amostra da matriz biológica adicionada do analito, usada para monitorar o desempenho de um método bioanalítico e para avaliar a integridade e validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas numa corrida individual.

Amostra processada – extrato final (anterior à análise instrumental) de uma amostra que foi submetida a várias manipulações (ex: diluição, extração, concentração).

Amostra desconhecida – amostra biológica que é objeto de análise.

Analito – composto químico específico a ser mensurado, podendo ser o fármaco não transformado, biomolécula ou seu derivado, metabólito ou produto de degradação em uma matriz biológica.

Matriz biológica – material distinto de origem biológica, que pode ser amostrado e processado de modo reprodutível.

Corrida analítica (ou lote) – conjunto completo de amostras em estudo, com um número apropriado de padrões e CQs para sua validação e que tem sua análise completa nas mesmas condições.

Método – descrição compreensível de todos os procedimentos usados em análises de amostras.

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

Exatidão – representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência.

Linearidade – corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame (analito).

Precisão – representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio.

Recuperação – eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados com os resultados analíticos de soluções padrão na extraídas.

Reprodutibilidade - precisão entre dois laboratórios. Também representa a precisão do método sob as mesmas condições operacionais, num curto período de tempo.

Estabilidade – parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo.

Limite inferior de quantificação (LIQ) – menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis.

Limite superior de quantificação (LSQ) - maior quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis.

Faixa de quantificação – corresponde a uma faixa de concentração, incluindo o LSQ e o LIQ, que pode ser confiável e reprodutivamente quantificada com exatidão e precisão, por meio da relação concentração-resposta.

Padrão de calibração – matriz biológica a qual foi adicionada uma quantidade conhecida de analito. Os padrões de calibração são usados para construir a curva de calibração, com a qual são determinadas as concentrações do analito nos CQs e nas amostras desconhecidas em estudo.

Padrão interno (PI) – composto, geralmente com características estruturais ao analito, adicionado aos padrões de calibração e amostras em concentrações conhecidas e constantes, para facilitar a determinação do analito.

Validação total – estabelecimento de todos os parâmetros de validação de um método bioanalítico, aplicáveis à análise das amostras.

ANEXOS

ANEXO I

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 179/2003

Fortaleza, 05 de junho de 2003

Protocolo COMEPE nº 87/03

Deptº./Serviço: Unidade de Farmacologia Clínica/UFC

Título do Projeto: “Estudo de biodisponibilidade de uma formulação de Nimodipina comprimido de 30mg da EMS Indústria Farmacêutica Ltda versus uma formulação de Nimodipina comprimido de 30mg do produto de Referência da Bayer S. A. (Nimotop[®]) em voluntários sadios”

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o protocolo clínico, a ficha clínica e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto supracitado na reunião do dia 29 de maio de 2003.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta de Mirian Parente Monteiro.

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/HUWC/UFC

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de Biodisponibilidade Comparativa de uma Formulação de Nimodipino comprimido de 30 mg da EMS Indústria Farmacêutica Ltda. (formulação teste) versus uma Formulação de Nimodipino comprimido de 30 mg do Produto de Referência da Bayer S.A (Nimotop[®]) em Voluntários Sadios de ambos os Sexos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG nº _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade de dos Médicos/Pesquisadores Profa Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes, Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes, Prof. Fernando Antonio Frota Bezerra, do Farmacêutico Demétrius Fernandes do Nascimento e da Enfermeira Ismenia Osório Leite da Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) da Universidade Federal do Ceará. O abaixo-assinado está ciente que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar se um comprimido de Nimodipino (30 mg) produzido pela EMS Indústria Farmacêutica Ltda. - *Formulação Teste* - atinge níveis no sangue equivalentes ao Nimotop[®] da Bayer S.A.- *Formulação Referência*. Você receberá as duas medicações, cada uma em uma ocasião diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá a um sorteio.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

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

Durante o estudo, você será internado duas vezes por aproximadamente 36 horas cada período, com intervalo mínimo de 5 dias. Em cada internamento, a) será colhida uma amostra de sangue para dosagem de creatinina, hemoglobina, hematócrito, transaminases e colesterol total; b) será administrado um comprimido de Nimodipino (30 mg), acompanhado de 240 mL de água sem gás; c) serão coletadas 19 amostras de sangue de 9 mL, cada, através de agulha introduzida em veia superficial para a dosagem do medicamento e mais uma amostra de 20 mL antes da administração da medicação para o controle do método de dosagem do medicamento no sangue. d) em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura; e) serão também servidas refeições padronizadas [ceia, na noite da internação (se não interferir com o jejum); café da manhã, almoço, lanche da tarde, jantar e ceia no dia de administração do medicamento; café da manhã no dia de alta] ou bebidas em horários preestabelecidos. Após a coleta de 24 horas você receberá alta da Unidade de Farmacologia Clínica, devendo retornar para coleta de 36 e 48 horas após a administração da medicação, em cada internação. Um total de 370 mL de sangue será colhido durante todo o estudo.

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

RESPONSABILIDADES

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

É ainda de sua responsabilidade em relação a sua participação no ensaio clínico: a) comparecer às internações na data e horários informados; b) permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos 12 horas) em cada internação; c) tomar toda a medicação prevista; d) Ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; e) retornar à Unidade de Farmacologia Clínica 2 vezes em cada internação para a coleta da amostra de sangue após a alta de cada uma das internações, no horário indicado pela equipe, relativo à coleta de 36h e 48 horas após a medicação; f) retornar à Unidade de Farmacologia Clínica na data, horário e local combinados, para realização da consulta e exames de alta, independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A administração pela boca de Nimodipino de maneira continuada pode causar reações como: Dor de cabeça, dor muscular, tontura, diarreia, náuseas, fadiga, pressão baixa, constipação, dor nas juntas, avermelhamento da pele e aumento da frequência cardíaca. Entretanto o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração de dose única de Nimodipino tem menor probabilidade de aparecer. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

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

BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES

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

INTERCORRÊNCIAS (efeitos indesejáveis)

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

Durante o período de 90 dias a partir da data da assinatura deste termo, o voluntário estará assegurado (Seguro de Vida em Grupo).

RESSARCIMENTO

De acordo com valores previamente estabelecidos (até R\$ 300,00), os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo despendidos na realização do supracitado estudo clínico após a consulta de alta. Caso desista ou seja dispensado antes do estudo ser finalizado o voluntário receberá proporcionalmente ao tempo despendido, no final do estudo. Entende também que a desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

Estima-se que durante o período de sua participação no Estudo vocês terão como despesa apenas os gastos de deslocamento da residência ou trabalho até à Unidade de Farmacologia Clínica para internação e consultas, bem como coletas de amostras após a alta;

ou ao Laboratório de Análises Clínicas para a realização dos exames. Ainda deve ser previsto eventuais visitas posteriores para acompanhamento dos eventos adversos. O ressarcimento destas despesas já está incluído no valor estabelecido no item acima.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

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

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

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

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

A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade de Farmacologia Clínica.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará, ou autoridades do(s) órgão(s) governamentais envolvido(s) na fiscalização e acompanhamento do estudo terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem no entanto violar a condição de que tais informações são confidenciais. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está também autorizando tal acesso, mesmo se você se retirar do Estudo.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar a Unidade de Farmacologia Clínica (Fone 288-8250) e solicitar que a mesma contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os mesmos nos telefones indicados no final deste *Termo de Consentimento*.

Poderá contactar a Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário.

Poderá contactar a Secretaria do Comitê em Pesquisa do complexo hospitalar da UFC, fone 288 8338, para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

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

Eu declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após, tive nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo o também sobre o Estudo e recebi explicações que responderam

por completo minhas dúvidas e reafirmo estar livre e espontaneamente decidindo participar do Estudo.

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

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido estou autorizando o acesso às minhas informações, conforme explicitado anteriormente.

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

Fortaleza, ____/____/____

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

CONTROLE INTERNO N° do Estudo: ____/____ N° do Voluntário: _____

TELEFONES PARA CONTATO

UNIDADE DE FARMACOLOGIA CLÍNICA	(85) 288-8250
Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes	(85) 288 8346
Dr. Manoel Odorico de Moraes	(85) 288 8201
Dr. Fernando Antonio Frota Bezerra	(85) 288 8346
Demétrius Fernandes do Nascimento	(85) 288 8250
Ismenia Osório Leite	(85) 2888250

ANEXO III

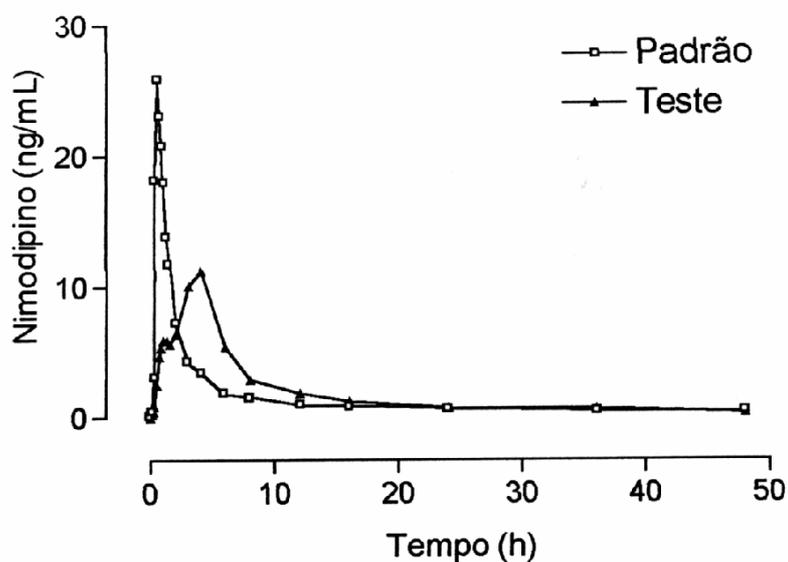
Tabela de Randomização Nimodipino 30 mg

Nº Vol		1º Fase		2º Fase
1		Nimodipino		Nimotop®
2		Nimotop®		Nimodipino
3		Nimodipino		Nimotop®
4		Nimotop®		Nimodipino
5		Nimodipino		Nimotop®
6		Nimotop®		Nimodipino
7		Nimotop®		Nimodipino
8		Nimodipino		Nimotop®
9		Nimotop®		Nimodipino
10		Nimodipino		Nimotop®
11		Nimodipino		Nimotop®
12		Nimotop®		Nimodipino
13		Nimotop®		Nimodipino
14		Nimodipino		Nimotop®
15		Nimotop®		Nimodipino
16		Nimodipino		Nimotop®
17		Nimotop®		Nimodipino
18		Nimotop®		Nimodipino
19		Nimodipino		Nimotop®
20		Nimodipino		Nimotop®
21		Nimotop®		Nimodipino
22		Nimodipino		Nimotop®
23		Nimotop®		Nimodipino
24		Nimodipino		Nimotop®

ANEXO IV

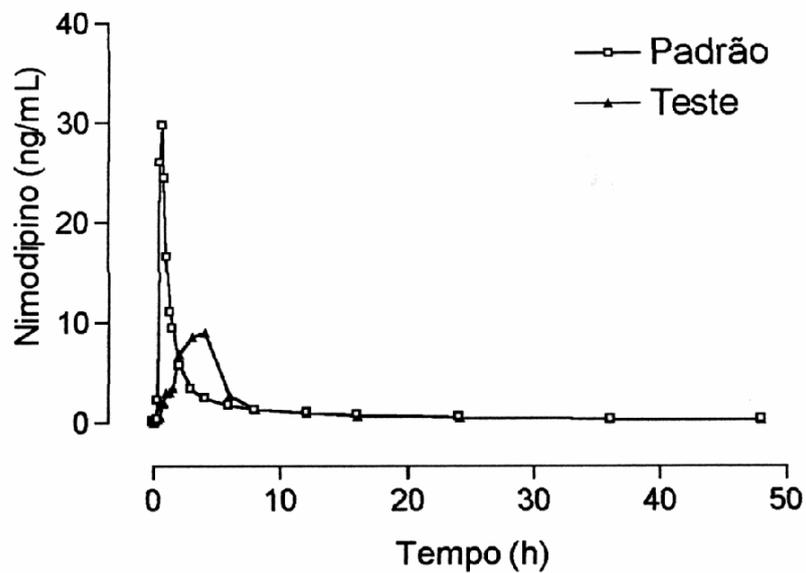
Gráficos das Curvas de concentração versus tempo e parâmetros farmacocinéticos individuais

VOLUNTÁRIO 1



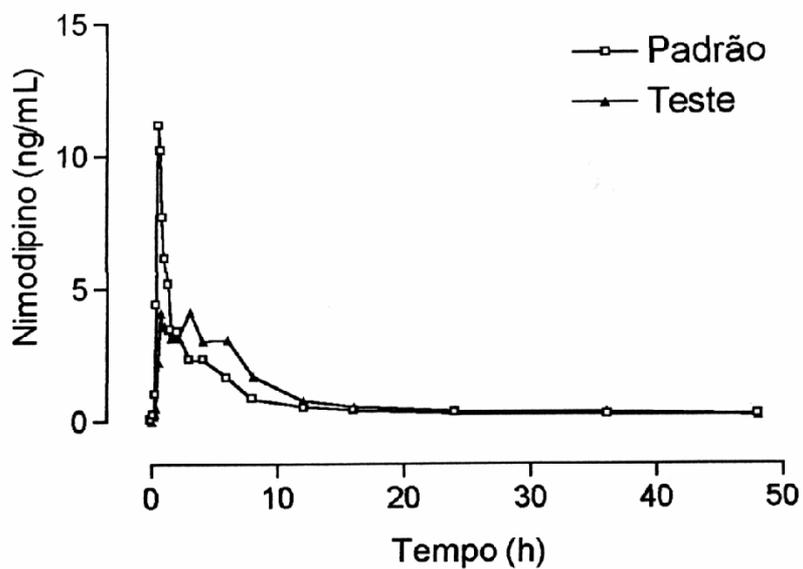
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 1	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,5	4
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	25,73	11,2
$t_{1/2}$ (h)	33,87	16,08
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	72,72	88,46
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	92,75	95,89

VOLUNTÁRIO 2



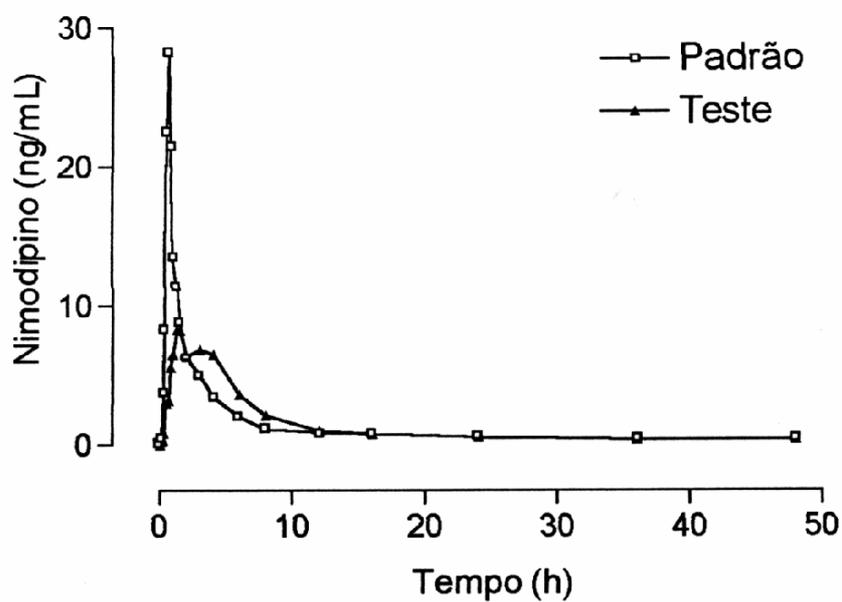
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 2	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,66	4
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	29,67	8,98
$t_{1/2}$ (h)	25,38	29,23
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	61,73	58,1
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	71,61	71,17

VOLUNTÁRIO 3



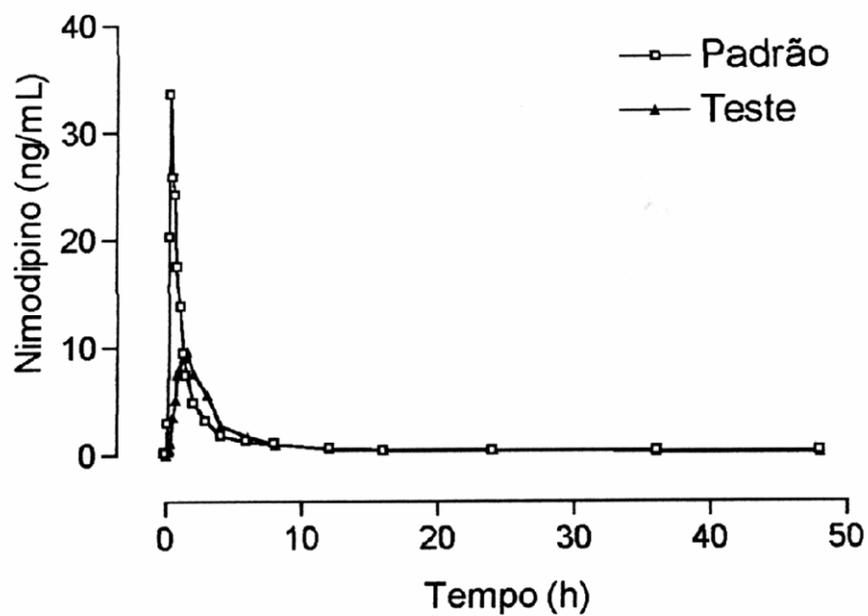
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 3	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,5	3
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	11,2	4,11
$t_{1/2}$ (h)	60,22	21,19
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	34,66	41,11
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	53,77	47,22

VOLUNTÁRIO 4



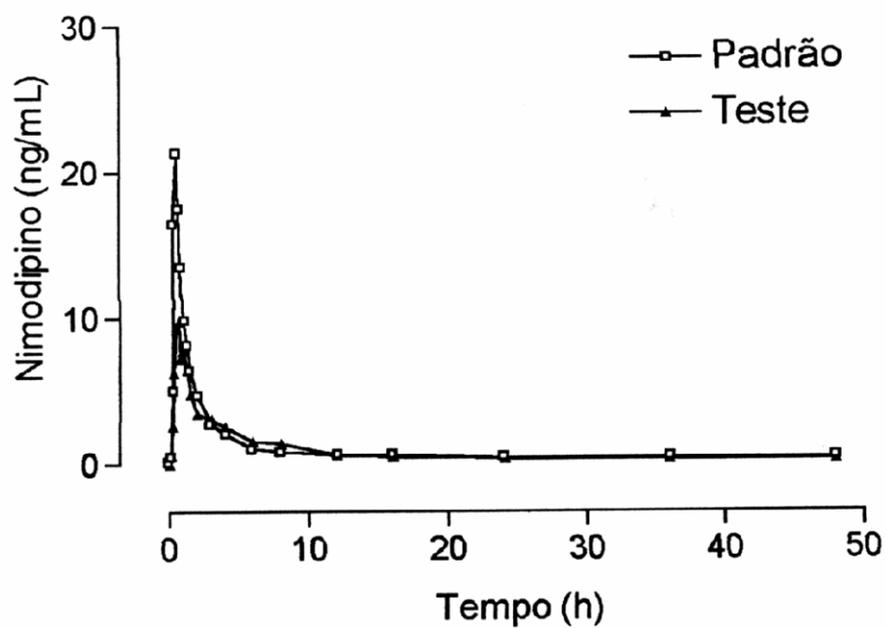
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 4	Formulação	
	Referência	Teste
T_{\max} (h)	0,66	1,25
C_{\max} (ng*mL ⁻¹)	28,2	8,29
$t_{1/2}$ (h)	26,27	26,93
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	64,69	64,03
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	79,85	79,58

VOLUNTÁRIO 5



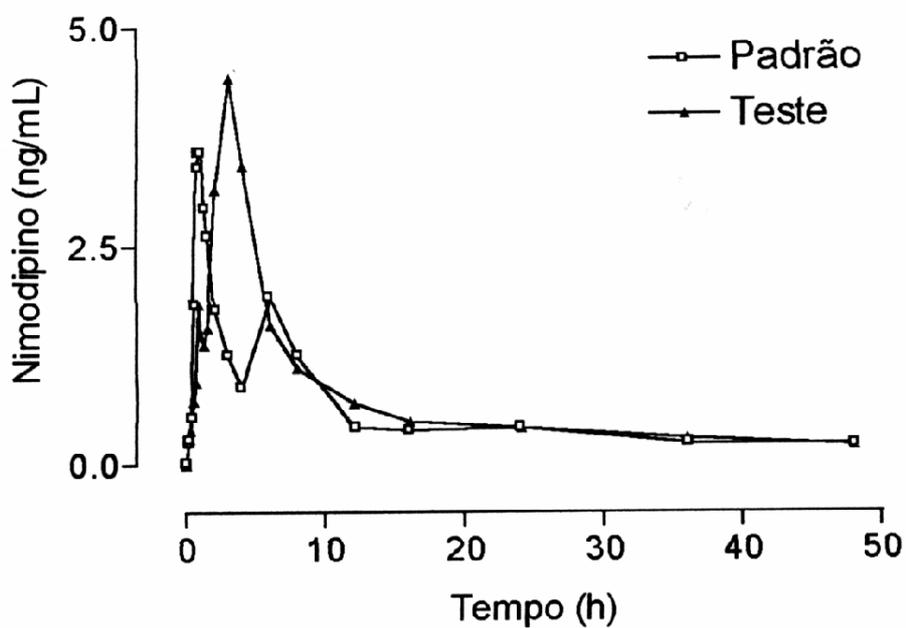
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 5	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,32	1,5
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	33,56	9,6
$t_{1/2}$ (h)	71,5	29,15
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	54,33	46,86
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	86,31	57,37

VOLUNTÁRIO 6



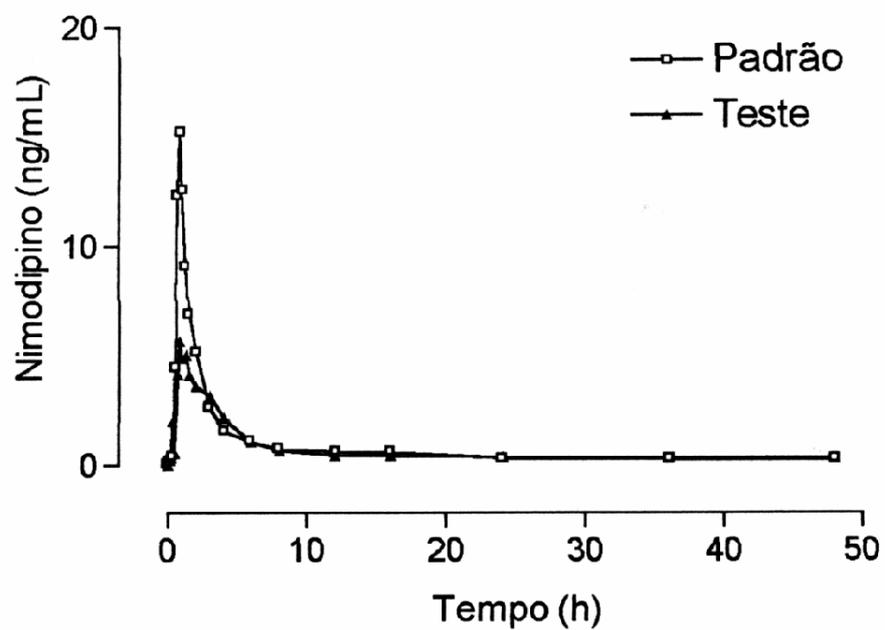
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 6	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,5	0,66
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	21,21	9,76
$t_{1/2}$ (h)	34,71	43,84
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	48,58	41,46
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	69,61	57,9

VOLUNTÁRIO 7



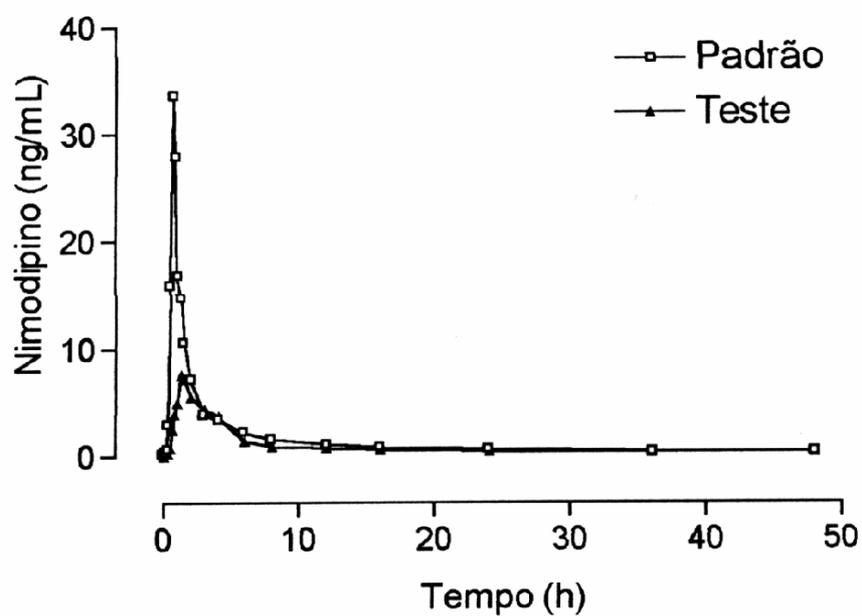
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 7	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,83	3
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	3,57	4,42
$t_{1/2}$ (h)	35,8	24
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	27,49	34,7
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	39,37	41,97

VOLUNTÁRIO 8



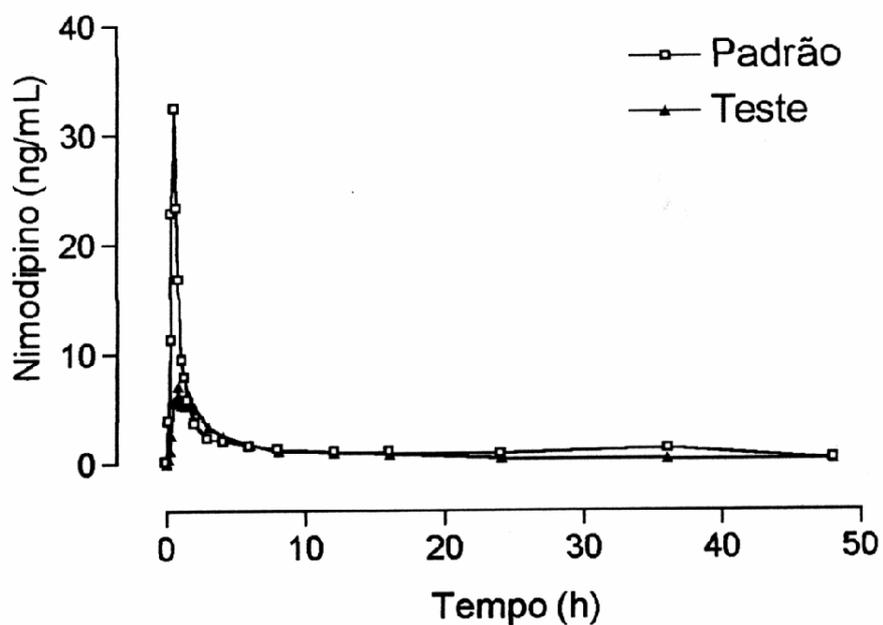
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 8	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,83	0,83
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	15,23	5,65
$t_{1/2}$ (h)	64,1	65,36
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	40,74	32,81
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	65,71	62,98

VOLUNTÁRIO 9



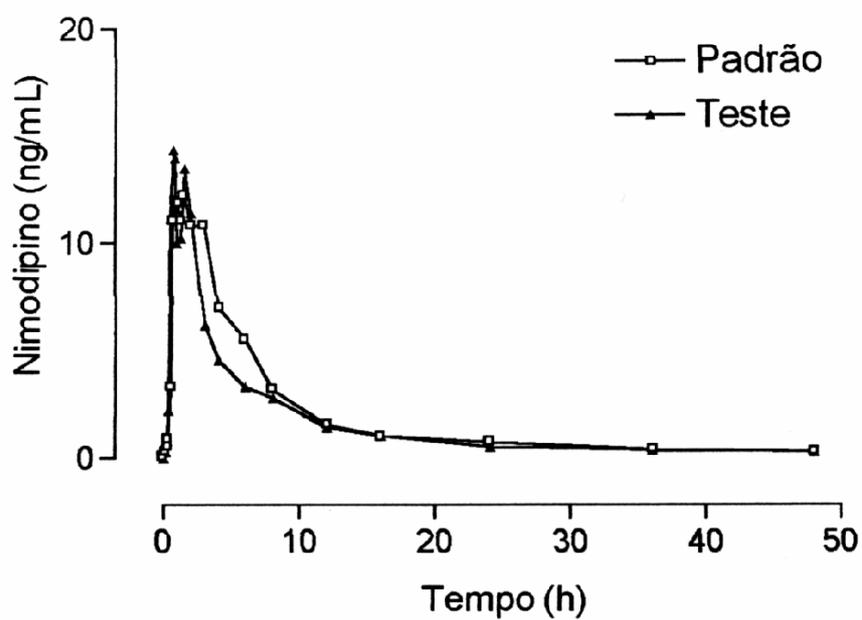
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 9	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,66	1,25
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	33,47	7,55
$t_{1/2}$ (h)	25,31	29,88
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	70,45	42,43
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	83,23	57,09

VOLUNTÁRIO 10



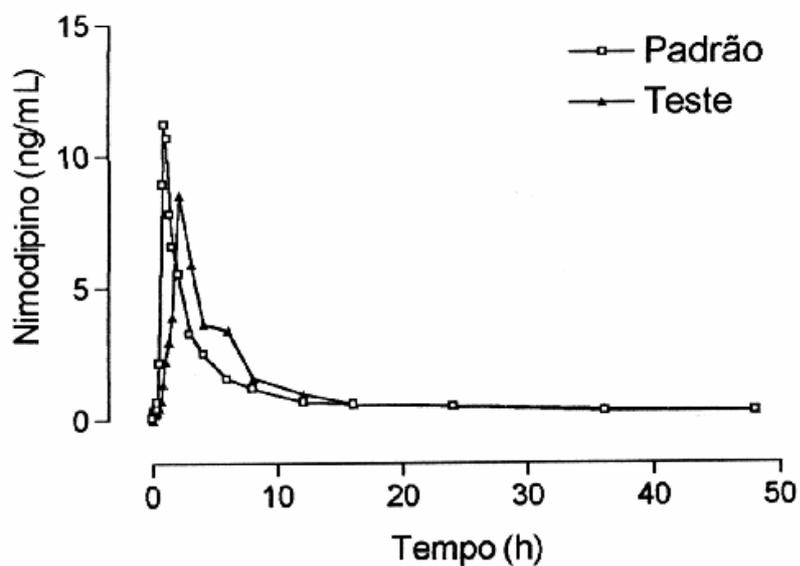
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 10	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,5	0,83
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	32,33	7,02
$t_{1/2}$ (h)	19,21	39,97
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	71,79	45,2
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	80,1	63,08

VOLUNTÁRIO 11



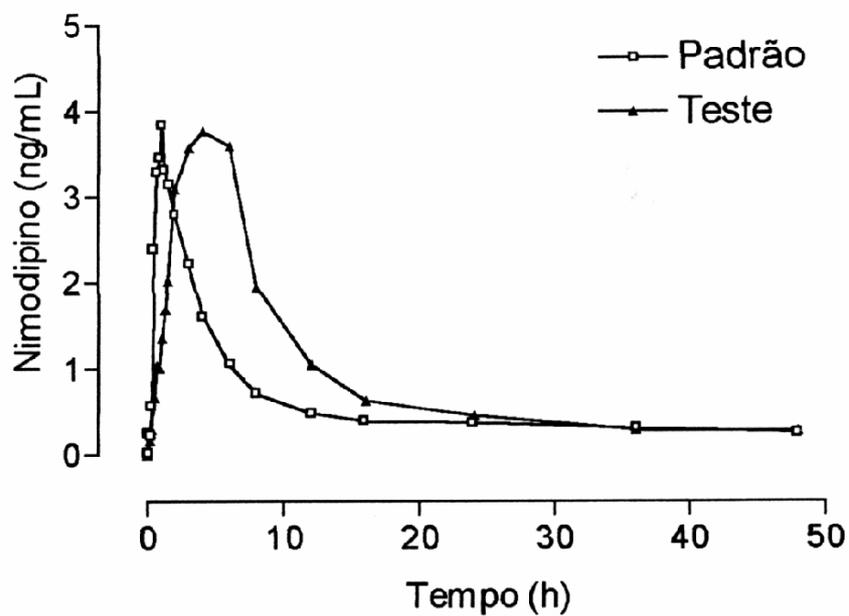
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 11	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	1,5	0,66
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	12,18	14,35
$t_{1/2}$ (h)	16,34	32,57
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	89,66	74,92
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	96,26	89,02

VOLUNTÁRIO 12



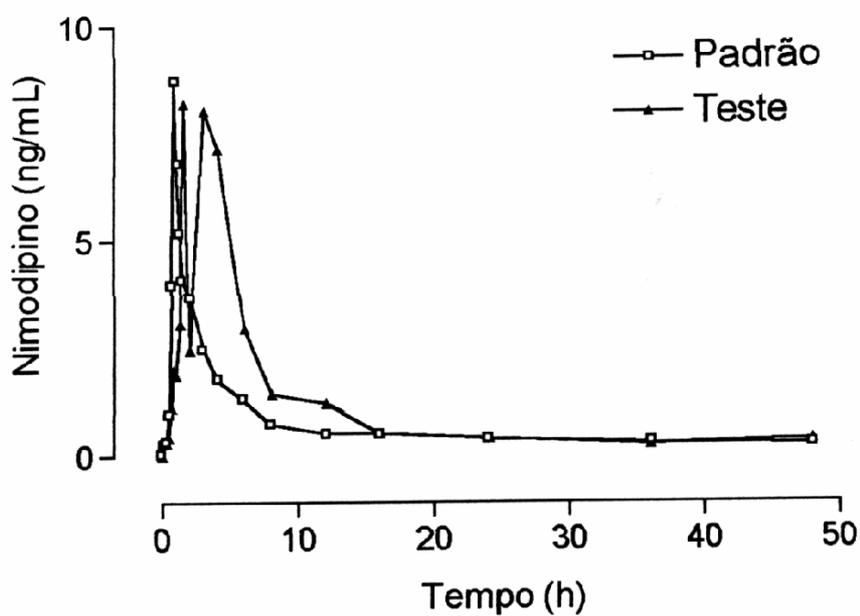
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 12	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,83	2
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	11,2	8,54
$t_{1/2}$ (h)	31,05	41,12
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	44,07	51,21
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	57,96	71,38

VOLUNTÁRIO 13



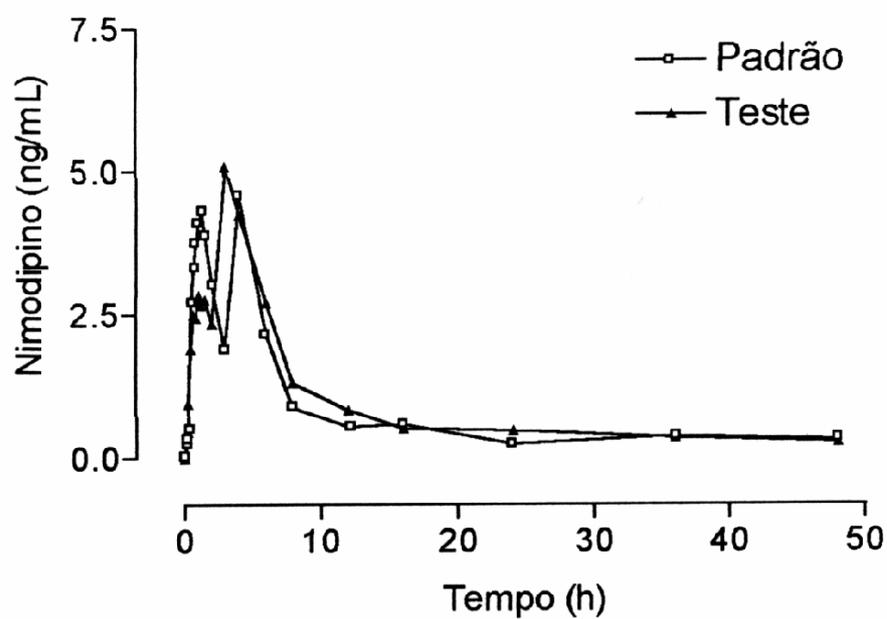
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 13	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	1	4
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	3,83	3,77
$t_{1/2}$ (h)	47,15	26,62
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	28,51	43,65
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	46,19	54,41

VOLUNTÁRIO 14



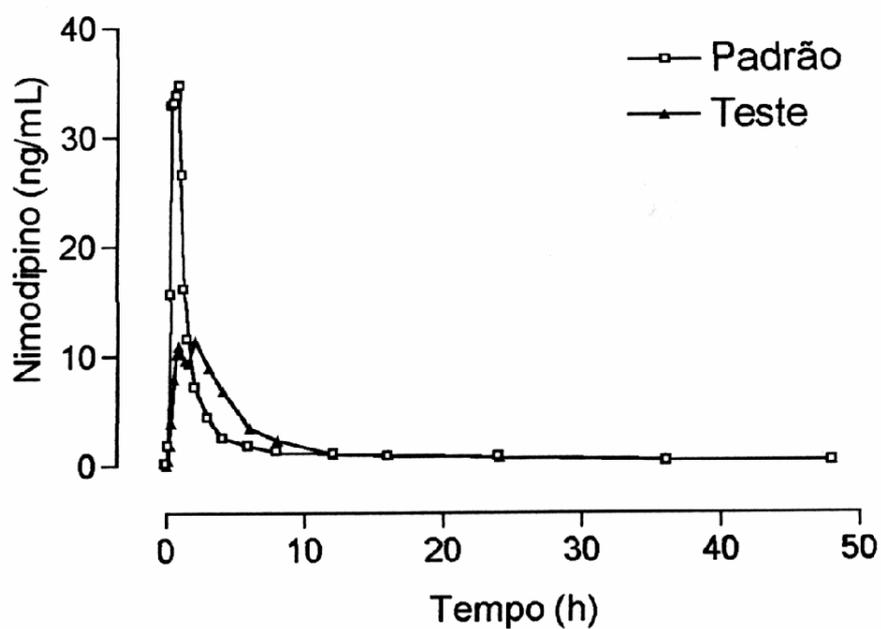
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 14	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,83	1,5
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	8,74	8,2
$t_{1/2}$ (h)	43,84	9,78
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	33,23	51,09
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	49,67	56,31

VOLUNTÁRIO 15



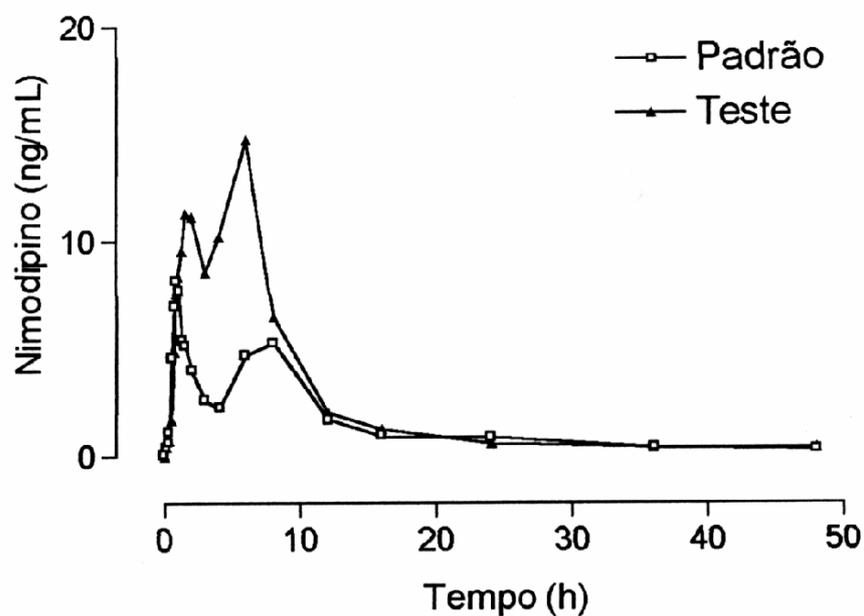
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 15	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	4	3
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	4,57	5,09
$t_{1/2}$ (h)	14,55	30,01
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	36,79	42,68
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	43,3	54,37

VOLUNTÁRIO 16



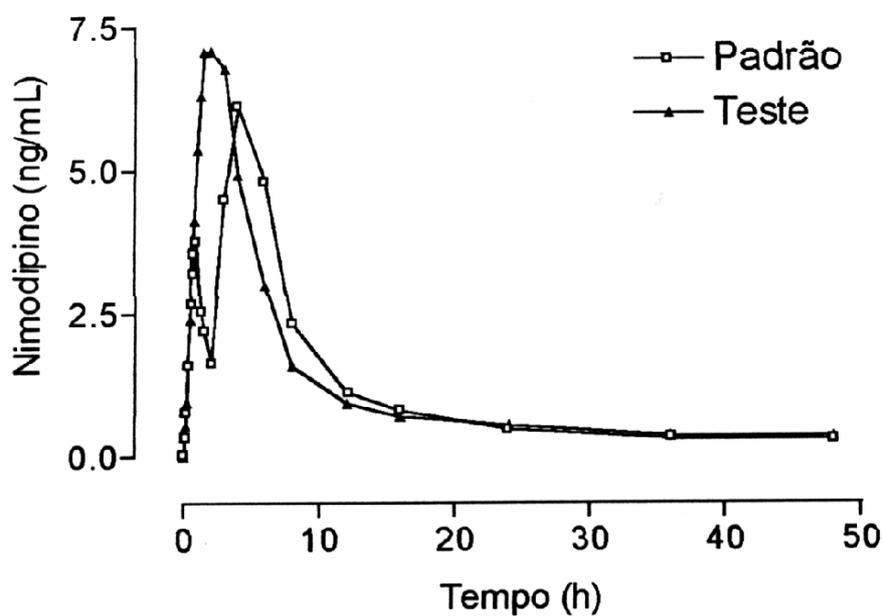
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 16	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,83	2
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	34,62	11,39
$t_{1/2}$ (h)	26,32	30,44
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	81,51	80,39
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	97,84	101,04

VOLUNTÁRIO 17



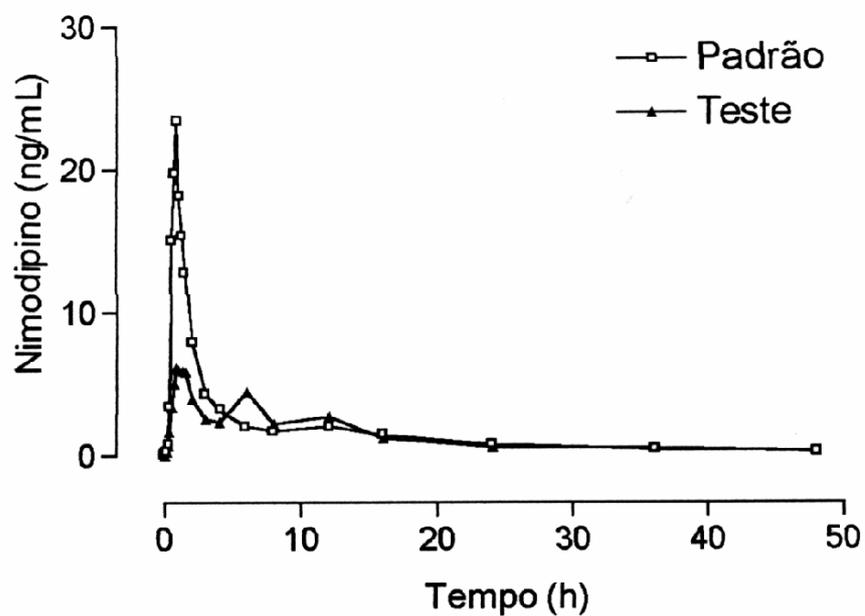
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 17	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,83	6
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	8,15	14,75
$t_{1/2}$ (h)	18,18	15,47
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	68,81	117,52
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	76,94	126,22

VOLUNTÁRIO 18



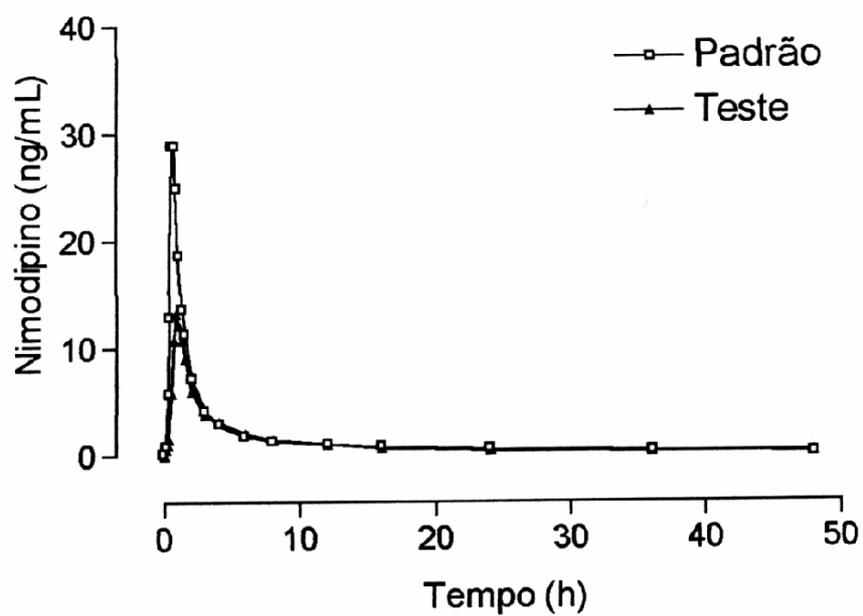
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 18	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	4	2
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	6,11	7,09
$t_{1/2}$ (h)	18,42	25,76
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	54,26	56,72
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	61,96	69,73

VOLUNTÁRIO 19



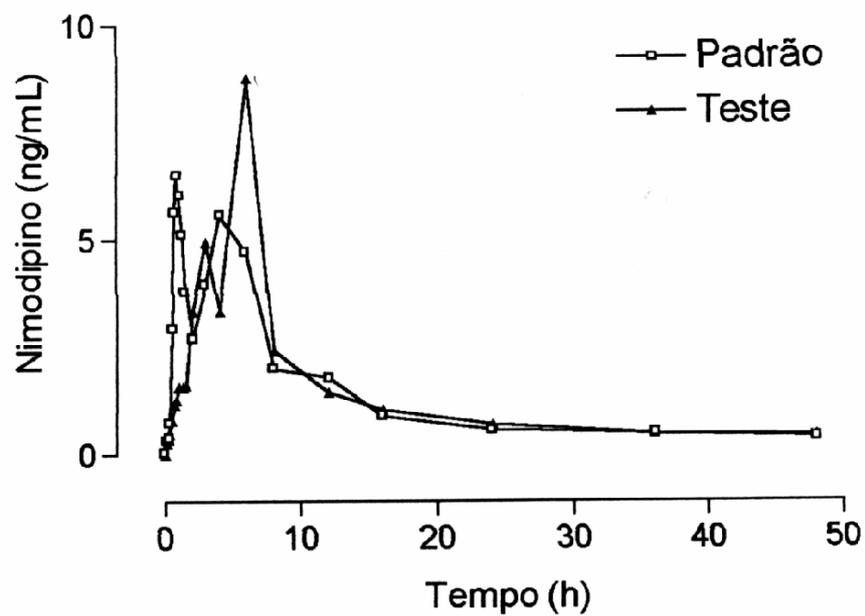
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 19	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,83	0,83
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	23,35	6,1
$t_{1/2}$ (h)	14,52	10,64
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	77,2	62,98
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	84,11	67,13

VOLUNTÁRIO 20



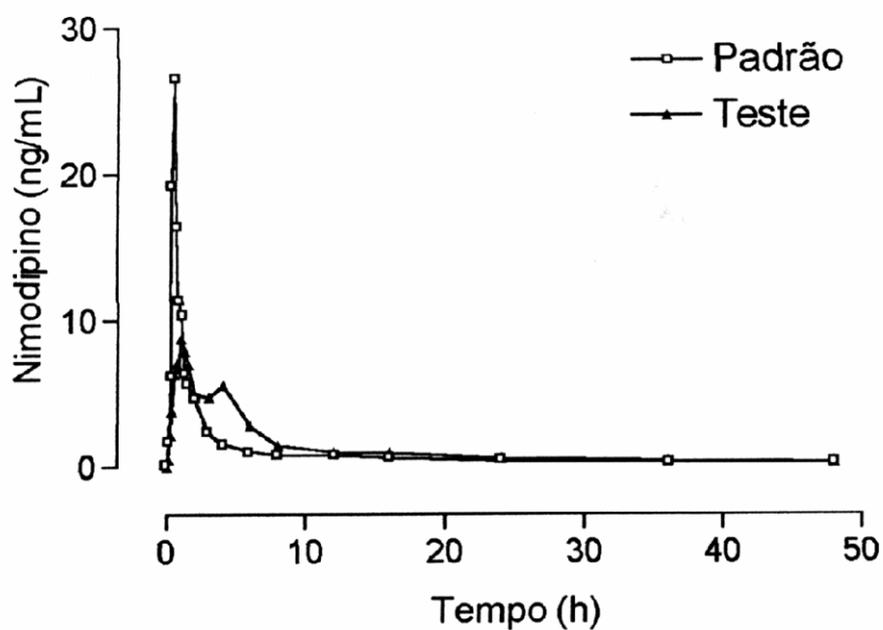
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 20	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,5	0,83
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	28,85	13,22
$t_{1/2}$ (h)	23,31	38,78
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	67,34	52,73
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	75,41	68,4

VOLUNTÁRIO 21



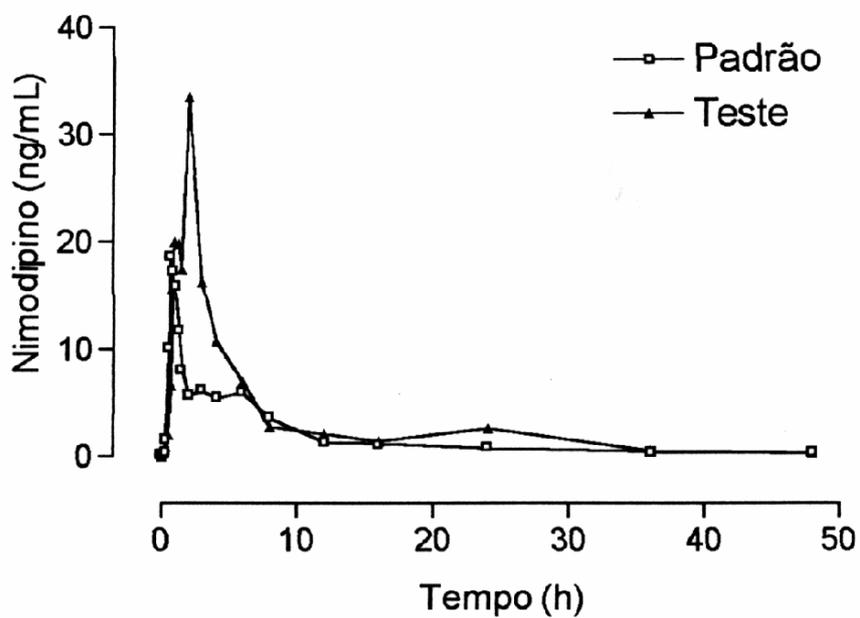
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 21	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,83	6
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	6,54	8,78
$t_{1/2}$ (h)	44,77	21,78
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	62,03	65,02
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	87,87	79,15

VOLUNTÁRIO 22



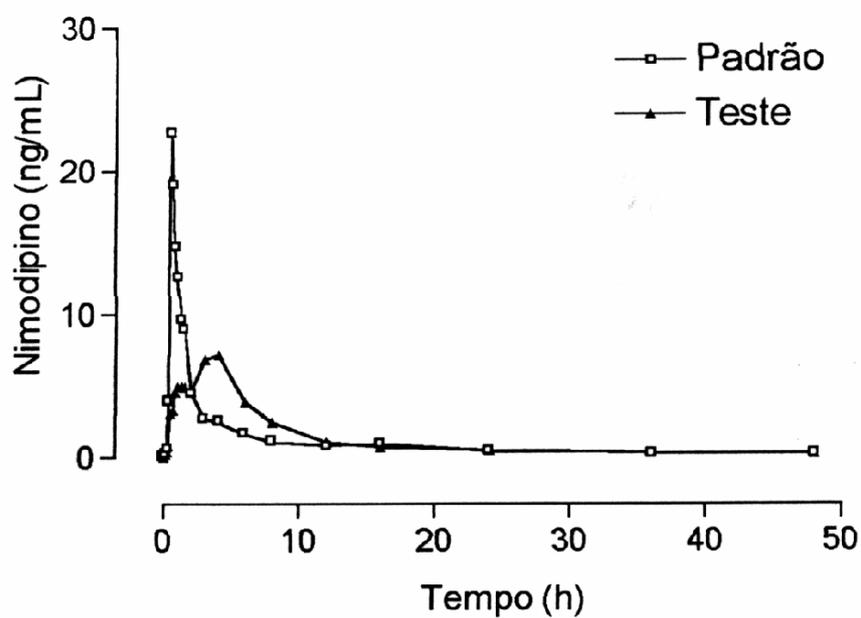
Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 22	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,5	1
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	26,56	8,78
$t_{1/2}$ (h)	42,33	24,67
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	46,49	57,72
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	62,97	67,32

VOLUNTÁRIO 23



Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 23	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,66	2
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	18,7	33,51
$t_{1/2}$ (h)	19,31	7,5
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	83,45	144,11
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	91,81	147,15

VOLUNTÁRIO 24



Parâmetros Farmacocinéticos Voluntário 24	Formulação	
	Referência	Teste
T_{max} (h)	0,5	4
C_{max} (ng*mL ⁻¹)	22,74	7,15
$t_{1/2}$ (h)	30,33	27,13
ASC_{0-48h} (ng*h*mL ⁻¹)	52,83	60,27
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h*mL ⁻¹)	64,2	70,44

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)