Paula Rocha Chellini

BOAS PRÁTICAS ESTATÍSTICAS EM ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA COM DELINEAMENTO CROSSOVER 2X2

Belo Horizonte – MG

JUNHO/2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Paula Rocha Chellini

BOAS PRÁTICAS ESTATÍSTICAS EM ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA COM DELINEAMENTO CROSSOVER 2X2

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

Orientadora: Profa. Arminda Lucia Siqueira

Mestrado em Estatística
Departamento de Estatística
Instituto de Ciências Exatas
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

JUNHO/2007

Agradecimentos

A Deus.
A meus pais por me darem totais condições de estudar e me dedicar,
aos meus familiares pelo incentivo e suporte.
A minha orientadora Arminda por acreditar no meu trabalho, na minha vontade de aprender e
pela paciência e ajuda nos momentos de dificuldades.
Ao Daniel pelo apoio, carinho e compreensão nesses últimos tempos.
Aos meus amigos pela força nos momentos difíceis e pelas risadas,
em especial aos membros do quarteto fantástico que me ajudaram tanto nessa caminhada.
E a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho e não foram mencionados.

Resumo

Estudos de bioequivalência são exigidos para a liberação de medicamentos genéricos para o mercado. Freqüentemente o delineamento *crossover* 2 x 2 é utilizado com a administração a voluntários sadios de duas formulações (T = teste e R = referência). Seguindo um cronograma previamente estabelecido, são coletadas amostras de sangue e determinadas as concentrações do fármaco para gerar as seguintes medidas farmacocinéticas: área sob a curva de concentração plasmática versus tempo (ASC), o pico de concentração plasmática ($Cmax$) e o tempo no qual a concentração máxima foi alcançada ($Tmax$). Para declarar que dois medicamentos são bioequivalentes os intervalos de 90% de confiança para a razão ou diferença das médias tanto para ASC quanto para $Cmax$ devem estar totalmente dentro do intervalo de bioequivalência. Há exigência em termos de $Tmax$ somente quando este for clinicamente relevante. A equipe estatística tem um papel importante em estudos de bioequivalência, tanto no planejamento como na análise dos dados, seguindo uma metodologia específica. No planejamento destacam-se a determinação do cronograma de coleta e o cálculo do número de voluntários. Na prática aparecem vários problemas, tais como a violação de pressupostos dos métodos estatísticos, além da ocorrência de não-conformidades. Outro questionamento recorrente é se as regras vigentes dos órgãos reguladores são realmente razoáveis, se podem ser flexibilizadas ou devem ser adaptadas em certas circunstâncias. Nesse trabalho, várias situações com incidentes que podem ou não ser evitados, foram abordadas através de estudos de simulação de Monte Carlo visando aprofundar o conhecimento sobre o planejamento e a análise dos dados. Foram realizados dois tipos de estudos: no primeiro foi gerada a medida farmacocinética diretamente e no segundo a curva de concentração individual. Alguns fatores podem prejudicar a conclusão de bioequivalência, tais como, a utilização de um número de voluntários menor que o necessário e a ocorrência de observações atípicas. Em geral, o coeficiente de variação de $Cmax$ tente a ser maior que o de ASC e os percentuais de conclusões de bioequivalência para $Cmax$ não são superiores aos percentuais para ASC. Um aspecto fundamental do planejamento é o cronograma de coleta. Não existe um cronograma padrão, mas a recomendação é que as características das medidas farmacocinéticas devem ser consideradas. Uma opção interessante é simular possíveis cronogramas e juntamente com as informações sobre o fármaco elaborar o cronograma de coleta. Se os fármacos são realmente bioquivalentes e o estudo for bem conduzido, espera-se que o resultado seja favorável. Entretanto, na prática não se pode ignorar dois possíveis erros: (i) apesar de haver bioequivalência entre T e R, a conclusão é de não bioequivalência; (ii) T e R não são bioequivalentes, mas a conclusão é pela bioequivalência. O primeiro erro é relacionado ao patrocinador e o segundo ao paciente. Como o compromisso de um centro de bioequivalência, e em particular da equipe estatística, é com a verdade e não com interesses do patrocinador do estudo, torna-se fundamental a observância das boas práticas estatísticas, objeto deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras p. v

Lista de Tabelas p. vi

Lista de Abreviatura/Notação p. viii

1 Introdução p. 1

1.1 Conceitos fundamentais . . . . . p. 3

1.2 Consolidação e utilização de informações publicadas . . . . . p. 6

1.3 Objetivo . . . . . p. 8

1.4 Tópicos do trabalho . . . . . p. 9

2 Referencial teórico p. 10

2.1 Modelo e inferência estatística . . . . . p. 10

2.2 Critérios para declarar bioequivalência . . . . . p. 15

2.3 Análise de variância . . . . . p. 16

2.4 Regras de decisão . . . . . p. 18

2.5 Escala original versus escala logarítmica . . . . . p. 19

2.6 Intervalo de bioequivalência: (θ_I, θ_S) . . . . . p. 23

2.6.1 Medidas farmacocinéticas sem transformação . . . . . p. 23

2.6.2 Medidas farmacocinéticas com transformação logarítmica . . . . . p. 24

2.7 Determinação do poder e do número de voluntários . . . . . p. 25

2.8 Identificação e tratamento de não-conformidades . . . . . p. 28

2.8.1 Cronograma de coleta . . . . . p. 28

2.8.2 Dados faltantes . . . . . p. 29

2.8.3 Observações atípicas (*Outliers*) . . . . . p. 31

2.9 Exemplos . . . . . p. 36

3 Estudos de simulações p. 40

3.1 Simulação da medida farmacocinética . . . . . p. 41

3.1.1 Conclusão de bioequivalência . . . . . p. 42

3.1.2 Presença de observações atípicas . . . . . p. 47

3.1.3 Incerteza da estimativa da variabilidade . . . . . p. 49

3.2 Simulação da curva de concentração individual . . . . . p. 54

3.2.1 Conclusão de bioequivalência . . . . . p. 55

3.2.2 Cronograma de coleta . . . . . p. 60

4 Discussão e considerações finais p. 66

Referências p. 69

Anexo p. 71

Lista de Figuras

1.1 Seqüência e interação dos processos e transferência de dados . . . . . p. 3

1.2 Curva de concentração plasmática de um fármaco . . . . . p. 4

1.3 Esquema de um delineamento *crossover* 2 x 2 . . . . . p. 5

2.1 CV versus CV_* . . . . . p. 21

2.2 Área sob a curva de concentração plasmática dos 24 voluntários para cada uma das formulações . . . . . p. 33

2.3 Box-plot das ASC dos medicamentos referência (ASC_R) e teste (ASC_T) e da diferença (Dif_ASC) entre essas áreas . . . . . p. 33

3.1 Número total ($2n$) de voluntários em função do coeficiente de variação . . . . . p. 51

3.2 Poder do teste de bioequivalência em função de CV ($2n = 24$) . . . . . p. 51

3.3 Percentual de conclusão de bioequivalência em função do coeficiente de variação p. 52

3.4 Percentuais de conclusão de bioequivalência de acordo com o número de coletas ($t_{17} = 16h$) . . . . . p. 61

3.5 Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC de acordo com o número de coletas ($t_{16} = 24h$) . . . . . p. 61

3.6 Percentuais de conclusão de bioequivalência de acordo com o número de coletas ($t_{20} = 48h$) . . . . . p. 62

3.7 Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC de acordo com o número de coletas ($t_{17} = 96h$) . . . . . p. 63

3.8 Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC de acordo com o número de coletas ($t_{18} = 120h$) . . . . . p. 63

Lista de Tabelas

1.1 Distribuição dos 21 estudos brasileiros, 5 de outros países americanos, 25 asiáticos e 16 europeus, segundo o número de voluntários e o período de *washout* . p. 7

2.1 Modelo e valores esperados para o delineamento *crossover* 2 x 2 . . . . . p. 11

2.2 Resumo dos dados para o delineamento *crossover* 2 x 2 . . . . . p. 11

2.3 Análise de variância para o delineamento *crossover* 2 x 2 . . . . . p. 18

2.4 Limites de bioequivalência para a medida farmacocinética nas escalas original e logarítmica . . . . . p. 25

2.5 Resultados do exemplo de um estudo de bioequivalência . . . . . p. 27

2.6 Escalonamento de coletores . . . . . p. 29

2.7 Valores dos parâmetros considerados no estudo de simulação de Donner *et al.* (2005) . . . . . p. 30

2.8 Exemplo 1: Análise de variância para ASC . . . . . p. 36

2.9 Exemplo 2: Análise de variância com efeito de seqüência para $Cmax$ . . . . . p. 37

2.10 Exemplo 3: Análise de variância com efeito de período para ASC . . . . . p. 37

2.11 Exemplo 4: Conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ . . . . . p. 38

2.12 Exemplo 4: Conclusão de bioequivalência para $Tmax$ . . . . . p. 38

2.13 Exemplo 5: Conclusão de bioequivalência apenas para ASC . . . . . p. 39

2.14 Exemplo 6: Conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ . . . . . p. 39

2.15 Exemplo 6: Conclusão de não-bioequivalência para $Tmax$ . . . . . p. 39

3.1 Percentuais de conclusão de bioequivalência e dos efeitos residual (Er), da formulação (Ef) e de período (Ep) . . . . . p. 43

3.2 Percentuais de conclusão de bioequivalência (BE) e da presença do efeito de período (Ep) . . . . . p. 44

3.3 Percentuais de conclusão de bioequivalência (BE) e da presença do efeito da formulação (Ef) . . . . . p. 44

3.4 Percentuais de conclusão de bioequivalência (BE) e na presença ou ausência de efeito da formulação (Ef) para $F = 0,00$ . . . . . p. 45

3.5 Percentuais de conclusão de bioequivalência (BE) para vários valores de σ_{e*} . . p. 46

3.6 Percentuais de conclusão de bioequivalência (BE) e da presença do efeito da formulação (Ef) para situações de alta variabilidade inter-individual (σ_{e*}) . . . p. 46

3.7 Percentuais de conclusão de bioequivalência no estudo da presença de *outliers* utilizando o critério do *box-plot* . . . . . p. 47

3.8 Percentuais de conclusão de bioequivalência no estudo da presença de *outliers* utilizando o critério sugerido por Ramsay e Elkum (2005) . . . . . p. 48

3.9 Diferença entre o tamanho de amostra total ($2n$) calculado quando o valor de CV é mal especificado e o valor correto . . . . . p. 50

3.10 Percentuais de bioequivalência quando o valor de CV é mal especificado . . . . p. 53

3.11 Percentuais de bioequivalência e dos efeitos residual (Ef), da formulação (Ef) e de período (Ep) para $\theta_\gamma = 0,00, 0,05, 0,10$ . . . . . p. 54

3.12 Parâmetros considerados na simulação para a constante de eliminação (K_e) e constante de absorção (K_a) . . . . . p. 56

3.13 Percentuais de conclusão de bioequivalência para $Cmax$, para ASC e para as duas medidas simultaneamente . . . . . p. 57

3.14 Estatísticas descritivas para $ASC(ng/ml \cdot h)$ e $Cmax(ng/ml)$ para as formulações R e T . . . . . p. 58

3.15 Percentuais de conclusão de bioequivalência para as situações em que somente $Cmax$ ou ASC são bioequivalentes . . . . . p. 59

3.16 Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ de acordo com o número de coletas ($t_{17} = 16h$) . . . . . p. 60

3.17 Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ de acordo com o número de coletas ($t_{16} = 24h$) . . . . . p. 62

3.18 Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ de acordo com o número de coletas ($t_{20} = 48h$) . . . . . p. 64

3.19 Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ de acordo com o número de coletas ($t_{17} = 96h$) . . . . . p. 65

3.20 Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ de acordo com o número de coletas ($t_{18} = 120h$) . . . . . p. 65

Lista de Abreviatura/Notação

$2n$ - Número total de voluntários recrutados

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC - Área sob a curva de concentração plasmática

BE - Bioequivalência

CL - *Clearance* - Depuração do fármaco

$Cmax$ - Pico de concentração plasmática

CV - Coeficiente de variação

CV_d - Coeficiente de variação intra-individual

CV_* - Coeficiente de variação na escala logarítmica

D - Dose

DOU - Diário Oficial da União

e_{ijk} - Erro aleatório

ED - Distância das estimativas

Ef - Efeito da formulação

emv - Estimadores de máxima verossimilhança

Ep - Efeito de período

Er - Efeito residual

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

F_a - Fração do fármaco absorvida

F_R - Efeito da formulação referência

F_T - Efeito da formulação teste

GL - Graus de liberdade

h - Hora

K_a - Constante de absorção

K_e - Constante de eliminação

LD - Distância da verossimilhança

ml - Mililitro

ng - Nanograma

P_1 - Efeito do primeiro período

P_2 - Efeito do segundo período

P_j - Efeito fixo do j-ésimo período

QM - Quadrado médio

R - Medicamento Referência

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

R_R - Efeito residual do medicamento referência

R_T - Efeito residual do medicamento teste

RT - Seqüência: Referência Teste

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

SQ - Soma dos quadrados

T - Teste

$Tmax$ - Tempo para atingir $Cmax$

TR - Seqüência: Teste referência

θ_I - Limite inferior de bioequivalência

θ_S - Limite superior de bioequivalência

θ_γ - Diferença das médias dos medicamentos teste e referência

Vd - Volume de distribuição aparente

σ_e^2 - Variância intra-individual

σ_s^2 - Variância inter-individual

Y_{ijk} - Variável resposta

1 Introdução

Quando a patente de um medicamento de referência é extinta, outros laboratórios farmacêuticos que desejam produzir e comercializar este medicamento precisam da aprovação de um órgão fiscalizador. A legislação brasileira estabelece que, para um medicamento ser registrado como genérico, é necessário que se comprove sua equivalência farmacêutica e bioequivalência em relação ao medicamento de referência indicado pela ANVISA (RDC Nº 135, 2003).

A equivalência farmacêutica entre dois medicamentos relaciona-se à comprovação de que ambos contêm o mesmo fármaco (mesma base, sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa), na mesma dosagem e forma farmacêutica, o que pode ser avaliado por meio de testes *in vitro*.

Além dos estudos *in vitro* são necessários também estudos de biodisponibilidade e de bioequivalência que comprovem a eficácia e a segurança do medicamento. A biodisponibilidade de um fármaco é a quantidade e velocidade a qual o princípio ativo é absorvido e se torna disponível no seu sítio de ação.

O medicamento referência é, geralmente, o inovador cuja a biodisponibilidade foi determinada, durante o desenvolvimento do produto, e que teve sua eficácia e segurança comprovadas por meio de ensaios clínicos, antes da obtenção do registro junto ao órgão federal para comercialização. A empresa que desenvolveu a formulação e a forma farmacêutica adequada à via de administração e ao objetivo terapêutico do medicamento, estabelecendo e validando os processos de fabricação, bem como as especificações que deverão ser reproduzidas posteriormente, lote a lote (STORPIRTIS *et al.*, 2004). Em geral, o medicamento inovador é considerado medicamento de referência, entretanto, na sua ausência, a ANVISA indicará o medicamento de referência.

Para produzir o medicamento genérico, o laboratório tem que investir no desenvolvimento farmacotécnico do produto, e esse deve cumprir as mesmas especificações *in vitro*, em relação ao medicamento referência. Contudo, a formulação e o processo de fabricação não precisam ser idênticos, isso se deve aos diferentes equipamentos e fornecedores de matérias-primas empregados por cada laboratório, desde que essas diferenças não comprometam a biodisponibilidade entre os medicamentos.

O estudo de bioequivalência compara a biodisponibilidade de dois ou mais produtos. Dois produtos são considerados bioequivalentes quando estes forem equivalentes farmacêuticos e, ao serem administrados, na mesma dose molar e nas mesmas condições experimentais, apresentam diferenças em relação à biodisponibilidade dentro dos limites pré-especificados. O teste de bioequivalência *in vivo* é realizado em voluntários sadios.

A fim de comprovar a biodisponibilidade de um medicamento em relação ao produto de referência, deverá ser elaborado um protocolo de pesquisa contendo a descrição da pesquisa em seus aspectos fundamentais, informações relativas ao sujeito da pesquisa, à qualificação dos pesquisadores e todas as instâncias responsáveis. O protocolo clínico é o documento que descreve os objetivos, delineamento, metodologia, considerações estatísticas, e organização de um estudo clínico. O protocolo também contém o histórico para o estudo clínico e sua justificativa.

Existem três etapas no estudo de bioequivalência clínica, analítica e estatística. Na etapa clínica o projeto de pesquisa, o protocolo experimental e o termo de consentimento livre e esclarecido devem ser submetidos a um comitê de ética em Pesquisa. Em seguida, selecionam-se voluntários sadios através de exames clínicos e laboratoriais, com idades entre 18 e 50 anos e capazes de fornecer seu consentimento livre e esclarecido. Os indivíduos são, então, internados e seguem uma dieta padronizada. Os medicamentos são administrados (dependendo do medicamento pode ser em jejum ou pós prandial) e, de tempo em tempo, são coletadas amostras sanguíneas ou de urina. Vale ressaltar que o volume de distribuição de determinado fármaco pode variar em função da idade, sexo, doença e composição orgânica de cada pessoa. Nesse sentido, são extremamente importantes os critérios de inclusão dos voluntários no estudo, para que se possa obter características o mais homogêneas possíveis, evitando que características fisiológicas dos indivíduos interfiram nos resultados.

Na etapa seguinte, analítica, é mensurada a concentração do fármaco nas amostras coletadas na etapa anterior.

A etapa estatística começa, na realidade, antes do início do estudo, com o cálculo de número de voluntários para o fármaco em questão e a elaboração da lista de aleatorização, além de, em conjunto com a clínica, estabelecer o cronograma de coleta das amostras. Também faz parte da etapa estatística a aleatorização dos voluntários, a análise das medidas farmacocinéticas e a comparação das biodisponibilidades do medicamento referência com o medicamento que está sendo testado.

O papel de cada etapa é ilustrado na Figura 1.1.

No Brasil, o órgão fiscalizador é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que através de resoluções publicadas no Diário Oficial da União (DOU) regulamenta os requisitos mínimos para um estudo de bioequivalência. A ANVISA publicou em 2002 o "Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência" contendo informações sobre as três etapas.

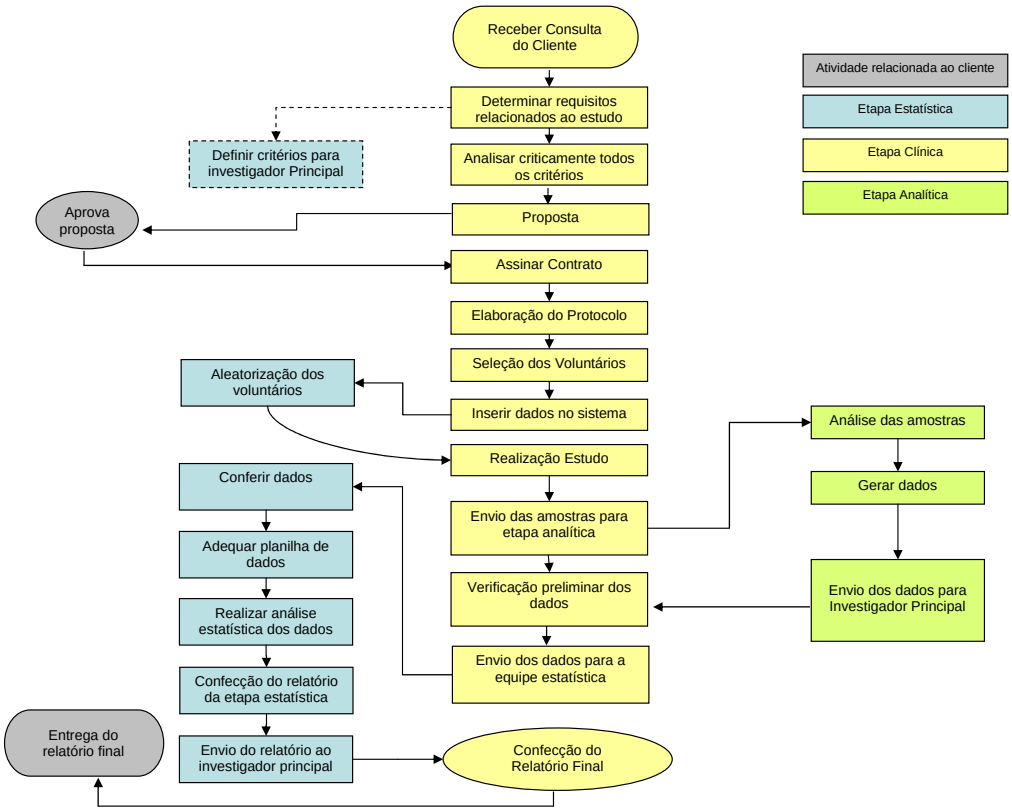


Figura 1.1: Seqüência e interação dos processos e transferência de dados

A equipe estatística participa de um estudo de bioequivalência desde a elaboração do protocolo, com a determinação do tamanho da amostra, auxílio na definição do cronograma de coleta e aleatorização dos voluntários, até a confecção do relatório final. Esse documento contem a análise de dados e o laudo sobre a bioequivalência dos fármacos estudados.

1.1 Conceitos fundamentais

As medidas farmacocinéticas são obtidas a partir das curvas de concentração sangüínea do medicamento versus tempo e conforme a Resolução RE Nº 1170 (ANVISA, 2006) para cada voluntário, as seguintes medidas farmacocinéticas devem ser calculadas:

- $Cmax$: pico de concentração máxima do fármaco e/ou metabólito, obtido diretamente, sem interpolação dos dados, isto é, a maior concentração observada;
- $Tmax$: tempo necessário para se atingir $Cmax$, obtido diretamente, sem interpolação dos dados, isto é, o instante em que ocorreu tal concentração;

- ASC_{0-t}: área sob a curva de concentração plasmática do medicamento desde o instante inicial até o tempo final de observação (última concentração quantificável), obtida através do método dos trapezóides, disponível por exemplo no *software* Equivtest ®, versão 2.0;

- $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva de concentração plasmática do medicamento desde o instante inicial até o tempo relativo à completa eliminação do fármaco. É calculada como $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + C_t/K_e$, sendo C_t a última concentração quantificável e K_e a constante de eliminação. A estimativa de K_e é obtida pelo o coeficiente angular da reta de regressão ajustada utilizando-se as últimas concentrações transformadas em escala logarítmica e multiplicada por $-2,303$;

- $t_{1/2}$: meia vida de eliminação do fármaco, é o tempo que o organismo leva para eliminar 50% do fármaco, calculada como $ln2/K_e$, sendo K_e definido acima.

Para a avaliação da bioequivalência, as principais medidas farmacocinéticas são a área sob a curva de concentração plasmática versus tempo (ASC), o pico de concentração plasmática ($Cmax$) e o tempo no qual a concentração máxima foi alcançada ($Tmax$). ASC e $Cmax$ são utilizados para avaliar respectivamente a extensão e a taxa de absorção do fármaco.

A Figura 1.2 ilustra essas principais medidas farmacocinéticas.

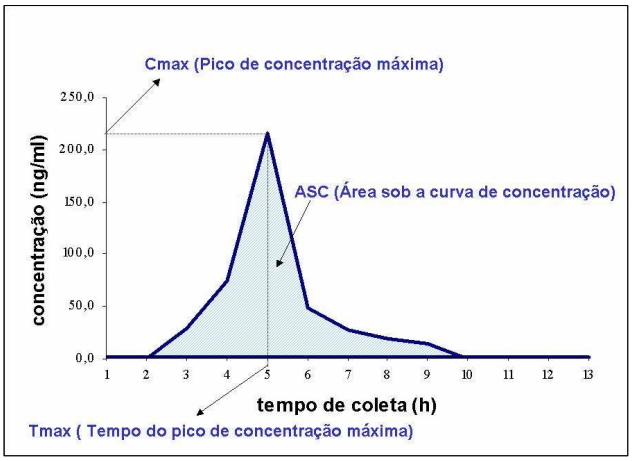


Figura 1.2: Curva de concentração plasmática de um fármaco

O delineamento de estudos de bioequivalência pode ser de forma paralela ou *crossover*, sendo que este último é mais comum. No delineamento paralelo a alocação é totalmente aleatória e cada indivíduo recebe apenas uma formulação do fármaco. No esquema mais simples tem-se apenas dois grupos, cada grupo recebe uma formulação diferente do fármaco e então os grupos serão comparados.

No *crossover* cada indivíduo recebe mais de uma formulação de um mesmo fármaco em ocasiões (denominadas períodos) diferentes, o que define uma determinada seqüência de formulações. Em cada seqüência, todos os indivíduos recebem todas as formulações a serem testadas, modificando apenas a ordem de administração. Em algumas situações, tal como estudos com medicamento que tenha meia vida longa, pode ser preferível usar o delineamento paralelo para evitar desistências.

O *crossover* 2 x 2 é o mais simples deles e é empregado quando dois medicamentos são administrados em dois períodos. O medicamento a ser testado e o medicamento de referência serão denotados por T e R, respectivamente. Assim, os participantes são alocados aleatoriamente para receber T e depois de um período de eliminação, comumente chamado de *washout*, R ou receber primeiro R e posteriormente T. O delineamento *crossover* tem as seguintes vantagens: (i) cada indivíduo serve de controle para ele mesmo; (ii) a avaliação da bioequivalência é baseada na variabilidade intra-indivíduo; (iii) em geral são necessários menos indivíduos para fornecer a mesma precisão que outros delineamentos, como por exemplo, o paralelo. Com uma aleatorização adequada dos indivíduos nas seqüências obtem-se um estimador eficiente para a razão entre as formulações. A Figura 1.3 ilustra o esquema de um delineamento *crossover* 2 x 2.

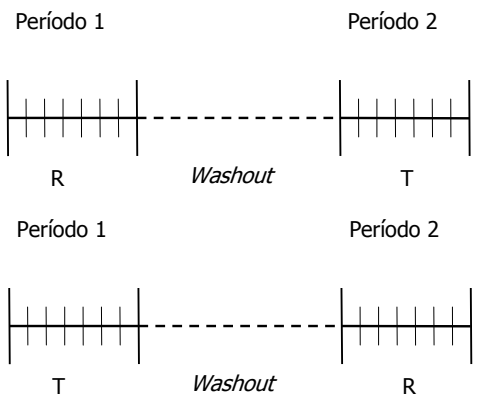


Figura 1.3: Esquema de um delineamento *crossover* 2 x 2

Como o número de amostras sanguíneas por voluntário é limitada, por questões financeiras e práticas, o cronograma de coleta deve ser tal que as medidas da curva de concentração possam produzir com precisão as estimativas dos parâmetros de biodisponibilidade.

De acordo com a ANVISA, o estudo de bioequivalência deve ser realizado através da quantificação do fármaco na circulação sanguínea. O cronograma de coleta das amostras deve contemplar um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou do metabólito.

O intervalo entre os dois períodos de coleta (*washout*) deve ser de, no mínimo, sete meias-vidas de eliminação do fármaco (ou do metabólito ativo) para assegurar a depuração completa do fármaco e evitar o efeito residual (RE Nº 1170, 2006).

O número de participantes de um estudo de bioequivalência depende basicamente do poder do teste e do nível de significância desejados e da variabilidade do fármaco. A ANVISA recomenda que o poder seja de pelo menos 80%, não permite a utilização de amostra inferior a doze indivíduos e na falta de dados relativos à variabilidade do fármaco, pode-se optar por um número mínimo de vinte e quatro voluntários.

A ANVISA recomenda também que as variáveis ASC e $Cmax$ sejam transformadas em logarítmo natural, uma vez que, em geral, a distribuição dos dados transformados se aproxima mais a uma distribuição normal em relação aos dados originais.

Em um estudo de bioequivalência de dose única dos medicamentos teste e referência, a Análise de Variância (ANOVA) é realizada para a verificação dos efeitos da formulação, do período e do efeito residual (*carryover*) e para a comparação das médias de ASCs e $Cmax$, entre as formulações, aplicando-se a transformação logarítmica aos dados.

Após essa análise preliminar dos efeitos, será testada a bioequivalência propriamente dita.

Na prática dois fármacos são reconhecidos como bioequivalentes quando têm o mesmo perfil de biodisponibilidade. Para as medidas ASC e $Cmax$ compara-se a média do medicamento teste com a média do medicamento referência. O critério utilizado é se o intervalo de 90% para a razão das médias na escala original ou a diferença das médias na escala logarítmica cai inteiramente dentro de limites pré-especificados. O intervalo de bioequivalência comumente adotado é $(0,80; 1,25)$ para razão das médias ou $(-0,2231; 0,2231)$ para diferença das médias na escala do logarítmo natural. Quando clinicamente relevante, $Tmax$ também deve ser considerado e será analisado como diferença individual, construindo-se um intervalo de 90% de confiança, utilizando-se um método não paramétrico.

$Tmax$ não constitui um elemento decisório na conclusão de bioequivalência porque ele tem o valor limitado arbitrariamente pela escolha dos tempos de coleta, se assim não fosse poderia ser uma medida adequada para se obter a velocidade de absorção.

1.2 Consolidação e utilização de informações publicadas

Com o objetivo de consolidar informações publicadas em estudos de bioequivalência com dados reais e ilustrar a elaboração de um protocolo a partir de informações de um estudo selecionado, foram pesquisados 98 estudos de bioequivalência, no período de 1997 a 2005, foram escolhidos os 67 referentes ao delineamento *crossover* 2 x 2, dose única de fármacos administrados

por via oral, como por exemplo, antibióticos, anti-hipertensivos, antiinflamatórios, hipoglicemiantes. Foram levantadas as seguintes informações dos estudos: número de voluntários, sexo dos voluntários, cronograma de coleta, período de *washout*, estatísticas das medidas farmacocinéticas, coeficiente de variação e escala adotada.

Das 67 publicações, 21 são brasileiras, 25 de países da Ásia (Tailândia, Coréia, China, Arábia Saudita, Emirados Árabes Unidos e Israel) e 16 publicações européias (Áustria, Alemanha, Espanha, Grécia e Turquia) e 5 de outros países da América (México, Estados Unidos, Chile e Costa Rica). Em todas elas, concluiu-se pela bioequivalência entre os fármacos comparados.

Como citado anteriormente, para casos em que não se tem dados relativos ao coeficiente de variação do fármaco, pode-se utilizar um número mínimo de 24 voluntários e esse é o valor mais encontrado nas publicações. Em estudos realizados em países da Ásia encontra-se maior número de estudos com menos de 24 voluntários, mas nunca menos que 12, como mostra a Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Distribuição dos 21 estudos brasileiros, 5 de outros países americanos, 25 asiáticos e 16 europeus, segundo o número de voluntários e o período de *washout*

	Brasil	**Ásia**	**Europa**	**Américas**	**Total**
Número de voluntários					
8 - 24	2	10	2	3	17
24	13	12	12	0	37
24 - 40	6	3	2	2	13
Total	21	25	16	5	67
***Washout* (dias)**					
6	0	2	0	0	2
7	7	15	9	4	35
14	9	6	2	0	17
15 - 28	3	1	3	0	7
Sem informação	2	1	2	1	6
Total	21	25	16	5	67

O estudo que utilizou o menor número de voluntários, 8, foi um estudo chileno para o medicamento ciprofloxacina e o estudo de maior amostra foi um estudo brasileiro de isotretinoína (40 voluntários).

Alguns estudos selecionam somente indivíduos do sexo masculino (38,81%) e a participação de mulheres implica em alguns problemas de ordem analítica e ética, como a permissão do uso concomitante de contraceptivos orais, as diferenças das características corporais entre os sexos

e menstruação, além da necessidade de comprovar a ausência de gravidez durante o estudo. Apesar disso, no Brasil há uma tendência em realizar os estudos com ambos os sexos. Entre os 21 estudos brasileiros, 18 utilizaram indivíduos de ambos os sexos e destes, 9 eram balanceados isto é, tinham o mesmo número de mulheres e de homens. Das 67 publicações 27 não relataram se todos os voluntários completaram o estudo, em quatro estudos houve desistências ou exclusões, porém apenas um justificou a saída do voluntário que alegou motivos pessoais.

Nas publicações encontram-se sempre valores para as razões das médias entre os medicamentos comparados para a ASC e para o $Cmax$, porém informações como o coeficiente de variação ou o desvio padrão não aparecem explicitamente, embora em alguns casos possam ser recuperados a partir dos resultados. Várias publicações (47,76%) também não informam os valores encontrados para a meia vida dos fármacos.

O número de publicações é muito inferior ao número de estudos de bioequivalência realizados para liberação dos medicamentos genéricos para o mercado. Muitas publicações não divulgam importantes informações, como a meia vida ou o coeficiente de variação, necessárias para um planejamento mais adequado de novos estudos. A meia vida é indispensável para determinação do cronograma de coleta e do período de *washout* e o coeficiente de variação para o cálculo do número de voluntários.

Como o estudo de bioequivalência sobre o fluconazol 150mg (Porta *et al.* (2005)) foi um dos mais completos, seus resultados foram utilizados para simular a confecção de um protocolo para estudo de bioequivalência. Assim, para a meia vida do medicamento de referência (cerca de 30h), o período de *washout* e de coleta foram estimados por no mínimo 9 dias e 90h, respectivamente. Empregando o maior valor encontrado do coeficiente de variação para o medicamento referência (21,75%), foi calculado que seriam necessários um total de 34 voluntários, para um poder de 80%, como é exigido pela ANVISA. Como o estudo utilizou 28 voluntários, o poder do teste é de 69%. Além disso, o período de coleta (até 96h) e de *washout* (14 dias) adotados no artigo estão de acordo com a legislação vigente.

1.3 Objetivo

Este trabalho tem como objetivo analisar criticamente os principais aspectos dos métodos estatísticos exigidos pela regulamentação vigente com enfoque em questões práticas.

Deseja-se ainda aprofundar o conhecimento no que diz respeito ao cálculo do tamanho da amostra e às conseqüências de um cálculo inapropriado. Além de outros fatores que podem influenciar a conclusão de bioequivalência.

1.4 Tópicos do trabalho

Este trabalho será desenvolvido para delineamento *crossover* 2 x 2 e está disposto da seguinte maneira: no Capítulo 2, há uma revisão da literatura dos principais tópicos da análise estatística provenientes de estudos de bioequivalência e problemas relacionados a esses estudos, além de alguns exemplos do que pode ocorrer na prática. O Capítulo 3 contém a descrição dos procedimentos de simulação e os resultados obtidos. No Capítulo 4 são apresentadas as conclusões e considerações finais do trabalho.

2 *Referencial teórico*

Nesta seção será apresentada a notação, além de aspectos importantes tanto do planejamento quanto da análise de dados provenientes de estudos de bioequivalência utilizando-se o delineamento *crossover* 2 x 2.

2.1 Modelo e inferência estatística

Num planejamento *crossover*, é importante remover efeitos residuais na comparação das formulações já que o efeito da formulação pode ser confundido com um eventual efeito residual. Por causa disso, o modelo estatístico abaixo é normalmente considerado.

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + R_{(j-1,k)} + e_{ijk} \tag{2.1}$$

Os índices i, j e k são respectivamente para indivíduo ($i = 1, 2, ..., n_k$), período ($j = 1, ..., p$) e seqüência ($k = 1, 2, ..., g$) e em termos do modelo são:

- Y_{ijk}: variável resposta (por exemplo, $lnASC$);
- μ: média geral;
- S_{ik}: efeito do i-ésimo indivíduo na k-ésima seqüência;
- P_j: efeito fixo do j-ésimo período;
- $F_{(j,k)}$: efeito fixo da formulação administrada na k-ésima seqüência e no j-ésimo período, tal que $\sum F_{(j,k)} = 0$;
- $R_{(j-1,k)}$: efeito residual fixo de primeira ordem da formulação administrada na k-ésima seqüência e $(j-1)$-ésimo período, tal que $R_{(0,k)} = 0$ e $\sum R_{(j-1,k)} = 0$;
- e_{ijk}: erro aleatório.

Assume-se que S_{ik} e e_{ijk} são independentes e identicamente distribuídos (distribuição normal) com média zero e variâncias σ_s^2 e σ_e^2 respectivamente, sendo $t = 1, 2, ..., L$ (número de

formulações a serem comparadas). Assume-se também que S_{ik} e e_{ijk} são mutuamente independentes. Então temos que σ_s^2 é a variação inter-indivíduos e σ_e^2 é a variação intra-indivíduos.

Para o *crossover* 2 x 2 $i = 1, 2, ..., n_k$, $j = 1, 2, k = 1, 2$ e $\mu_T = \mu + F_T$ e $\mu_R = \mu + F_R$ são respectivamente as médias para as formulações T e R. Seja $d_{ik} = \frac{y_{i2k} - y_{i1k}}{2}$, isto é a metade da diferença entre as duas medidas dos dois períodos para o i-ésimo indivíduo no j-ésimo período na k-ésima seqüência. A média de d_{ik} para a k-ésima seqüência é $\bar{d}_{.k} = \frac{\sum_{i=1}^{n_k} d_{ik}}{n_k}$.

As Tabelas 2.1 e 2.2 resumem os modelos, valores esperados e os dados para o delineamento *crossover* 2 x 2.

Tabela 2.1: Modelo e valores esperados para o delineamento *crossover* 2 x 2

Seqüência	Período	Modelo	Esperança
RT ($k = 1$)	1	$Y_{i11} = \mu + S_{i1} + F_R + P_1 + e_{i11}$	$E(Y_{i11}) = \mu + F_R + P_1 = \mu_R + P_1$
RT ($k = 1$)	2	$Y_{i21} = \mu + S_{i1} + F_T + P_2 + e_{i21}$	$E(Y_{i21}) = \mu + F_T + P_2 = \mu_T + P_2$
TR ($k = 2$)	1	$Y_{i12} = \mu + S_{i2} + F_T + P_1 + e_{i12}$	$E(Y_{i12}) = \mu + F_T + P_1 = \mu_T + P_1$
TR ($k = 2$)	2	$Y_{i22} = \mu + S_{i2} + F_R + P_2 + e_{i22}$	$E(Y_{i22}) = \mu + F_R + P_2 = \mu_R + P_2$

Tabela 2.2: Resumo dos dados para o delineamento *crossover* 2 x 2

Seqüência	N	Período 1	Período 2
RT	n_1	Formulação referência (R)	Formulação teste (T)
		Dados: y_{i11} $(i = 1, \cdots, n_1)$	Dados: y_{i21} $(i = 1, \cdots, n_1)$
		Média amostral: $\bar{y}_{.11} = \frac{\sum_{i=1}^{n_1} y_{i11}}{n_1}$	Média amostral: $\bar{y}_{.21} = \frac{\sum_{i=1}^{n_1} y_{i21}}{n_1}$
TR	n_2	Formulação teste (T)	Formulação referência (R)
		Dados: y_{i12} $(i = 1, \cdots, n_2)$	Dados: y_{i22} $(i = 1, \cdots, n_2)$
		Média amostral: $\bar{y}_{.12} = \frac{\sum_{i=1}^{n_2} y_{i12}}{n_2}$	Média amostral: $\bar{y}_{.22} = \frac{\sum_{i=1}^{n_2} y_{i22}}{n_2}$.

N = número de voluntários

Para a comparação de biodisponibilidade entre formulações, é desejável estimar e separar os efeitos residuais do efeito da formulação. Na prática, é normal assumir que:

- não existe efeito de período,
- não existem efeitos residuais.

Isso se deve ao fato de que um estudo bem planejado e bem conduzido pode eliminar o possível efeito de período e um período de eliminação (*washout*) adequado deve ser escolhido para garantir a ausência dos efeitos residuais.

Porém, em várias situações, o efeito de período e/ou os efeitos residuais ainda podem permanecer. A presença desses efeitos aumenta a complexidade da análise estatística para a verificação da bioequivalência entre formulações. Então, é de interesse estabelecer alguns testes preliminares para a presença do efeito de período e/ou dos efeitos residuais antes que a comparação de biodisponibilidades entre formulações seja feita.

- Efeitos residuais (*carryover*)

O fenômeno chamado de efeito residual (*carryover*) ocorre quando o medicamento recebido pelo voluntário no primeiro período ainda tem um efeito remanescente sobre o medicamento recebido no segundo período. O problema é que o efeito residual pode ocorrer, não ser detectado e viciar a estimação do efeito de formulação.

O efeito residual tem sido bastante investigado em estudos de *crossover* 2 x 2, em que os efeitos de seqüência se confundem com os efeitos residuais. Parte desse problema é devido ao fato do modelo não ter graus de liberdade suficientes para estimar os efeitos de formulação, de período e residuais com eficiência (SENN *et al.*, 2004).

Lembrando que $i = 1, 2, ..., n_k$ e $k = 1, 2$, índices para indivíduo e seqüência, respectivamente, considere $U_{ik} = Y_{i1k} + Y_{i2k}$ a soma da medida farmacocinética em estudo nos períodos 1 e 2 na k-ésima seqüência e a média da soma é dada por:

$$\bar{U}_{.k} = \frac{1}{n_k} \sum U_{ik} \tag{2.2}$$

sendo $\bar{U}_{.1}$ e $\bar{U}_{.2}$ variáveis independentes provenientes de populações normais com variâncias iguais.

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

Seja $R = R_T - R_R$ a diferença de efeitos residuais. Sob a restrição de que $R_T + R_R = 0$, os efeitos residuais são iguais para duas formulações. Como não há estimadores não-viciados para os efeitos de formulação caso os efeitos residuais estejam presentes, é de interesse examinar a existência desses efeitos.

Os efeitos residuais (seqüenciais) podem ser determinados testando-se as hipóteses:

$$H_0 : R = 0 \text{ versus } H_1 : R \neq 0 \Leftrightarrow H_0 : R_T = R_R \text{ versus } H_1 : R_T \neq R_R \tag{2.3}$$

Assim, a rejeição da hipótese nula leva à conclusão da presença de efeitos residuais entre as formulações.

De acordo com a RE n° 898 (ANVISA, 2003), a presença de efeitos sequenciais (residuais) pode ser aceita se tratando de um estudo *crossover* 2 x 2 de dose única, que envolve apenas voluntários sadios, o fármaco não é uma substância endógena, o período de eliminação foi adequado, as amostras de pré-dosagem não apresentam qualquer nível de fármaco detectável em todos os voluntários e o estudo satisfaz todos os critérios científicos e estatísticos.

- Efeito da formulação

Considerando a diferença das medidas farmacocinéticas em estudo entre os períodos 1 e 2 na k-ésima seqüência temos que:

$$d_{ik} = \frac{1}{2}(Y_{i2k} - Y_{i1k}), i = 1, ..., n_k; k = 1, 2. \tag{2.4}$$

A esperança e a variância da diferença entre os períodos é dada por:

$$E(d_{ik}) = \begin{cases} \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + R_R] & \text{para indivíduos na seqüência 1} \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_R - F_T) + R_T] & \text{para indivíduos na seqüência 2} \end{cases} \tag{2.5}$$

$$Var(d_{ik}) = \sigma_d^2 = \frac{\sigma_e^2}{2}. \tag{2.6}$$

Podemos observar que a variância da diferença entre os períodos só depende da variabilidade intra-individual, o que reflete o benefício do delineamento *crossover* na comparação do efeito da formulação.

As médias das diferenças na seqüência k é dada por:

$$\bar{d_{.k}} = \frac{1}{n_k}\sum_{i=1}^{n_k} d_{ik}, k = 1, 2. \tag{2.7}$$

O efeito da formulação é denotado por $F = F_T - F_R$. Se $R_T \neq R_R$, então não existe estimadores não viciados para F baseado nos dados dos dois períodos. Porém, se $R_T = R_R$:

$$\hat{F} = \bar{d_{.1}} - \bar{d_{.2}} = \bar{Y_T} - \bar{Y_R} \tag{2.8}$$

sabendo que:

$$\bar{Y_R} = \frac{1}{2}(\bar{Y_{.11}} + \bar{Y_{.22}}) \;\text{ e }\; \bar{Y_T} = \frac{1}{2}(\bar{Y_{.21}} + \bar{Y_{.21}}). \tag{2.9}$$

$\bar{Y_R}$ e $\bar{Y_T}$ são chamados médias dos mínimos quadrados para as formulações R e T, respectivamente. Os métodos estatísticos para verificação da bioequivalência média devem utilizar esses valores.

A presença de efeito de formulação pode ser examinada testando-se as hipóteses:

$$H_0 : F_R = F_T \;\text{ versus }\; H_1 : F_R \neq F_T \tag{2.10}$$

Assim, a rejeição da hipótese nula leva à conclusão da presença de efeito de formulação.

Segundo Chow e Liu (2000), na prática, na presença de efeitos residuais, os dados do primeiro período podem ser analisados para avaliar a bioequivalência entre formulações no estudo de biodisponibilidade. Porém, tem-se as seguintes conseqüências:

- há um aumento na variabilidade, diminuindo assim o poder para a detecção de uma diferença clinicamente significante;
- a desconsideração da informação do segundo período elimina o benefício de um delineamento *crossover*, que remove a variabilidade inter-individual da comparação entre formulações.

Devido aos prejuízos descritos, a ANVISA não aceita esse tipo de procedimento.

Deve-se notar que a não rejeição da hipótese nula da igualdade entre formulações não implica na bioequivalência entre essas formulações.

- Efeito de período

As hipóteses a serem testadas são:

$$H_0 : P_1 = P_2 \;\text{ versus }\; H_1 : P_1 \neq P_2. \tag{2.11}$$

A hipótese de ausência de efeito de período é rejeitada se:

$$|T_0| > t(\alpha/2, n_1 + n_2 - 2), \tag{2.12}$$

sendo

$$T_0 = \frac{\hat{P}}{\hat{\sigma}_d\sqrt{\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}}}. \tag{2.13}$$

Um estimador não viciado do efeito de período P pode ser obtido a partir das médias definidas na Tabela 2.2 e é dado por:

$$\hat{P} = \frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22})]. \tag{2.14}$$

2.2 Critérios para declarar bioequivalência

Como visto anteriomente o efeito da formulação ($\theta = \mu_T - \mu_R$) pode ser estimado por $\hat{\theta} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2} = \bar{Y}_T - \bar{Y}_R$, sendo $\bar{Y}_R = \frac{\bar{Y}_{.11}+\bar{Y}_{.22}}{2}$ e $\bar{Y}_T = \frac{\bar{Y}_{.21}+\bar{Y}_{.12}}{2}$, cujos termos estão definidos na Tabela 2.2. Assim, o intervalo de $(1-2\alpha)100\%$ de confiança para θ é dado por

$$\left((\bar{y}_T - \bar{y}_R) - t_\nu(\alpha)\hat{\sigma}_d\sqrt{\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}}, (\bar{y}_T - \bar{y}_R) + t_\nu(\alpha)\hat{\sigma}_d\sqrt{\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}}\right), \tag{2.15}$$

onde $\hat{\sigma}_d^2 = \frac{\sum_{k=1}^{2}\sum_{i=1}^{n_k}(d_{ik}-\bar{d}_{.k})^2}{n_1+n_2-2}$, $d_{ik} = \frac{y_{i2k}-y_{i1k}}{2}$, $\bar{d}_{.k} = \frac{\sum_{i=1}^{n_k} d_{ik}}{n_k}$, $t_\nu(\alpha)$ é o percentil de ordem $100(1-\alpha)$ da distribuição t de Student com $\nu = n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

Alternativamente, denotando os limites de bioequivalência por θ_I e θ_S, a bioequivalência pode ser avaliada testando-se as seguintes hipóteses:

$$H_0^+ : \theta \leq \theta_I \quad \text{versus} \quad H_1^+ : \theta > \theta_I \quad \text{e} \quad H_0^- : \theta \geq \theta_S \quad \text{versus} \quad H_1^- : \theta < \theta_S. \tag{2.16}$$

Schuirmann (1987) descreveu os dois testes unilaterais para as hipóteses apresentadas em (2.3) cujas estatísticas são dadas por:

$$T^+ = \frac{(\bar{y}_T - \bar{y}_R) - \theta_I}{\hat{\sigma}_d\sqrt{\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}}} \quad \text{e} \quad T^- = \frac{(\bar{y}_T - \bar{y}_R) - \theta_S}{\hat{\sigma}_d\sqrt{\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}}}. \tag{2.17}$$

A bioequivalência é declarada se ambas as hipóteses (H_0^+ e H_0^-) são rejeitadas ao nível de significância de α, isto é, $T^+ \geq t_\nu(\alpha)$ e $T^- \leq -t_\nu(\alpha)$. Schuirmann (1987) mostrou que se o intervalo de $(1-2\alpha)100\%$ confiança está dentro do intervalo de bioequivalência (θ_I, θ_S) então ambas hipóteses H_0^+ e H_0^- são também rejeitadas. Assim, as formulações T e R são consideradas bioequivalentes se o intervalo dado em (2.15) estiver completamente contido dentro dos limites de bioequivalência especificados (θ_I, θ_S).

Na prática, em geral, $n_1 = n_2 = n$ em cada seqüência, ou seja há um total de $2n$ voluntários, os limites de bioequivalência são simétricos, isto é, $\theta_S = -\theta_I = \theta_0$ e $\alpha = 0,05$.

Declara-se bioequivalência quando o intervalo de 90% de confiança para a diferença das médias estiver completamente contido dentro dos limites de bioequivalência especificados $(0,80; 1,25)$ ou $(-0,2231; 0,2231)$, respectivamente para as escalas original e logarítmica.

2.3 Análise de variância

A análise de variância tem como objetivo estudar a variabilidade nos dados observados particionando a soma de quadrados total (SQ_{total}) das observações em componentes dos efeitos fixos e dos erros aleatórios. Para o delineamento *crossover* 2 x 2 a soma de quadrados total das $2(n_1 + n_2)$ observações deve ser particionada em componentes dos efeitos residuais, do efeito de período, do efeito da formulação e do erro. Seja $\bar{Y}...$ a média geral das observações. Então a soma dos quadrados total é dada por

$$\begin{aligned} SQ_{\text{total}} &= \sum_{k=1}^{2}\sum_{j=1}^{2}\sum_{i=1}^{n_k}(Y_{ijk} - \bar{Y}...)^2 = \\ &= \sum_{k=1}^{2}\sum_{j=1}^{2}\sum_{i=1}^{n_k}(Y_{ijk} - \bar{Y}i.k)^2 + 2\sum_{k=1}^{2}\sum_{i=1}^{n_k}(\bar{Y}_{i.k} - \bar{Y}_{...})^2 = \\ &= SQ_{\text{dentro}} + SQ_{\text{entre}}, \end{aligned} \tag{2.18}$$

onde $\bar{Y}_{i.k} = \frac{1}{2}\sum_{j=1}^{2} Y_{ijk}$ e SQ_{entre} é a soma dos quadrados referente aos indivíduos (inter-individual) e SQ_{dentro} é a soma dos quadrados dentro de cada indivíduo (intra-induvidual). SQ_{entre} ainda pode ser particionada em duas componentes: uma para os efeitos residuais e outra para os erros entre os indivíduos.

$$SQ_{\text{entre}} = SQ_{\text{residual}} + SQ_{\text{inter}}, \tag{2.19}$$

sendo

$$SQ_{\text{residual}} = \frac{2n_1n_2}{n_1 + n_2}\left\{\frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.12} + \bar{Y}_{.22}) - (\bar{Y}_{.11} + \bar{Y}_{.21})]\right\}^2 \tag{2.20}$$

e

$$SQ_{\text{inter}} = \sum_{k=1}^{2}\sum_{i=1}^{n_k}\frac{Y_{i.k}^2}{2} - \sum_{k=1}^{2}\frac{Y_{..k}^2}{2n_k}. \tag{2.21}$$

Sabendo que $Y_{i.k}$ e $Y_{..k}$ são as somas de Y_{ijk} nos índices correspondentes. SQ_{residual} e SQ_{inter} têm 1 e $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade, respectivamente. Cada soma dos quadrados dividida pelo seu grau de liberdade é o quadrado médio (QM).

Para testar a existência de efeitos residuais, deve-se usar a estatística

$$F_r = \frac{QM_{\text{residual}}}{QM_{\text{inter}}}, \tag{2.22}$$

que segue uma distribuição F com $(1, n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade se a hipótese nula (2.3) for verdadeira. Rejeita-se a hipótese nula (inexistência de efeitos residuais) ao nível α se $F_r > F_{(\alpha,1,n_1+n_2-2)}$. $F_{(\alpha,1,n_1+n_2-2)}$ é o valor crítico da distribuição F de Snedecor com $(1, n_1+n_2-2)$ graus de liberdade.

A soma dos quadrados dentro de cada indivíduo (SQ_{dentro}) pode ser dividida em três componentes, a saber:

$$SQ_{\text{dentro}} = SQ_{\text{formulação}} + SQ_{\text{período}} + SQ_{\text{intra}}. \tag{2.23}$$

As somas dos quadrados são dadas por:

$$SQ_{\text{formulação}} = \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2}\left\{\frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.12})]\right\}^2, \tag{2.24}$$

$$SQ_{\text{período}} = \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2}\left\{\frac{1}{2}[(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22})]\right\}^2 \tag{2.25}$$

e

$$SQ_{\text{intra}} = \sum_{k=1}^{2}\sum_{j=1}^{2}\sum_{i=1}^{n_k} Y_{ijk}^2 - \sum_{k=1}^{2}\sum_{i=1}^{n_k}\frac{Y_{i.k}^2}{2} - \sum_{k=1}^{2}\sum_{j=1}^{2}\frac{Y_{.jk}^2}{n_k} + \sum_{k=1}^{2}\frac{Y_{..k}^2}{2n_k}. \tag{2.26}$$

$SQ_{\text{formulação}}$ e $SQ_{\text{período}}$ têm 1 grau de liberdade cada e SQ_{intra} tem $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

Quando $R_R = R_T$, a hipótese nula (2.16) de inexistência de efeito da formulação pode ser testada usando a estatística

$$F_d = \frac{QM_{\text{formulação}}}{QM_{\text{intra}}}, \tag{2.27}$$

que segue uma distribuição F com $(1, n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade se a hipótese nula (2.16) for verdadeira. Rejeita-se a hipótese nula (inexistência de efeito da formulação) ao nível α se

$F_r > F_{(\alpha,1,n_1+n_2-2)}$, sendo $F_{(\alpha,1,n_1+n_2-2)}$ o valor crítico da distribuição F de Snedecor com $(1, n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade.

Para testar a hipótese nula (2.11) de inexistência de efeito do período, podemos considerar a seguinte estatística

$$F_p = \frac{QM_{\text{período}}}{QM_{\text{intra}}}, \tag{2.28}$$

que segue uma distribuição F com $(1, n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade. Rejeita-se a hipótese nula (inexistência de efeito de período) ao nível α se $F_r > F_{(\alpha,1,n_1+n_2-2)}$, em que $F_{(\alpha,1,n_1+n_2-2)}$ é o valor crítico da distribuição F de Snedecor com $(1, n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade.

Tabela 2.3: Análise de variância para o delineamento *crossover* 2 x 2

Fonte	**GL**	$\boldsymbol{SQ}$	$\boldsymbol{QM}$	$\boldsymbol{F}$	$\boldsymbol{p}$
Inter-individual					
Residual (Seqüência)	1	SQ_{residual}	SQ_{residual}	F_r	$p_r = P_{r(F_{(\alpha,1,n_1+n_2-2)}>F_r)}$
Resíduos (inter)	$n_1 + n_2 - 2$	SQ_{inter}	$\frac{SQ_{\text{inter}}}{n_1+n_2-2}$		
Intra-individual					
Formulação	1	$SQ_{\text{formulação}}$	$SQ_{\text{formulação}}$	F_d	$p_d = P_{d(F_{(\alpha,1,n_1+n_2-2)}>F_d)}$
Período	1	$SQ_{\text{período}}$	$SQ_{\text{período}}$	F_p	$p_p = P_{p(F_{(\alpha,1,n_1+n_2-2)}>F_p)}$
Resíduos (intra)	$n_1 + n_2 - 2$	SQ_{intra}	$\frac{SQ_{\text{intra}}}{n_1+n_2-2}$		
Total	$2(n_1 + n_2) - 1$	SQ_{total}			

2.4 Regras de decisão

Entre 1977 e 1992 o FDA propôs regras de decisão para testes de bioequivalência em termos de biodisponibilidade média dos fármacos. Supondo que a ASC e $Cmax$ são medidas utilizadas para verificar a extensão e a velocidade da absorção, para cada medida, são aplicadas as regras de decisão abaixo.

1. **Regra 75/75** - A bioequivalência é declarada se pelo menos 75% das razões individuais entre as respostas dos medicamento teste e referência estejam dentro do intervalo (75%; 125%). Tem como vantagem o fato de ser de fácil aplicação, compara a biodisponibilidade relativa para cada indivíduo e remove o efeito da heterogeneidade da variabilidade inter-individual nas comparações entre as formulações. Porém é muito sensível para medicamentos que têm alta variabilidade inter ou intra-individual e razões individuais podem ser facilmente confundidas com efeito de período.

Sabendo que esses efeitos frequentemente são significantes em estudos *crossover* em voluntários sadios, o uso desse critério para decisão de bioequivalência foi considerado inapropriado para uma grande variedade de medicamentos e logo foi deixado de lado.

2. **Regra 80/20** - Se a diferença entre a média do medicamento teste e a média do medicamento referência não é estatísticamente significante e se há pelo menos 80% de poder para detectar uma diferença de 20% na média do referência, então a bioequivalência pode ser concluída. Tem como desvantagem a necessidade de um número de voluntários elevado.

   Assim, a regra 80/20 só é considerada como um pré-estudo do cálculo do poder na determinação do número de voluntários na etapa de planejamento do protocolo de estudo.

3. **Regra $\pm$20** - A bioequivalência é concluída se a biodisponibilidade média do medicamento a ser testado estiver entre $\pm$20% da biodisponibilidade média do medicamento referência com uma certa garantia.

4. **Regra 80/125** - A bioequivalência é concluída se a biodisponibilidade média do medicamento a ser testado estiver entre (80%; 125%) da biodisponibilidade média do medicamento referência com uma certa garantia. Este critério não é simétrico na escala original, mas sim na escala logaritmica que tem uma amplitude de $-0,2231 = \ln(0,80)$ até $0,2231 = \ln(1,25)$.

2.5 Escala original versus escala logarítmica

Se a variável Y tem distribuição log-normal com média μ e variância σ^2 tal que $Y_* = lnY \sim N(\mu_*, \sigma_*^2)$, valem as seguintes propriedades:

- **Média (μ) e variância (σ^2) na escala original**

Tanto a média (μ) como a variância (σ^2) na escala original são expressas em termos das médias e variâncias nas escalas logarítmicas:

$$\mu = E(Y) = exp\left\{\mu_* + \sigma_*^2/2\right\}, \tag{2.29}$$

$$Var(Y) = exp\left\{2\mu_* + 2\sigma_*^2\right\} - exp\left\{2\mu_* + \sigma_*^2\right\} = exp\left\{2\mu_* + \sigma_*^2\right\}(exp\left\{\sigma_*^2\right\} - 1). \tag{2.30}$$

- **Coeficiente de variação (CV) na escala original**

O coeficiente de variação na escala original ($CV = \frac{\sigma}{\mu}$) é calculado como:

$$\begin{aligned} CV &= \frac{\sqrt{\exp\{2\mu_* + \sigma_*^2\}(\exp\{\sigma_*^2\} - 1)}}{\exp\left\{\mu_* + \frac{\sigma_*^2}{2}\right\}} = \frac{\sqrt{\exp\left\{2\mu_* + \frac{2\sigma_*^2}{2}\right\}(\exp\{\sigma_*^2\} - 1)}}{\exp\left\{\mu_* + \frac{\sigma_*^2}{2}\right\}} \\ &= \frac{\exp\left\{\mu_* + \frac{\sigma_*^2}{2}\right\}\sqrt{\exp\{\sigma_*^2\} - 1}}{\exp\left\{\mu_* + \frac{\sigma_*^2}{2}\right\}} = \sqrt{\exp\{\sigma_*^2\} - 1}. \end{aligned}$$

Em resumo, com o pressuposto de distribuição log-normal, a relação entre o coeficiente de variação (CV) na escala original e a variância σ_*^2 na escala logarítmica é dada por:

$$CV = \sqrt{\exp\{\sigma_*^2\} - 1}. \tag{2.31}$$

- **Relação entre o coeficiente de variação na escala original (CV) e o coeficiente na escala logarítmica (CV_*)**

Usando a definição de coeficiente de variação na escala original (CV) a relação (2.31) pode ser reescrita como $CV = \sqrt{\exp\{\sigma_*^2\} - 1} = \sqrt{\exp\left\{(CV_*\mu_*)^2\right\} - 1}$. Assim, $(CV)^2 = \exp\left\{(CV_*\mu_*)^2\right\} - 1 \Rightarrow \exp\left\{(CV_*\mu_*)^2\right\} = 1 + (CV)^2 \Rightarrow (CV_*\mu_*)^2 = \ln\left(1 + (CV)^2\right)$. Portanto, a relação entre o coeficiente de variação na escala original (CV) e o coeficiente na escala logarítmica (CV_*) é

$$CV_* = \frac{\sqrt{\ln\left(1 + (CV)^2\right)}}{\mu_*} \tag{2.32}$$

- **Média geométrica de Y**

A média geométrica amostral na escala original é por definição $\tilde{y} = (\prod_{i=1}^n y_i)^{\frac{1}{n}}$. Tomando o logaritmo, $\ln(\tilde{y}) = \frac{\sum_{i=1}^n \ln y_i}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n y_{i*}}{n} = \bar{y}_*$, ou equivalentemente $\tilde{y} = \exp\{\bar{y}_*\}$. Ou seja, o logaritmo da média geométrica na escala original é igual a média aritmética na escala logarítmica. O mesmo vale para a média populacional, isto é:

$$\ln(\tilde{\mu}) = \mu_* \qquad \text{ou} \qquad \tilde{\mu} = \exp\{\mu_*\} \tag{2.33}$$

- **Distribuição de lnY quando $Y \sim N(\mu, \sigma^2)$**

Se $Y \sim N(\mu, \sigma^2)$, $Var\left(\frac{Y-\mu}{\mu}\right) = \frac{\sigma^2}{\mu^2} = CV^2$. Segundo Chow e Wang (2001), se CV for suficientemente pequeno, $\frac{Y-\mu}{\mu}$ é aproximadamente 0. Por expansão de Taylor, $lnY - ln\mu = ln\left(1 + \frac{Y-\mu}{\mu}\right) \approx \frac{Y-\mu}{\mu}$. Logo $lnY \approx ln\mu + \frac{Y-\mu}{\mu}$ e portanto

$$lnY \approx N(ln\mu, CV^2). \tag{2.34}$$

A partir destes resultados, destacam-se os seguintes comentários:

1. Se σ_*^2 tende a zero, CV também tende a zero.
2. Quando $\sigma_* < 0,3$, CV pode ser aproximado por σ_*, isto é, CV é aproximadamente σ_*.
3. Quando CV é pequeno, lnY tem distribuição aproximadamente normal mesmo quando Y tem distribuição normal.
4. Para o cálculo do tamanho de amostra em estudos de bioequivalência, no lugar de σ_*^2 é utilizada a variância σ_d^2 definida no início do capítulo, usualmente na escala logarítmica, caso em que será denotada por σ_{d*}^2
5. A relação entre o coeficiente de variação na escala original (CV) e o coeficiente de variação na escala logarítmica (CV_*) é aproximadamente linear. Por exemplo, utilizando $\mu_* = 4,37$ (média geral dos dados da página 73 de Chow e Liu (2000) na escala logarítmica), tal relação está representada na Figura 2.1.

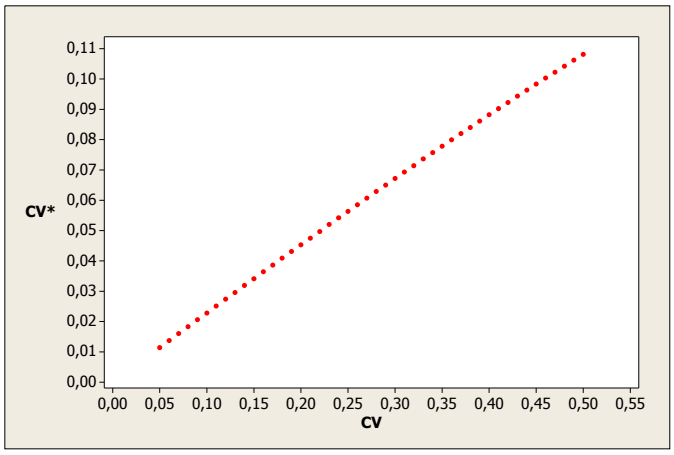


Figura 2.1: CV versus CV_*

A ANVISA recomenda que as medidas ASC e $Cmax$ sejam transformados em logaritmo natural, uma vez que, em geral, a distribuição dos dados transformados se aproxima mais a uma distribuição normal em relação aos dados originais. Além disso, a metodologia estatística mais comumente empregada para avaliar bioequivalência tem como pressuposto a normalidade e a homocedasticidade da variável resposta. Em geral, além de levar à normalidade, a transformação tem o efeito de eliminar alguns *outliers* e tende a estabilizar a variância. Como conseqüência positiva da transformação, os cálculos do poder ficam simplificados, como discutido em vários textos.

- Justificativa em relação ao tratamento de dados

Em geral, uma comparação preliminar de interesse num estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência é feita por meio da razão ao invés da diferença, entre as médias das medidas farmacocinéticas (ASC e $Cmax$) dos dados do produto teste e o de referência. Usando transformação logarítmica, o modelo linear generalizado empregado na análise de dados permite fazer inferências estatísticas sobre a diferença entre duas médias na escala logarítmica, as quais podem ser re-transformadas em inferências estatísticas sobre a razão das duas médias na escala original (Schuirmann, 1989).

- Justificativa em relação à farmacocinética

Westlake (1973, 1988) observou que um modelo multiplicativo é adequado para medidas farmacocinéticas (ASC e $Cmax$) num estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Assumindo que a eliminação do fármaco é de primeira ordem e somente ocorre a partir do compartimento central, a seguinte equação é obtida após uma administração extravascular (oral):

$$ASC_{0-\infty} = \frac{F_a \cdot D}{CL} = \frac{F_a \cdot D}{(Vd \cdot K_e)}, \tag{2.35}$$

Em (2.35), F_a é a fração absorvida, D é a dose administrada e $F_a \cdot D$ é a quantidade do fármaco absorvido. CL é o *"clearance"* de um dado voluntário, o qual é o produto do volume de distribuição aparente (Vd) e da constante de velocidade de eliminação (K_e). Portanto, o uso de ASC como uma medida da quantidade de fármaco absorvido envolve um termo multiplicativo (CL), o qual pode ser considerado como uma função do voluntário. Por essa razão, Westlake enfatiza que o efeito de voluntário não é aditivo se os dados são analisados na escala original. Por outro lado, a transformação logarítmica da ASC resulta em um tratamento aditivo:

$$lnASC_{0-\infty} = lnF_a + lnD - lnVd - lnK_e. \tag{2.36}$$

Argumentos semelhantes foram dados para $Cmax$.

2.6 Intervalo de bioequivalência: (θ_I, θ_S)

Nesta seção serão apresentados os limites de bioequivalência para a decisão de bioequivalência média entre dois fármacos baseados na diferença ou na razão das médias para os casos de medidas farmacocinéticas originais ou transformadas. Será adotada a seguinte notação:

Escala	Variável	Média aritmética	Média geométrica
Original	Y	μ	$\tilde{\mu}$
Logarítmica	$Y_* = ln(Y)$	μ_*	$\tilde{\mu}_*$

Como visto na seção 2.4, a relação entre $\tilde{\mu}$ e μ_* é $\tilde{\mu} = \exp\{\mu_*\}$ ou equivalentemente $\mu_* = \ln(\tilde{\mu})$. Agora vamos denotar Y_T e Y_R as variáveis farmacocinéticas na escala original, respectivamente para as formulações teste e referência e $\tilde{\mu}_T$ e $\tilde{\mu}_R$ suas médias geométricas. Supondo que Y_T e Y_R sigam a distribuição log-normal e que haja igualdade de variâncias, lembrando que suas médias são $\mu_T = \exp\left\{\mu_{T*} + \frac{\sigma_*^2}{2}\right\}$ e $\mu_R = \exp\left\{\mu_{R*} + \frac{\sigma_*^2}{2}\right\}$, onde μ_{T*} e μ_{R*} são as médias e σ_*^2 a variância na escala logarítmica, $\frac{\mu_T}{\mu_R} = \frac{\exp\left\{\mu_{T*}+\frac{\sigma_*^2}{2}\right\}}{\exp\left\{\mu_{R*}+\frac{\sigma_*^2}{2}\right\}} = \frac{\exp\{\mu_{T*}\}}{\exp\{\mu_{R*}\}} = \frac{\tilde{\mu}_T}{\tilde{\mu}_R}$. Além disso, $\ln\left(\frac{\mu_T}{\mu_R}\right) = \mu_{T*} - \mu_{R*}$. Em palavras, com o pressuposto de homocedasticidade:

1. a razão de médias aritméticas na escala original é igual à razão de médias geométricas na escala original.

2. a diferença das médias aritméticas na escala logarítmica é igual ao logaritmo da razão das médias na escala original.

2.6.1 Medidas farmacocinéticas sem transformação

A ANVISA permite o uso dos dados na escala original, desde que sejam apresentadas justificativas (RE N° 1170, 2006).

Nesta situação utilizam-se as médias aritméticas das medidas farmacocinéticas (μ_T e μ_R) para definir os intervalos de bioequivalência entre T e R.

- Diferença das médias

O intervalo de bioequivalência deve ser expresso por:

$$\theta_I < \mu_T - \mu_R < \theta_S \tag{2.37}$$

Utilizando a regra de $\pm 20\%$, os limites de bioequivalência são $\theta_I = -0,20\mu_R$ e $\theta_S = 0,20\mu_R$. Assim, o intervalo de bioequivalência é dado por:

$$-0,20\mu_R < \mu_T - \mu_R < 0,20\mu_R \tag{2.38}$$

Na prática estes limites devem ser estimados, pois dependem do parâmetro populacional desconhecido e a escolha natural é a média amostral ($\bar{y}_R$) do medicamento referência. Portanto, o intervalo é dado por:

$$-0,20\bar{y}_R < \mu_T - \mu_R < 0,20\bar{y}_R. \tag{2.39}$$

- Razão de médias

O intervalo de bioequivalência também pode ser definido por:

$$\theta_I < \frac{\mu_T}{\mu_R} < \theta_S. \tag{2.40}$$

O intervalo de bioequivalência para a diferença entre as médias aritméticas das duas formulações é apresentado na equação (2.38). Então dividindo-se esta desigualdade por μ_R, obtém-se $-0,20 < \frac{\mu_T - \mu_R}{\mu_R} < 0,20$. Após uma manipulação algébrica, o intervalo de bioequivalência para a razão das médias é:

$$0,80 < \frac{\mu_T}{\mu_R} < 1,20. \tag{2.41}$$

Assim, pela regra de $\pm 20\%$, os limites são $\theta_I = 0,80$ e $\theta_S = 1,20$.

A inferência padrão é para diferença das médias, mas na escala original deve-se usar a razão das médias, já que ao utilizar a diferença, o intervalo de bioequivalência dependeria da média aritmética do próprio conjunto de dados do estudo, o que remete ao uso da transformação logarítmica.

2.6.2 Medidas farmacocinéticas com transformação logarítmica

A partir da razão das médias geométricas (ou aritméticas) na escala original chega-se ao intervalo de bioequivalência para diferença de médias aritméticas na escala logarítmica, como mostrado a seguir. Neste caso, o intervalo de bioequivalência é definido por: $\theta_I < \frac{\tilde{\mu_T}}{\tilde{\mu_R}} < \theta_S$, sendo que os limites são $\theta_I = 0,80$ e $\theta_S = 1,25$. Assim, o intervalo de bioequivalência é dado por:

$$0,80 < \frac{\tilde{\mu_T}}{\tilde{\mu_R}} < 1,25, \tag{2.42}$$

ou equivalentemente

$$0,80 < \frac{\mu_T}{\mu_R} < 1,25. \tag{2.43}$$

O uso dos limites 0,80 e 1,25 para a razão das médias na escala original é justificado pela necessidade de intervalos de bioequivalência simétricos, visto que há uma correspondência a um intervalo de bioequivalência simétrico para a diferença das médias na escala transformada.

Tomando o logaritmo dessa desigualdade, tem-se que:

$$ln(0,80) < ln(\frac{\tilde{\mu_T}}{\tilde{\mu_R}}) < ln(1,25), \tag{2.44}$$

que resulta no intervalo de bioequivalência da diferença das médias aritméticas na escala transformada:

$$-0,2231 < \mu_{T*} - \mu_{R*} < 0,2231. \tag{2.45}$$

A Tabela 2.4 mostra o resumo dos limites de bioequivalência para as situações consideradas.

Tabela 2.4: Limites de bioequivalência para a medida farmacocinética nas escalas original e logarítmica

Escala	Diferença	Razão
Original	$-0,2\bar{y}_R < \mu_T - \mu_R < 0,2\bar{y}_R$	$0,80 < \frac{\mu_T}{\mu_R} < 1,20$
		$0,80 < \frac{\tilde{\mu_T}}{\tilde{\mu_R}} < 1,25$
Logarítmica	$-0,2231 < \mu_{T*} - \mu_{R*} < 0,2231$	

2.7 Determinação do poder e do número de voluntários

O cálculo do tamanho da amostra necessário é parte do protocolo de qualquer estudo de bioequivalência. Existem várias formas para a determinação do tamanho de amostra para estudos de bioequivalência planejados através de *crossover* 2 x 2, mas é recomendado a utilização do método considerado como padrão-ouro (baseado na distribuição t de Student não-central) e cuja implementação está disponível no *software* nQuery Advisor ®.

Destacamos as seguintes referências sobre o assunto: Phillips (1990), Dilletti *et al.* (1991), Chow *et al.* (2002), Chow *et al.* (2003), Siqueira *et al.* (2005) e Hauschke *et al.* (2007).

O número de participantes de um estudo de bioequivalência depende basicamente do poder do teste e do nível de significância desejados, além da variabilidade intra-individual, expressa pelo coeficiente de variação do fármaco de referência ou equivalentemente da variância intra-indivíduos e da diferença esperada entre as duas médias (θ_γ). Em geral, planeja-se o mesmo tamanho em cada seqüência, isto é, $n_1 = n_2 = n$ tal que um total de $2n$ voluntários deve ser recrutado.

O poder do teste de Schuirmann é por definição Pr(Rejeitar H_0^+ e $H_0^-|\theta$), cujas hipóteses H_0^+ e H_0^- estão apresentadas em (2.16), para determinado valor de θ. Assim, para θ_γ, tal que $\theta_I < \theta_\gamma < \theta_S$, o poder é dado por:

$$Pr\left(T^+ \geq t_\nu(\alpha) \text{ e } T^- \leq t_\nu(\alpha)\right), \tag{2.46}$$

que pode ser aproximado para:

$$1 - \tau_{\nu,\delta^-}\left(t_{\alpha,\nu}\right) - \tau_{\nu,\delta^+}\left(t_{\alpha,\nu}\right). \tag{2.47}$$

Em (2.47), α é o nível de significância, o termo $\tau_{\nu,\delta}$ representa a função de distribuição acumulada da distribuição t de Student não central com $\nu = n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade e parâmetro de não centralidade $\delta^- = \sqrt{\frac{n}{2}}\left(\frac{\theta_S - |\theta_\gamma|}{\sigma_{d*}}\right)$ e $\delta^+ = \sqrt{\frac{n}{2}}\left(\frac{\theta_S + |\theta_\gamma|}{\sigma_{d*}}\right)$ e $t_{\alpha,\nu}$ é o percentil da distribuição t de Student central. Em outras palavras, a expressão (2.46) é referente ao método padrão-ouro, isto é, calculado a partir da distribuição t de Student não central bivariada e pode ser escrita como a diferença de probabilidades baseadas na distribuição t de Student não central univariada. Comparações do poder empírico baseados em 1.000.000 simulações da segunda forma (2.47) com os valores utilizando o *software* nQuery Advisor ®, que afirma usar (2.46), mostram que para os tamanhos de amostras usuais, a acurácia é mantida, exceto quando o poder fica abaixo de 50%. Como geralmente um poder de pelo menos 80% é exigido em estudos de bioequivalência, há indicação de que ambos procedimentos são equivalentes em termos práticos (SIQUEIRA *et al.*, 2005).

Note que a partir da aproximação apresentada em (2.47) não é possível escrever uma forma fechada para n. Como discutido em Siqueira *et al.* (2005), outras possíveis aproximações são baseadas nas distribuições Normal e t de Student central. Podem ser utilizados três enfoques: uso da função de distribuição completa, método conservador e método não conservador. A vantagem desses dois últimos métodos, tanto para a distribuição Normal e como para t de Student central, é que existem fórmulas para o cálculo do número de voluntários.

O poder e o nível de significância necessários no cálculo do tamanho de amostra são em geral fixados em 80% e 5%, mas a dificuldade aparece com a especificação das quantidades CV e θ_γ. Como em ensaios de bioequivalência é quase impossível a realização de estudo piloto, a especificação de CV_d (ou σ_d^2) deve ser obtida na literatura, mas tais publicações são muito escassas. Se perguntado, o patrocionador do estudo em geral diria que $\theta_\gamma = 0$, ou seja, as médias das formulações R e T são idênticas. Se θ_γ for assumido como sendo igual a zero e seu valor verdadeiro for por exemplo 0,05 haverá um impacto no poder do teste e a diferença estará perto de um dos limites de bioequivalência. Além disso, pode-se mostrar que à medida que $|\theta_\gamma|$ aumenta, n aumenta. Como na prática o verdadeiro valor θ_γ é desconhecido, uma atitude mais conservadora consiste em fazer um estudo de sensibilidade, isto é, considerar possíveis valores para θ_γ.

Quando se tem informações, provenientes de outros estudos ou da literatura, sobre o coeficiente de variação do fármaco pode-se utilizar o maior CV encontrado nos estudos, calcular uma média aritmética simples dos CVs encontrados ou ainda a média ponderada pelo número de participantes de cada estudo. Essas duas opções podem ser apropriadas se o CV originado for de estudos com amostras de tamanhos próximos.

O problema maior aparece quando não há informação disponível sobre a variabilidade ou quando esses valores não são confiáveis. A conseqüência da má especificação da variabilidade intra-individual pode levar à decisão incorreta da bioequivalência.

Como mostrado anteriormente, há uma relação entre o coeficiente de variação intra-individual (CV_d) na escala original e a variância intra-individual na escala logarítmica (σ_{d*}^2) que é dada por $CV_d = \sqrt{\exp\left\{\sigma_{d*}^2\right\} - 1}$.

Julious (2004) apresenta uma discussão sobre ensaios clínicos em que há incerteza na estimação da variabilidade. O autor ilustra o problema com um estudo de bioequivalência com delineamento *crossover* 2 x 2 em que foram recrutados 48 voluntários (o dobro do tamanho de amostra mais comum) e a conclusão sobre a bioequivalência não foi favorável, como mostrado na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Resultados do exemplo de um estudo de bioequivalência

	$\mathbf{2n}$	$\mathbf{CV_d(\%)}$	**Razão**	**IC (90%)**	Bioequivalência
ASC	45	47	1,10	(0,94 - 1,29)	Não
$Cmax$	47	41	1,05	(0,92 - 1,21)	Sim

A partir desses resultados a equivalência pode ser declarada para o $Cmax$ porém não para a ASC. Como as duas medidas deveriam estar dentro dos limites de bioequivalência (0,80; 1,25), conclui-se que o estudo fracassou e as duas formulações não foram consideradas bioequivalentes.

Um fator que parece ter causado o problema foi uma alta variabilidade observada que não era esperada.

Foi proposto na conferência *Bio-International* de 1989, e confirmado, em 1992, que fármacos exibindo variabilidade intra-individual de 30% ou mais deveriam ser classificados como altamente variáveis (NOëL *et al.*, 2003b). Uma conseqüência desta alta variabilidade é que um número inviável de voluntários pode ser necessário para poder concluir a bioequivalência de dois medicamentos. Assim, uma das soluções para o problema de Julious (2004) seria utilizar um delineamento *crossover* de ordem maior.

2.8 Identificação e tratamento de não-conformidades

Algumas ocorrências podem comprometer a conclusão do estudo de bioequivalência, tais como, cronograma de coleta inadequado, atrasos nas coletas, ocorrência de dados faltantes e presença de observações atípicas.

2.8.1 Cronograma de coleta

Uma questão muito importante em estudos de bioequivalência é a determinação das medidas farmacocinéticas precisamente. A maioria dos métodos para os testes de bioequivalência assumem que as medidas famacocinéticas foram medidas de forma eficaz, porém, os valores dessas variáveis dependem da curva de concentração plasmática versus tempo que é mensurada a partir de tempos de coletas pré-determinados. Devido a problemas éticos e financeiros, apenas um número limitado de pontos pode ser planejado. Assim, um cronograma de coleta apropriado é crucial para a exatidão com a qual as medidas farmacocinéticas serão medidas.

Para uma determinação adequada do cronograma de coleta são necessárias informações sobre as características farmacocinéticas do medicamento, tais como $Tmax$, $Cmax$ e $t_{1/2}$, essas medidas podem ser encontradas na literatura, por exemplo em Goodman & Gilman (2006).

Kong e Rene (2000) descrevem uma pesquisa sobre otimização para o cálculo do cronograma de coleta. O estudo de simulação desenvolvido pelos autores estima a ASC pelo método dos trapezóides, a partir dos os parâmetros K_a (constante de absorção), K_e (constante de eliminação) e Vd (volume de distribuição), que representam características dos indivíduos do estudo.

A curva de concentração versus tempo é dada por:

$$C(t) = \frac{DK_a}{Vd(K_a - K_e)}[e^{K_e t} - e^{K_a t}]. \tag{2.48}$$

Determinar o número de coletas é, na prática, de grande interesse. Embora aumentar o número de coletas normalmente melhora a exatidão da área sob a curva, também aumenta o trabalho e custo do centro de bioequivalência e pode ser um inconveniente para o voluntário.

Kong e Rene (2000) observaram que a exatidão da medida da ASC através do método dos trapezóides depende tanto da constante de absorção (K_a) quanto do número de coletas. Então, a partir de um estudo de simulação os autores sugerem que um número apropriado de coletas deve estar entre seis e oito coletas, além da coleta antes de administrar a medicação.

Outro problema referente ao cronograma de coleta é a diferença entre o tempo teórico e o tempo real de coleta. Para minimizar os atrasos nas coletas é feito um escalonamento entre os coletores para cada voluntário de sua responsabilidade. Ou seja, o coletor tem um tempo de deslocamento entre um voluntário e outro, sendo que cada grupo de voluntários receberá a medicação em tempos diferentes e a primeira coleta é o tempo zero (t_0) para todos os voluntários, como exemplificado na Tabela 2.6.

Tabela 2.6: Escalonamento de coletores

Coletores	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	t_0	t_1	$\cdots$
Voluntários	1	2	3	4	5	6	7	07:00	07:30	$\cdots$
	8	9	10	11	12	13	14	07:05	07:35	$\cdots$
	15	16	17	18	19	20	21	07:10	07:40	$\cdots$
	22	23	24	25	26	27	28	07:15	07:45	$\cdots$

Se mesmo usando o escalonamento de coletas ainda houver atrasos uma opção é utilizar o tempo real para calcular a área sob a curva de concentração plasmática versus tempo.

2.8.2 Dados faltantes

Alguns estudos de bioequivalência são prejudicados devido a perda de um ou mais valores de concentrações sanguíneas do fármaco. Essa perda pode ocorrer por motivos diversos, como a perda da veia do voluntário durante a coleta, o atraso excessivo na coleta para determinado tempo ou quebra de tubos durante a centrifugação ou nas fases seguintes.

A ausência desses dados pode gerar um vício na estimação das medidas farmacocinéticas, principalmente a ASC, e assim eventualmente afetar a decisão de bioequivalência.

Nesses casos, a legislação recomenda que a curva de concentração sanguínea seja obtida sem a interpolação do ponto faltante, o que não compromete a obtenção das medidas farmacocinéticas como ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$. Por outro lado, a ausência de uma amostra próxima ao pico de concentração máxima pode vir a comprometer a realidade dessa variável. De qualquer forma, devem sempre ser considerados os valores que foram de fato quantificados, não devendo existir

nenhum tipo de procedimento para a estimação dos valores faltantes. É importante ressaltar que o excesso de dados faltantes pode vir a comprometer a validade do estudo e de acordo com a ANVISA (RE N° 1170, 2006) não é permitida a falta de mais de 10% dos valores das concentrações sanguíneas do fármaco provenientes da administração de cada medicamento por voluntário.

Para investigar o impacto de dados faltantes, aqui denominados perfis incompletos, em estudos de bioequivalência Donner *et al.* (2005), consideraram um delineamento *crossover* com dois períodos. Primeiro pesquisaram para o nível de cobertura do intervalo bilateral de 90% de confiança para a razão das médias geométricas. Depois foi examinado o efeito de perfis incompletos na probabilidade de se concluir bioequivalência usando dois testes t unilaterais.

Assim, para investigar o impacto de dados faltantes no intervalo de estimação da razão das médias geométricas, foram feitas simulações. O cronograma de coleta foi fixado em 12 coletas nos seguintes horários: 0,0; 20'; 40'; 1; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0 e 16,0 horas.

Para cada um dos N indivíduos, os valores para os parâmetros K_a (constante de absorção), K_e (constante de eliminação) e Vd (volume de distribuição aparente) foram obtidos como realizações de três distribuições log-normais, cada uma com média e coeficiente de variação (CV) especificados. Todas as combinações de parâmetros investigadas são mostradas na Tabela 2.5.

Tabela 2.7: Valores dos parâmetros considerados no estudo de simulação de Donner *et al.* (2005)

	Parâmetros			CV			corr(ln K_e, lnVd)	
Situação	K_a	K_e	Vd	Inter	Intra	Ensaio	Inter	Intra
1	0,8	0,3	10	0,05	0,10	0	0	0
2	0,8	0,3	10	0,05	0,10	0,10	0,25	0,5
3	0,9	0,4	10	0,05	0,10	0	0	0
4	0,9	0,4	10	0,10	0,10	0,10	0,25	0,5

Foram consideradas situações em que $I = 1$, 2 ou 3 indivíduos de um total de $N = 15$, 20, 25 indivíduos apresentaram m medidas de concentração perdidas, sendo que m vai de 3 (25% de dados faltantes) até 9 (75% de dados faltantes). Os seguintes perfis incompletos foram simulados de acordo com a forma em que os valores de concentração foram perdidos para cada indivíduo:

1. Aleatória: perda completamente aleatória, isto é, que ocorre por razões não relacionadas à biodisponibilidade, ou de forma mais geral, a nenhum aspecto do delineamento do estudo;

2. Início: perda nos primeiros m pontos, $t_1, t_2, ..., t_m$;

3. Centro: perda nos pontos próximos ao $Tmax$ e nos $(m-1)/2$ valores de t imediatamente antes e depois deste ponto;

4. Final: perda nos últimos m pontos, $t_k, t_{k+1}, ..., t_{k-m+1}$.

Para cada uma das quatro situações, um intervalo de 90% de confiança para a razão das médias geométricas foi calculado usando os dados disponíveis de cada indivíduo. Um nível de cobertura variando entre 87,5% e 92,5% foi considerado como razoavelmente consistente com um nível nominal de 90%, isto é, foi permitido um desvio de 2,5% para cima ou para baixo.

Os principais resultados de Donner *et al.* (2005) são:

1. O nível de cobertura empírico observado quando todos os perfis estão completos ($I = m = 0$) são bem próximos do nível nominal de 90% (90,22%, 90,14% e 90,19% respectivamente para $N = 15$, 20 e 25).

2. O perfil que mais se aproxima ao coeficiente de confiança de 90% é aquele em que os dados faltantes são aleatórios. O perfil que menos se aproxima é aquele em que os dados faltantes estão no final do cronograma de coleta. Neste caso o nível de abrangência estimado é inadequado quando o número de dados faltantes por voluntário é de pelo menos quatro em um voluntário, ou de pelo menos três em dois voluntários.

3. Os outros dois perfis (dados faltantes no início e no centro do cronograma de coleta) são piores do que o perfil com dados faltantes que ocorrem de forma aleatória porém são menos drásticos que o perfil com dados faltantes no final da curva de concentração.

Os resultados encontrados nas simulações por Donner *et al.* (2005) mostram que o impacto de perfis incompletos para um intervalo de 90% de confiança para a razão das médias geométricas pode ser drástico mesmo quando há somente alguns dados faltantes, principalmente quando esses dados estão concentrados no final do cronograma de coleta.

2.8.3 Observações atípicas (*Outliers*)

Um dos problemas mais comuns em estudos de biodisponibilidade e de bioequivalência é que às vezes os conjuntos de dados apresentam observações extremamente altas ou baixas (*outliers*). Esses dados discrepantes podem ter um efeito muito prejudicial num estudo de bioequivalência. Resultados incluindo ou não as observações discrepantes podem ser totalmente diferentes em alguns casos.

Segundo Chow e Liu (2000) existem os seguintes tipos de *outliers*:

1. Observações inesperadas na curva de concentração plasmática versus tempo;

2. Valores extremamente altos ou baixos em uma das formulações;

3. Indivíduos que apresentam biodisponibilidade relativa muito acima ou muito abaixo em relação ao medicamento referência.

Uma observação discrepante pode causar impactos na estimação de θ_γ (influenciando sua posição relativa ao 0) e inflacionar a estimação da variância intra-individual (resultando num intervalo de confiança mais amplo que o esperado) ou ambos, dificultando assim a decisão de bioequivalência.

A legislação vigente recomenda estudar esses dados com muito cuidado, já que é muito difícil lidar com eles. Os *outliers* não devem ser excluídos do conjunto de dados com apenas um argumento estatístico. Por outro lado, se o *outlier* é resultado de um desvio do protocolo, retirá-lo do conjunto de dados pode ser justificado.

De qualquer forma, se não há uma evidência de desvio de protocolo, as agências reguladoras assumem que a causa do dado discrepante ou é devido ao fracasso do produto (talvez o comprimido dissolveu de uma maneira inesperada) ou é resultado da interação indivíduo-formulação (por exemplo, a formulação nova pode ser mais biodisponível que a formulação referência em alguns indivíduos). Ou ainda pode ser um evento aleatório, e não é possível diferenciar em qual dessas três categorias o dado se enquadra. Os estudos de bioequivalência média não são desenhados para distinguir as diferenças dos produtos em cada indivíduo e sim para comparar as médias das formulações (PATTERSON; JONES, 2006).

Assim, na análise comparativa de biodisponibilidade, sob a presença de *outliers* pode concluir pela não bioequivalência, quando na realidade, as formulações são bioequivalentes. Portanto, a seleção e os critérios de inclusão de um voluntário no estudo são determinantes no intuito tanto de evitar a presença de voluntários com comportamento atípico quanto de aumentar a homogeineidade da amostra.

Uma maneira de detectar um *outlier* potencial é a plotagem dos valores da medida farmacocinética (ASC, $Cmax$ ou $Tmax$) para todos os voluntários, do medicamento teste versus referência. O indivíduo é detectado caso o seu respectivo ponto apresente um grande desvio em relação à reta $y = x$. Como uma análise preliminar para a observação de potencias *outliers*, o gráfico apresentado na Figura 2.2 pode ser construído. Podemos observar na figura que o voluntário 2 exibe valores distintos para os medicamentos teste e referência.

Uma outra ferramenta visual bastante utilizada para a identificação de possíveis *outliers* é o gráfico tipo *box-plot*, este é construído de forma a fornecer informações sobre a simetria e variabilidade dos dados. Os pontos que estão a mais de 1,5 a distância entre o primeiro e o terceiro quartis são os *outliers*, como apresentado na Figura 2.3.

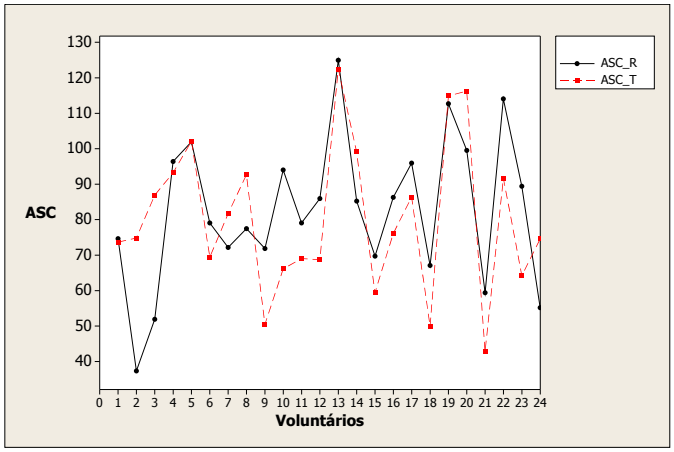


Figura 2.2: Área sob a curva de concentração plasmática dos 24 voluntários para cada uma das formulações

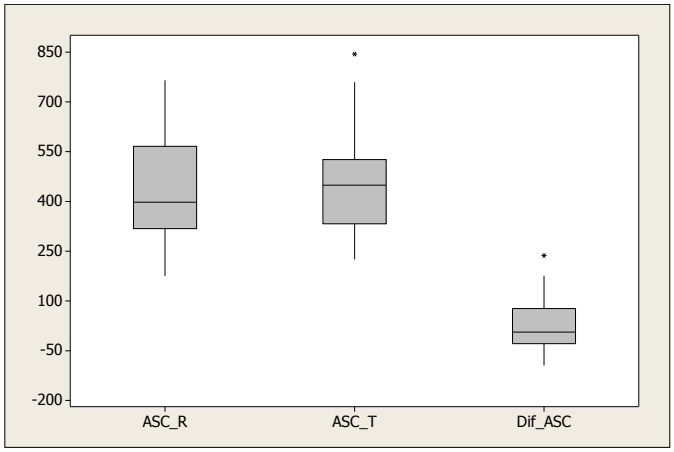


Figura 2.3: Box-plot das ASC dos medicamentos referência (ASC_R) e teste (ASC_T) e da diferença (Dif_ASC) entre essas áreas

Além das técnicas visuais, Chow e Liu (2000), apresentam outros métodos de identificação de observações atípicas.

- Teste de distância da verossimilhança

Esse teste detecta *outliers* em estudos de bioequivalência sob a hipótese nula de que não há efeito de período nem efeito de formulação, assim o modelo (2.1) se reduz a:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + e_{ij}, j = 1, ..., f; f = 1, ..., n. \tag{2.49}$$

Os parâmetros de interesse são μ, σ_s^2 e σ_e^2. Sendo $\theta = (\theta_1, \theta_2, \theta_3)'$ em que $\theta = \mu$, $\theta_2 = \sigma_e^2$ e $\theta_3 = \sigma_e^2 + f\sigma_s^2$. A função da log-verossimilhança é dada por:

$$L(\theta) = \frac{-nf}{2} log2\pi - \frac{n}{2} log(\theta_2 \theta_3^{f-1}) - \frac{1}{2\theta_3} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{f} (Y_{ij} - \theta_1)^2 - \frac{f}{2} \left(\frac{1}{\theta_2} - \frac{1}{\theta_3} \right) \sum_{i=1}^{n} (\bar{Y_i} - \theta_1)^2 \tag{2.50}$$

Os estimadores de máxima verossimilhança (emv) para esses parâmetros são:

$$\begin{aligned} \hat{\theta}_1 &= \bar{Y} = \frac{1}{nf} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{f} Y_{ij}, \\ \hat{\theta}_2 &= \frac{1}{n(f-1)} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{f} (Y_{ij} - \bar{Y_i})^2, \\ \hat{\theta}_3 &= \frac{f}{n} \sum_{i=1}^{n} (\bar{Y_i} - \bar{Y})^2. \end{aligned} \tag{2.51}$$

Na estatística $LD_i(\hat{\theta}) = 2[L(\hat{\theta}) - L(\hat{\theta}_{(i)})]$, os termos representam os valores da função (2.50) para os emv´s com e sem o i-ésimo indivíduo, que é considerado um *outlier* se $LD_i(\hat{\theta}) > \chi_3^2(\alpha)$.

- Teste da distância das estimativas

A estatística de distância estimada é bastante similar a estatística de distância da verossimilhança. Porém nesse caso é baseado na diferença da estimação dos parâmetros a partir da retirada da i-ésima observação e não na diferença na log-verossimilhança.

$$ED_i(\hat{\theta}) = f^2(\hat{\theta}_{(i)} - \hat{\theta})\hat{\Sigma}^{-1}(\hat{\theta}_{(i)} - \hat{\theta}), \tag{2.52}$$

em que $\hat{\Sigma}^{-1}$ é o estimador de máxima verossimilhança da matriz de variância:

$$\mathbf{\Sigma} = \begin{bmatrix} \frac{\theta_3}{n} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{2\theta_2^2}{n-1} & 0 \\ 0 & 0 & 2\theta_3^2 \end{bmatrix} \tag{2.53}$$

Sob a hipótese nula de ausência de efeitos de período e de formulação, $ED_i(\hat{\theta})$ tem como distribuição assintótica uma Qui-quadrado com três graus de liberdade. Assim, o i-ésimo indivíduo é um *outlier* se $ED_i(\hat{\theta}) > \chi_3^2(\alpha)$.

- Teste T^2 de Hotelling's

Esse teste tem como pressuposto a ausência de efeito de período, que a estrutura de covariância para as f's repostas do indivíduo i é esférica e que só exista uma observação atípica. Primeiro define-se $D_i^2 = (Y_i - \bar{Y}_i)^t A_{-1}^{-1}(Y_i - \bar{Y}_i)$, sendo $\bar{Y}$ e A são respectivamente a média e a matriz da soma dos quadrados e produtos cruzados de $Y_1, ..., Y_n$.

A estatística T^2 de Hotelling's para o i-ésimo indivíduo é dada por:

$$T_i^2 = \frac{(n-2)D_i^2}{\left[\frac{n-1}{n} - D_i^2\right]}. \tag{2.54}$$

Para nível de significância α, o i-ésimo indivíduo é considerado um *outlier* se $T_i^2 = max_j(T_j^2) > T_{(\alpha)}^2$ sendo T_α^2 o α-ésimo quantil superior da distribuição do máximo de T_i^2 para f formulações e n indivíduos.

Ramsay e Elkum (2005) comparam os três métodos apresentados acima e um quarto método desenvolvido por Wang e Chow (2003). Esse método é baseado na função de verossimilhança correspondente ao modelo da média deslocada para a resposta do i-ésimo indivíduo para a j-ésima formulação, que é dado por:

$$y_{ij} = \mu + S_i + F_j + \lambda_j \delta_{it} + e_{ij}. \tag{2.55}$$

Esse modelo é na realidade uma modificação do teste de distância da Verossimilhança, em que o efeito de período é zero e λ_j representa o efeito mean-shift. Assim como nos modelos anteriores, S_i e e_{ij} são independentes e normalmente distribuídos com média zero e variâncias σ_s^2 e σ_e^2 respectivamente. A variável indicadora δ_{it} é zero exceto quando $i = t$ nesse caso seu valor é um. Dado que e_t representa o vetor de resíduos para o t-ésimo induvíduo depois de ajustado o modelo e que $\bar{e}_t$ representa a média de e_t, foram definidas as seguintes quantidades:

$$T_{1n} = \frac{(e_t - \bar{e}_t)'(e_t - \bar{e}_t)}{\sum_s (e_s - \bar{e}_s)'(e_t - \bar{e}_t)} \text{ e } T_{2n} = \frac{\bar{e}_t^2}{\sum_s \bar{e}_s^2}. \tag{2.56}$$

A estatística de teste $D_t = nT_{1n} + nT_{2n}$ pode ser usada para dizer se o t-ésimo indivíduo é ou não um *outlier*.

Com o intuito de investigar a performance desses quatro testes Ramsay e Elkum (2005) fizeram um extensivo conjunto de simulações que testava em cada método a habilidade de detectar *outliers* em vários conjuntos de dados gerados aleatoriamente.

O resultados das simulações mostraram que o teste da distância das estimativas para a detecção de observações atípicas é notavelmente superior aos outros três testes em estudos de bioequivalência *crossover* 2 x 2.

2.9 Exemplos

Nesta seção serão apresentados três exemplos que ilustram as inferências estatísticas para os efeitos fixos do modelo. Também serão expostos três exemplos da literatura de situações que podem ocorrer em estudos de bioequivalência, todos com um delineamento *crossover* 2 x 2.

Exemplo 1: Testes preliminares à avaliação de bioequivalência para *ASC*

Antes da avaliação da bioequivalência, alguns testes devem ser realizados para determinar o efeito da formulação e para verificar se houve efeito residual e/ou de período. Para estabelecer esses efeitos é feita uma ANOVA e seus os resultados são apresentados a seguir:

Tabela 2.8: Exemplo 1: Análise de variância para *ASC*

Fonte	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**	**p**
Inter-individual					
Residual (Sequência)	1	276,00	276,00	0,37	0,5469
Resíduos (inter)	22	16211,49	736,89	4,41	0,0005
Intra-individual					
Formulação	1	62,79	62,79	0,38	0,5463
Período	1	35,97	35,97	0,22	0,6474
Resíduos (intra)	22	3679,43	167,25		
Total	47	20265,68			

Conclui-se que os efeitos de seqüência ($p = 0,5468$), de período ($p = 0,6474$) e da formulação ($p = 0,5463$) não são significantivos. Essa ANOVA foi feita utilizando os dados apresentados na página 73 de Chow e Liu (2000).

Exemplo 2: Presença de efeito de seqüência para $Cmax$

Tabela 2.9: Exemplo 2: Análise de variância com efeito de seqüência para $Cmax$

Fonte	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**	**p**
Inter-individual					
Residual (Sequência)	1	0,4492	0,4492	5,4030	0,0288
Resíduos (inter)	24	1,9953	0,0831		
Intra-individual					
Formulação	1	0,1342	0,1342	2,2644	0,1454
Período	1	0,0999	0,0999	1,5597	0,2065
Resíduos (intra)	24	1,4229	0,0592		
Total	51	4,1364			

Neste caso podemos observar um efeito de seqüência ($p = 0,0288$) na análise do $Cmax$. Como discutido anteriormente esse efeito pode ser desconsiderado quando se trata de um estudo *crossover* 2 x 2 de dose única, que envolve apenas voluntários sadios, o fármaco não é uma substância endógena, o período de eliminação foi adequado, as amostras de pré-dosagem não apresentam qualquer nível de fármaco detectável em todos os voluntários e o estudo satisfaz todos os critérios científicos e estatísticos.

Exemplo 3: Presença de efeito de período na análise da ASC

Tabela 2.10: Exemplo 3: Análise de variância com efeito de período para ASC

Fonte	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**	**p**
Inter-individual					
Residual (Sequência)	1	0,0008	0,0008	0,0119	0,9138
Resíduos (inter)	25	1,7021	0,0680		
Intra-individual					
Formulação	1	0,0249	0,0249	1,5912	0,2187
Período	1	0,0666	0,0666	4,2489	0,0498
Resíduos (intra)	25	0,3918	0,0156		
Total	53	2,1930			

Conclui-se que os efeitos de seqüência ($p = 0,9138$) e da formulação ($p = 0,2187$) não são significantivos. Porém efeito de período mostrou significância limítrofe ($p = 0,0498$). No entanto, como será mostrado adiante a presença de efeito de período não prejudica a avaliação da bioequivalência.

Exemplo 4: Bioequivalente quanto às três medidas farmacocinéticas (ASC, $Cmax$ e $Tmax$)

A fase seguinte aos testes preliminares é a avaliação da bioequivalência. Neste exemplo será apresentada uma situação em que as três principais medidas farmacocinéticas (ASC, $Cmax$ e $Tmax$) são declaradas bioequivalentes. Os resultados dos intervalos de confiança para a ASC e para o $Cmax$ são os seguintes:

Tabela 2.11: Exemplo 4: Conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$

Variável	Nº de voluntários	IC (90%)	Resultado
$lnASC$	24	(-0,0258; 0,0007)	Bioequivalentes
$lnCmax$	24	(-0,0048; 0,0297)	Bioequivalentes
ASC	24	(0,99; 1,14)	Bioequivalentes
$Cmax$	24	(0,99; 1,17)	Bioequivalentes

Os resultados do teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney para a diferença entre as médias do $Tmax$, em que W é a estatística de teste e w_α é o percentil da distribuição da estatística, são apresentados a seguir:

Tabela 2.12: Exemplo 4: Conclusão de bioequivalência para $Tmax$

Hipóteses	W	w_α	Resultado
$H_a : -0,38 < T - R < 0,38$			
$H_{01} : T - R \leq -0,38$	112	101	Bioequivalentes
$H_{02} : T - R \geq 0,38$	-14	43	Bioequivalentes

Como o intervalo de 90% de confiança para a razão das médias, da ASC e do $Cmax$, na escala original ou a diferença das médias na escala logarítmica, cai inteiramente dentro de limites pré-especificados e na análise de $Tmax$ 112 $>$ 101 e -14 $<$ 43, conclui-se pela bioequivalência média entre o medicamento referência e o medicamento teste.

Exemplo 5: Bioequivalente quanto a apenas uma das medidas farmacocinéticas (ASC ou $Cmax$)

Neste caso, o limite superior do intervalo de 90% de confiança para ASC ultrapassa o limite

superior de bioequivalência. Conclui-se então que as duas formulações não são bioequivalentes, tanto para a escala original ou para a escala logarítmica.

Tabela 2.13: Exemplo 5: Conclusão de bioequivalência apenas para ASC

Variável	Nº de voluntários	IC (90%)	Resultado
$lnASC$	45	(-0,0610; 0,2550)	Não Bioequivalentes
$lnCmax$	47	(-0,0871; 0,1887)	Bioequivalentes
ASC	45	(0,94; 1,29)	Não Bioequivalentes
$Cmax$	47	(0,92; 1,21)	Bioequivalentes

Exemplo 6: Bioequivalência em relação à ASC e ao $Cmax$, porém não bioequivalente em relação ao $Tmax$.

Tabela 2.14: Exemplo 6: Conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$

Variável	Nº de voluntários	IC (90%)	Resultado
$lnASC$	30	(-0,0108; 0,0032)	Bioequivalentes
$lnCmax$	30	(-0,0349; 0,0027)	Bioequivalentes
ASC	30	(0,99; 1,00)	Bioequivalentes
$Cmax$	30	(0,97; 1,00)	Bioequivalentes

Neste exemplo, o intervalo de (90%) de confiança para a razão das médias, da ASC e do $Cmax$, na escala original ou a diferença das médias na escala logarítmica, cai inteiramente dentro de limites pré-especificados.

Os resultados para a diferença entre as médias para $Tmax$ são apresentados a seguir:

Tabela 2.15: Exemplo 6: Conclusão de não-bioequivalência para $Tmax$

Hipóteses	W	w_α	Resultado
$H_a : -0,48 < T - R < 0,48$			
$H_{01} : T - R \leq -0,48$	165	152	Bioequivalentes
$H_{02} : T - R \geq 0,48$	99	73	Não Bioequivalentes

Como $165 > 152$ e $99 > 73$, não é possível concluir pela bioequivalência média entre o medicamento referência e o medicamento teste. A análise de $Tmax$ pode ser descartada quando essa medida for considerada clinicamente irrelevante.

3 *Estudos de simulações*

Em geral, a metodologia estatística de livros e textos acadêmicos restringe-se às abordagens mais usuais e simplificadas. Na prática aparecem vários problemas, tais como a violação de pressupostos dos métodos, além da ocorrência de não-conformidades. Surgem então várias perguntas sobre como lidar com tais situações. Outro questionamento recorrente é se as regras vigentes dos órgãos reguladores são realmente razoáveis, se podem ser flexibilizadas ou devem ser adaptadas em certas circunstâncias. A dificuldade é que na maioria das vezes as soluções destes problemas não são triviais e soluções analíticas não são possíveis ou fáceis de serem obtidas. Uma alternativa interessante, apesar de suas limitações, é a realização de estudos de simulação.

Neste capítulo são apresentados os estudos de simulação que foram realizados com o intuito de discutir questões práticas ligadas ao planejamento e à análise dos dados de um estudo de bioequivalência em que o delineamento experimental é do tipo *crossover* 2 x 2. São consideradas situações em que há ou não controle do que será simulado - por exemplo é possível planejar um determinado número de participantes, mas é impossível prever ou evitar desistências ou comportamentos atípicos quanto às concentrações dos fármacos. O enfoque será sobre a conclusão de bioequivalência em condições ideais ou não, ou seja, quando há presença de efeitos de período, de seqüência, residual, ocorrência de comportamentos atípicos, grande variabilidade e incerteza na estimativa da variabilidade. Em termos mais técnicos, será avaliado o impacto dos diferentes parâmetros do modelo e da violação de seus pressupostos nas conclusões dos estudos. Através das simulações também é possível avaliar empiricamente propriedades das medidas farmacocinéticas, comparando suas variabilidades.

Foram realizados dois tipos de estudos: no primeiro a medida farmacocinética foi gerada diretamente, enquanto que no segundo foi gerada a curva de concentração individual, a partir da qual obviamente é possível calcular as medidas farmacocinéticas. No primeiro tipo, as interpretações dos resultados não dependem da medida farmacocinética (ASC e $Cmax$) e assim foi escolhido ASC. O segundo tipo apresenta características interessantes, já que é possível avaliar a conclusão sobre bioequivalência com relação a apenas uma medida farmacocinética (ASC ou $Cmax$) ou a ambas (ASC e $Cmax$), sendo este último o que a ANVISA determina. Além disso, é possível estudar questões ligadas ao cronograma de coleta, tais como número de coletas, perdas ou atrasos de coletas (esses dois últimos aspectos não foram explorados nesse trabalho).

As notações são as mesmas utilizadas nos capítulos anteriores e se necessário, elas serão relembradas ou definidas. Para que as conclusões fossem mais próximas da realidade, a escolha dos parâmetros foi cuidadosa e na medida do possível baseada em dados reais. O número total de voluntários ($2n$) considerado variou de 12 (mínimo permitido pela ANVISA) a 30, valores escolhidos por serem os que mais aparecem na prática. Em todos os casos os dados foram gerados sob a hipótese de bioequivalência e supondo balanceamento completo e/ou nenhuma perda, isto é, o mesmo número de voluntários em cada seqüência ($n_1 = n_2 = n$) e o mesmo número de coleta para cada voluntário.

A seguir são apresentados os detalhes das simulações, bem como os resultados obtidos. A implementação computacional foi feita em Linguagem C, sendo que o número de réplicas adotado em todos os estudos foi 10000.

3.1 Simulação da medida farmacocinética

Nesta seção será discutida a influência da presença dos efeitos residual, da formulação e de período sobre a conclusão de bioequivalência, além das conseqüências de uma alta variabilidade inter-individual e/ou intra-individual na conclusão de bioequivalência, na ausência e na presença de *outliers*.

Será tratado também o problema da má especificação do parâmetro referente à variabilidade, necessário no cálculo do tamanho da amostra, cuja a principal consequência é a conclusão incorreta sobre a bioequivalência. Para avaliar o déficit e o excesso do número de voluntários quando há incerteza da estimativa da variabilidade em estudos de bioequivalência, foram simuladas várias situações nas quais os resultados foram obtidos através de aplicação de fórmulas. Dando continuidade foi investigado o impacto dessa escolha errada sobre a conclusão de bioequivalência, nesse caso por meio de simulações de Monte Carlo.

Para gerar a medida farmacocinética segundo um delineamento *crossover* 2 x 2 foi utilizado o modelo seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + e_{ijk}, \text{ com } i = 1, 2, \ldots, n_k \text{ e } j, k = 1, 2, \tag{3.1}$$

cujos termos e os parâmetros σ_s e σ_e, associados à parte aleatória do modelo, estão definidos no capítulo anterior. As diferenças dos efeitos fixos referentes ao período e à formulação serão denotadas por P e F, respectivamente. Se Y for expresso na escala logarítmica, a notação será acrescida de um asterisco.

Para as simulações foram utilizados os parâmetros média (μ_*), variação inter-individual (σ_{s*}) e variação intra-individual (σ_{e*}), baseados em vários bancos de dados. Como todos resultados

seguem um mesmo padrão de comportamento, os resultados mostrados são referentes aos dados da página 73 de Chow e Liu (2000) mostrados no Anexo. Assim, para a escala logarítmica: $\mu_* = 4,37$, $\sigma_{e*} = 0,19$ (correspondente a $\sigma_{d*} = 0,1344$ e $CV_d = 13,50\%$) e $\sigma_{s*} = 0,20$. Sendo $\sigma_{e*} = 0,19$, para atingir um poder de teste de 80%, seriam necessários um total de 16 voluntários.

Foi gerada a medida farmacocinética ASC segundo uma distribuição log-normal, em um estudo com $2n = 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30$ voluntários. Assim, na escala logarítmica, foram testados os efeitos residual, da formulação e de período para todos os conjuntos de dados. Também foi construído o intervalo de 90% de confiança para a diferença das médias do medicamento teste e do referência e feitos os cálculos para os dois testes de hipóteses unilaterais de Schuirmann.

3.1.1 Conclusão de bioequivalência

Para entender o impacto da alta variabilidade inter e intra individual e a influência dos efeitos residual, da formulação e de período na conclusão de bioequivalência, foram feitas simulações de várias situações.

Ao comparar a posição do intervalo de confiança em relação ao intervalo de bioequivalência (θ_I, θ_S), existem seis possibilidades. Apenas no primeiro caso o intervalo de confiança está totalmente dentro do intervalo de bioequivalência e a conclusão é de bioequivalência, no segundo caso o limite superior do intervalo de 90% de confiança está acima do limite de bioequivalência, no terceiro caso p limite inferior do intervalo construído está abaixo do limite inferior de bioequivalência, no quarto caso o intervalo de 90% de confiança está totalmente abaixo do intervalo de bioequivalência e no quinto caso totalmente acima, já no sexto caso o intervalo de bioequivalência está contido no intervalo de 90% de confiança construído.

Os percentuais observados das seis possibilidades e de ausência de diferença entre os períodos (P) e entre as formulações (F) quando $\mu_* = 4,37$, $\sigma_{e*} = 0,19$, $\sigma_{s*} = 0,20$, $\theta_\gamma = 0,00$, nível de significância de 5%, são apresentados na Tabela 3.1.

Por exemplo, para $\sigma_{e*} = 0,19$ e 80% de poder seria necessário um total de 16 voluntários, 86,75% dos estudos seriam considerados bioequivalentes, ou seja, o intervalo de 90% de confiança construído está totalmente dentro dos limites de bioequivalência. Os casos em que não se conclui por bioequivalência estão divididos em duas situações, em 6,49% dos estudos o limite superior do intervalo construído está acima do limite superior de bioequivalência e em 6,76% estariam abaixo do limite inferior de bioequivalência.

Tabela 3.1: Percentuais de conclusão de bioequivalência e dos efeitos residual (Er), da formulação (Ef) e de período (Ep)

$2n$							Er	Ef	Ep
12	69,83	15,24	14,87	0,00	0,00	0,06	4,94	4,79	5,26
14	80,12	10,01	9,87	0,00	0,00	0,00	4,92	4,87	4,98
16	86,75	6,49	6,76	0,00	0,00	0,00	4,66	4,70	5,28
18	91,49	4,21	4,30	0,00	0,00	0,00	5,31	4,72	5,33
20	94,73	2,57	2,70	0,00	0,00	0,00	4,65	4,91	4,88
22	96,73	1,73	1,54	0,00	0,00	0,00	5,05	4,73	5,06
24	97,86	1,08	1,06	0,00	0,00	0,00	5,35	5,01	4,96
26	98,56	0,74	0,70	0,00	0,00	0,00	5,14	4,79	5,19
28	99,16	0,47	0,37	0,00	0,00	0,00	4,81	5,32	4,91
30	99,48	0,29	0,23	0,00	0,00	0,00	5,04	5,10	4,85

$2n$ = número total de voluntários

Intervalo de confiança ( ); Intervalo de bioequivalência ( )

Para a recomendação da ANVISA de no mínimo um total de 24 voluntários, a conclusão de bioequivalência sobe para 97,86%. Pode-se observar ainda que os efeitos residual, da formulação e de período, para todos valores de $2n$, aparecem em aproximadamente 5% das vezes, o que já era esperado já que este é o nível de significância do teste.

Com o intuito de testar a influência do efeito de período na conclusão de bioequivalência, foram testados valores de P de 0,00 a 0,30 (com incremento de 0,01), para $\alpha = 0,05$, sem alterar os outros parâmetros. Todos os valores foram testados para P_1 (primeiro período) e para P_2 (segundo período) e como os resultados são praticamente iguais, serão apresentados apenas os valores para P_1. O mesmo foi feito com F para testar o efeito da formulação sobre a conclusão de bioequivalência. Foram testadas também várias combinações de efeito de período com efeito da formulação. Resultados selecionados estão mostrados nas Tabelas 3.2 e 3.3.

Podemos observar que os resultados de conclusão de bioequivalência são exatamente iguais, o que significa que a presença de efeito de período não interfere na conclusão de bioequivalência. Já a presença de efeito da formulação prejudica a conclusão de bioequivalência, pois há uma redução acentuada dos percentuais. Por exemplo, com 24 voluntários, sem acrescentar uma diferença no efeito da formulação, tem-se 97,86% de conclusão de bioequivalência e 5,01% de efeito de formulação como era previsto, quando há uma diferença entre as formulações de 0,10 (F = 0,10), a conclusão de bioequivalência cai para 69,97% dos casos e o efeito de formulação aumenta para 41,87%. Quando os efeitos de período e da formulação foram combinados, obtiveram-se os mesmos resultados apresentados na Tabela 3.3, ou seja, quando só se tinha efeito da formulação.

Tabela 3.2: Percentuais de conclusão de bioequivalência (BE) e da presença do efeito de período (Ep)

	P = 0,00		P = 0,05		P= 0,10		P = 0,15		P = 0,20	
$2n$	BE	Ep	BE	Ep	BE	Ep	BE	Ep	BE	Ep
12	69,83	5,26	69,83	9,06	69,83	21,82	69,83	44,46	69,83	64,28
14	80,12	4,98	80,12	9,93	80,12	25,04	80,12	48,54	80,12	72,48
16	86,75	5,28	86,75	10,66	86,75	28,71	86,75	55,02	86,75	79,12
18	91,49	5,33	91,49	12,17	91,49	31,89	91,49	60,52	91,49	83,97
20	94,73	4,88	94,73	12,15	94,73	34,91	94,73	65,26	94,73	88,38
22	96,73	5,06	96,73	13,21	96,73	38,00	96,73	70,85	96,73	91,09
24	97,86	4,96	97,86	14,28	97,86	41,31	97,86	74,17	97,86	93,39
26	98,56	5,19	98,56	15,32	98,56	44,87	98,56	77,85	98,56	95,08
28	99,16	4,91	99,16	15,43	99,16	47,86	99,16	81,00	99,16	96,61
30	99,48	4,85	99,48	16,84	99,48	50,38	99,48	83,59	99,48	97,64

$2n$ = número total de voluntários, P: diferença do efeito de período

Tabela 3.3: Percentuais de conclusão de bioequivalência (BE) e da presença do efeito da formulação (Ef)

	F = 0,00		F = 0,05		F = 0,10		F = 0,15		F = 0,20	
$2n$	BE	Ef	BE	Ef	BE	Ef	BE	Ef	BE	Ef
12	69,83	4,79	67,37	9,16	42,42	22,26	22,16	41,80	8,46	63,71
14	80,12	4,87	71,10	9,56	48,82	24,50	25,14	48,03	9,05	72,28
16	86,75	4,70	78,18	10,17	54,38	27,87	27,95	54,39	9,32	79,01
18	91,49	4,72	82,93	11,42	59,53	31,41	29,94	60,19	9,58	84,10
20	94,73	4,91	86,80	12,17	63,09	35,14	31,98	65,48	10,57	88,24
22	96,73	4,73	89,58	13,41	66,95	38,29	34,12	70,30	10,04	91,72
24	97,86	5,01	91,95	14,29	69,97	41,87	36,12	74,59	10,78	93,75
26	98,56	4,79	94,16	14,43	73,97	44,26	38,60	78,18	10,94	95,23
28	99,16	5,32	95,05	16,41	75,75	47,67	39,88	82,32	10,80	96,76
30	99,48	5,10	96,11	16,94	79,19	50,31	41,93	84,61	11,51	97,73

$2n$ = número total de voluntários, F: diferença de efeito da formulação

A Tabela 3.4 mostra os percentuais de conclusão de bioequivalência quando ocorre ou não efeito da formulação e percentuais de conclusão de não-bioequivalência na presença ou não de efeito da formulação, para F = 0,00. Os resultados das quatro situações dependem do total de voluntários ($2n$), se $2n$ aumenta as situações 1 (BE^+F^+) e 2 (BE^+F^-) aumentam e 3 (BE^-F^+) e 4 (BE^-F^-) diminuem. A situação mais esperada é BE^+F^-, se não há efeito da formulação possivelmente os fármacos são bioequivalentes. Deve-se notar que o fato de não haver efeito da

formulação não implica na bioequivalência entre os medicamentos.

Observa-se que a presença de efeito da formulação não invalida o estudo, poucas situações (máximo de 3,72%) os efeitos da formulação estavam presentes e foi declarado não-bioequivalência. O teste de igualdade de médias das duas formulações é mais exigente do que o teste usado na avaliação da bioequivalência, que permite que a diferença das médias esteja dentro do intervalo de bioequivalência.

Tabela 3.4: Percentuais de conclusão de bioequivalência (BE) e na presença ou ausência de efeito da formulação (Ef) para $F = 0,00$

$2n$	BE	Ef	BE^+F^+	BE^+F^-	BE^-F^+	BE^-F^-
12	69,83	4,79	1,07	68,76	3,72	26,45
14	80,12	4,87	1,16	78,96	3,71	16,17
16	86,75	4,70	1,70	85,05	3,00	10,25
18	91,49	4,72	1,85	89,64	2,87	5,64
20	94,73	4,91	2,56	92,17	2,35	2,92
22	96,73	4,73	2,86	93,87	1,87	1,40
24	97,86	5,01	3,51	94,35	1,50	0,64
26	98,56	4,79	3,63	94,93	1,16	0,28
28	99,16	5,32	4,58	94,58	0,74	0,10
30	99,48	5,10	4,64	94,84	0,46	0,06

$2n$ = número total de voluntários,

BE^+: bioequivalente, BE^-: não bioequivalente,

F^+: presença de efeito da formulação

F^-: ausência de efeito da formulação

Seguindo essa mesma idéia vários valores para a variação intra-individual σ_{e*} (0,19 a 0,65 com incremento de 0,01) e para a variação inter-individual σ_{s*} (0,20 a 1,00 com incremento de 0,10) foram testados. A Tabela 3.5 mostra os percentuais de bioequivalência para vários valores de σ_{e*}.

A partir da análise dos resultados apresentados na Tabela 3.5, pode-se observar que um aumento no valor de σ_{e*}, em geral, é decorrente de um planejamento inadequado, podendo comprometer o estudo, ou seja, quando há uma alta variabilidade deve-se optar por um número bem maior de voluntários ou por um delineamento diferente do *crossover* 2 x 2.

Mesmo para valores altos de σ_{s*} não houve nenhuma alteração na conclusão de bioequivalência (permanecendo os mesmos valores apresentados na Tabela 3.1), o que se deve ao fato de que cada indivíduo é controle dele mesmo e então a avaliação de bioequivalência é baseada na variabilidade intra-individual.

Tabela 3.5: Percentuais de conclusão de bioequivalência (BE) para vários valores de σ_{e*}

$2n$	$\sigma_{e*} = 0{,}19$	$\sigma_{e*} = 0{,}24$	$\sigma_{e*} = 0{,}29$	$\sigma_{e*} = 0{,}34$	$\sigma_{e*} = 0{,}39$	$\sigma_{e*} = 0{,}44$
12	69,83	37,27	16,84	6,82	2,71	1,16
14	80,12	50,51	25,14	10,69	4,19	1,63
16	86,75	60,86	34,46	16,17	6,57	2,44
18	91,49	69,73	43,10	22,49	10,10	3,71
20	94,73	76,17	51,32	28,99	13,66	5,41
22	96,73	81,90	59,29	35,57	18,10	7,93
24	97,86	86,07	64,70	42,43	24,08	10,52
26	98,56	89,44	71,33	49,37	29,02	14,08
28	99,16	91,97	75,35	54,38	34,43	18,20
30	99,48	93,69	79,98	60,12	39,99	22,72

$2n$ = número total de voluntários

$\sigma_{e*} = 0,19 \Leftrightarrow (CV_d = 13,50\%)$, $\sigma_{e*} = 0,24 \Leftrightarrow (CV_d = 17,09\%)$, $\sigma_{e*} = 0,29 \Leftrightarrow (CV_d = 20,73\%)$

$\sigma_{e*} = 0,34 \Leftrightarrow (CV_d = 24,39\%)$, $\sigma_{e*} = 0,39 \Leftrightarrow (CV_d = 28,11\%)$, $\sigma_{e*} = 0,44 \Leftrightarrow (CV_d = 31,88\%)$

Combinações dos efeitos de período e da formulação com vários valores para variações inter e intra-individual também foram testadas. Mesmo na presença de efeitos de período e/ou da formulação, um aumento na variação inter-individual não altera a conclusão de bioequivalência. O mesmo pode-se dizer para o efeito de período na presença de uma alta variabilidade intra-individual, isto é, têm os mesmos resultados apresentados na Tabela 3.2. Porém a combinação entre o efeito da formulação e uma variabilidade intra-individual mais alta leva a uma queda ainda maior na conclusão de bioequivalência como pode ser observado na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Percentuais de conclusão de bioequivalência (BE) e da presença do efeito da formulação (Ef) para situações de alta variabilidade inter-individual (σ_{e*})

	$\sigma_{e*} = 0{,}24$ F = 0,05		$\sigma_{e*} = 0{,}24$ F = 0,10		$\sigma_{e*} = 0{,}29$ F = 0,05		$\sigma_{e*} = 0{,}29$ F = 0,10	
$2n$	BE	Ef	BE	Ef	BE	Ef	BE	Ef
12	34,69	7,38	25,32	16,06	15,87	6,52	12,94	12,33
14	45,43	8,06	31,90	16,75	23,51	7,20	18,20	13,07
16	54,23	8,26	37,78	19,38	31,15	7,14	23,14	14,72
18	61,66	8,87	42,47	21,94	39,56	7,56	28,14	16,36
20	67,75	9,60	45,64	23,52	46,00	8,30	32,35	17,49
22	72,85	9,96	49,85	25,83	52,74	8,39	36,44	19,48
24	76,79	10,77	52,38	28,16	57,71	8,76	39,26	21,09
26	80,94	10,74	55,90	30,09	62,67	8,82	42,67	21,76
28	82,48	12,15	58,51	32,94	66,10	9,90	44,96	24,37
30	85,60	12,41	61,51	34,52	70,83	10,06	47,86	25,27

$2n$ = número total de voluntários, F: diferença de efeito da formulação

3.1.2 Presença de observações atípicas

Uma questão é se a presença de *outliers* pode levar a uma conclusão de não bioequivalência, quando na realidade as formulações são bioequivalentes, ou o contrário. Para investigar essa situação foram feitas simulações em que os dados foram gerados na ausência e na presença de um ou dois *outliers*. Foram considerados vários casos de presença de *outliers*, somente no medicamento referência, somente no teste ou em ambos. Sem perda de generalidade, os *outliers* foram gerados apenas em um período para as duas seqüências.

Foram utilizados duas formas para gerar os *outliers*, a primeira foi baseada no gráfico *box-plot*, ou seja, foram consideradas observações atípicas os pontos que estão a mais de 1,5 de distância a partir do primeiro ou do terceiro quartil. A outra forma foi utilizando um dos critérios propostos por Ramsay e Elkum (2005): os *outliers* foram criados adicionando um valor Q_{s_f} para a resposta de um ou dois voluntários, sendo $s_f = \sqrt{\sigma^2_{s*} + \sigma^2_{e*}}$ o erro padrão da resposta da formulação e Q a constante que controla quão discrepante será o *outlier*. Para Q foram escolhidos os valores de 0, 3 e 5. Foram consideradas as seguintes situações: sem observações atípicas, com apenas um *outlier* no medicamento referência (1R), no medicamento teste (1T), em ambos (1R1T), para dois *outliers* no referência (2R), no teste (2T), dois no referência e um no teste (2R1T), dois no teste e um no referência (2T1R) e dois em ambos (2R2T). Os resultados das simulações referentes à conclusão de bioequivalência são apresentados na Tabela 3.7 utilizando o critério do *box-plot* e na Tabela 3.8 os resultados utilizando o critério sugerido por Ramsay e Elkum (2005).

Tabela 3.7: Percentuais de conclusão de bioequivalência no estudo da presença de *outliers* utilizando o critério do *box-plot*

	Presença de *outliers**								
$2n$	Nenhum	1R	1T	1R1T	2R	2T	2R1T	1R2T	2R2T
12	69,83	44,40	43,81	27,57	26,20	25,14	15,75	15,77	8,35
14	80,12	59,42	58,69	41,38	40,92	41,77	27,87	28,33	19,25
16	86,75	71,56	70,37	57,11	56,57	55,58	42,58	42,71	31,64
18	91,49	80,04	79,74	68,17	68,48	67,46	56,61	55,51	46,13
20	94,73	86,74	86,06	76,79	76,84	76,76	67,65	67,68	58,04
22	96,73	91,24	91,02	84,31	84,23	83,60	76,13	75,81	67,93
24	97,86	94,10	94,10	89,15	88,62	88,96	82,50	82,76	75,97
26	98,56	96,26	96,24	92,35	92,60	92,78	88,33	87,74	82,52
28	99,16	97,28	97,49	95,02	95,22	95,05	92,01	91,32	87,47
30	99,48	98,24	98,34	96,54	96,56	96,65	94,57	94,08	91,80

$2n$ = número total de voluntários

* número de *outliers*; R=Referência e T=Teste

Tabela 3.8: Percentuais de conclusão de bioequivalência no estudo da presença de *outliers* utilizando o critério sugerido por Ramsay e Elkum (2005)

		Presença de outliers*								
Q	$2n$	Nenhum	1R	1T	1R1T	2R	2T	2R1T	1R2T	2R2T
0	12	69,83	64,03	64,30	58,72	58,71	58,81	54,14	54,68	48,78
	14	80,12	76,11	75,76	71,71	72,53	70,70	67,76	68,04	63,42
	16	86,75	84,27	83,44	81,11	81,63	81,19	78,08	77,66	74,90
	18	91,49	89,45	89,67	87,44	87,90	87,23	85,85	85,28	82,95
	20	94,73	92,97	93,25	91,91	91,75	91,77	90,35	90,01	88,62
	22	96,73	95,96	95,57	94,72	94,78	94,75	93,96	93,65	92,36
	24	97,86	97,14	97,25	96,56	96,42	96,33	95,99	95,79	95,14
	26	98,56	98,21	98,31	98,00	97,70	97,97	97,41	97,34	96,97
	28	99,16	98,82	98,94	98,62	98,65	98,64	98,26	98,31	97,84
	30	99,48	99,41	99,31	99,13	99,20	99,28	98,87	99,02	98,84
3	12	69,83	29,55	29,01	15,98	9,27	9,14	6,58	6,66	4,11
	14	80,12	43,60	43,68	30,01	16,27	17,58	15,17	15,52	10,66
	16	86,75	57,23	57,53	46,52	26,12	26,60	27,09	27,58	21,65
	18	91,49	68,28	69,48	61,72	38,01	37,72	41,66	41,47	35,61
	20	94,73	77,40	77,30	73,18	47,51	47,83	54,27	54,44	50,23
	22	96,73	84,04	84,41	82,04	58,56	58,48	65,99	66,02	63,33
	24	97,86	89,00	88,73	88,20	67,81	67,40	75,06	75,09	74,60
	26	98,56	92,45	93,23	92,96	74,53	76,08	82,13	83,01	82,41
	28	99,16	95,27	94,64	95,16	82,26	81,26	87,82	87,25	87,97
	30	99,48	96,80	96,56	96,66	86,68	86,49	92,06	91,25	91,71
5	12	69,83	5,52	5,70	0,63	0,21	0,18	0,04	0,04	0,00
	14	80,12	12,00	12,37	2,84	0,54	0,58	0,19	0,21	0,05
	16	86,75	21,67	22,87	7,51	1,63	1,51	1,12	0,96	0,24
	18	91,49	33,63	34,70	17,52	3,76	4,05	3,00	3,40	1,21
	20	94,73	46,05	45,89	31,54	7,42	7,71	7,89	7,71	3,76
	22	96,73	57,07	57,51	47,35	12,96	12,83	16,63	16,59	9,69
	24	97,86	67,84	67,07	61,80	19,91	19,78	27,33	27,65	20,63
	26	98,56	75,18	76,11	73,49	27,96	27,93	39,47	39,68	33,96
	28	99,16	82,85	81,77	82,08	37,87	37,37	51,35	50,86	48,63
	30	99,48	87,97	87,28	87,59	47,64	46,64	61,57	61,46	61,98

Q: constante do método de Ramsay e Elkum (2005)

$2n$ = número total de voluntários

* número de *outliers*; R=Referência e T=Teste

Para os dois critérios utilizados, pode-se notar que a presença do *outlier* pode prejudicar a conclusão de bioequivalência, sendo o pior caso quando se tem dois *outliers* no medicamento de referência e dois no teste. Para o segundo critério, observa-se ainda que quanto mais discrepante o valor de resposta ($Q = 5$), menor a quantidade de vezes em que se declara bioequivalência.

Foi observado também que a presença de *outliers* praticamente não interfere na ocorrência de efeitos residual, da formulação e/ou de período, ou seja, seus valores são muito próximos aos apresentados na Tabela 3.1 por isso não serão apresentados.

Embora a ocorrência ou não de observações atípicas não possa ser controlada, é importante saber que elas podem aparecer de forma aleatória e a estratégia seria proteger o estudo com um planejamento adequado. Portanto, a seleção e os critérios de inclusão de um voluntário no estudo são determinantes no intuito tanto de evitar a presença de voluntários com comportamento atípico quanto de aumentar a homogeneidade da amostra.

3.1.3 Incerteza da estimativa da variabilidade

Foi estudado o problema da má especificação de parâmetros necessários para o cálculo do número de participantes de um estudo de bioequivalência e qual o impacto no tamanho da amostra e na conclusão de bioequivalência.

Através do *software* nQuery Advisor®, obteve-se o tamanho de amostra total ($2n$), com um nível de significância de 5% e poder de teste de 80% e 90%, para as seguintes situações: $\theta_\gamma = 0{,}00$, 0,05 e 0,10 e $CV = 0{,}10$ a 0,50 (com incremento de 0,01). Estes valores de CV correspondem à seguinte variação de: 0,100 a 0,472. Para cada valor de CV tomado como sendo o real, foram calculados quantos voluntários seriam recrutados a menos (a mais) quando o valor de CV usado é menor (maior) do que o verdadeiro valor. De forma análoga, foi avaliada a má especificação do valor de θ_γ.

Foram investigadas também quais as condições em que a recomendação da ANVISA de recrutar um total de 24 voluntários seria razoável.

Para cada valor de θ_γ os resultados podem ser organizados em uma matriz, colocando nas linhas o valor real de CV e nas colunas o valor de CV utilizado na fórmula do cálculo de $2n$. O corpo da tabela é a diferença entre o tamanho de amostra total que realmente deveria ser utilizado ($2n$) e o que foi obtido com o valor incorreto de CV. Obviamente a diagnonal principal é composta de zeros, acima é positivo (correspondendo a um valor de $2n$ maior do que o necessário) e abaixo é negativo (correspondendo a um valor de $2n$ menor do que o necessário).

Na Tabela 3.9 são apresentados os resultados para valores selecionados de CV, apenas para o caso em que $\theta_\gamma = 0,00$ e com poder de 80% e 90%.

Como já era esperado, quanto maior o CV maior o número de voluntários necessários. A seguir apresentamos comentários para alguns casos especiais para poder de 80%:

1. $CV = 0{,}12 \Leftrightarrow 2n = 12$ (mínimo de voluntários exigidos pela ANVISA quando se tem informação): se o CV verdadeiro for de 0,12 e utilizarmos um valor mais conservador como 0,18, o tamanho da amostra dobra ($2n = 24$) enquanto que para $CV = 0{,}50$ o número de voluntários é doze vezes maior.

2. $CV = 0{,}18 \Leftrightarrow 2n = 24$ (como descrito anteriomente, quando não se tem informações sobre o CV pode-se usar o número mínimo de 24 voluntários): se o CV real for menor que 0,18 estaremos superestimando o tamanho da amostra. porém se o CV real for maior que 0,18 estaremos correndo o risco de obter um resultado não favorável à bioequivalência, além de diminuir muito o poder do teste.

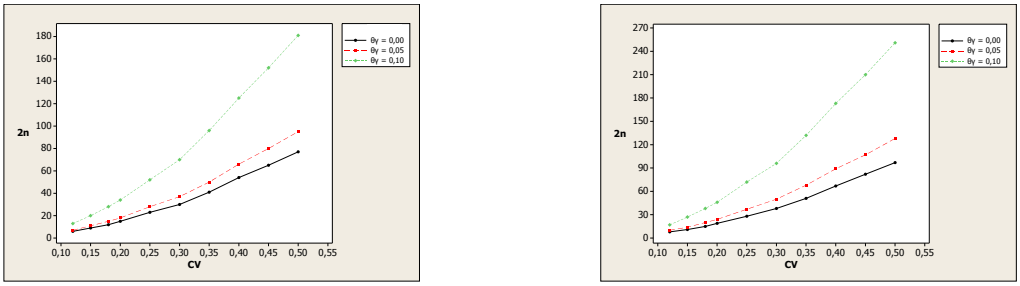
3. $CV = 0{,}50 \Leftrightarrow 2n = 156$ (um tamanho de amostra praticamente impossível em estudos de bioequivalência): sendo bastante conservador utilizando CV de 0,50 pode-se chegar a um número elevado de voluntários, o que aumenta muito o custo e dificulta o estudo.

Tabela 3.9: Diferença entre o tamanho de amostra total ($2n$) calculado quando o valor de CV é mal especificado e o valor correto

			CV utilizado no cálculo do tamanho de amostra									
Poder	CV real	$2n$	0,12	0,15	0,18	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
80%	0,12	12	0	6	12	18	32	50	70	92	118	144
	0,15	18	-6	0	6	12	26	44	64	86	112	138
	0,18	24	-12	-6	0	6	20	38	58	80	106	132
	0,20	30	-18	-12	-6	0	14	32	52	74	100	126
	0,25	44	-32	-26	-20	-14	0	18	38	60	86	112
	0,30	62	-50	-44	-38	-32	-18	0	20	42	68	94
	0,35	82	-70	-64	-58	-52	-38	-20	0	22	46	74
	0,40	104	-92	-86	-80	-74	-60	-42	-22	0	26	52
	0,45	130	-118	-112	-106	-100	-86	-68	-46	-26	0	26
	0,50	156	-144	-138	-132	-126	-112	-94	-74	-52	-26	0
90%	0,12	16	0	6	14	20	40	62	86	116	146	180
	0,15	22	-6	0	8	14	34	56	80	110	140	174
	0,18	30	-14	-8	0	6	26	48	72	102	132	166
	0,20	36	-20	-14	-6	0	20	42	66	96	126	160
	0,25	56	-40	-34	-26	-20	0	22	46	76	106	140
	0,30	78	-62	-56	-48	-42	-22	0	24	54	84	118
	0,35	102	-86	-80	-72	-66	-46	-24	0	30	60	94
	0,40	132	-116	-110	-102	-96	-76	-54	-30	0	30	64
	0,45	162	-146	-140	-132	-126	-106	-84	-60	-30	0	34
	0,50	196	-180	-174	-166	-160	-140	-118	-94	-64	-34	0

Com um poder de teste de 90%, as análises são análogas às apresentadas para 80%, ressaltando apenas que os valores para $2n$ serão mais elevados.

Os resultados do tamanho da amostra necessário em função do coeficiente de variação para quando as diferenças das médias dos medicamentos (teste e referência) são 0,00, 0,05 ou 0,10, para os poderes de 80% e de 90% estão representadas na Figura 3.1.



(a) Poder de 80% (b) Poder de 90%

Figura 3.1: Número total ($2n$) de voluntários em função do coeficiente de variação

Na Figura 3.2 são apresentados os resultados do poder do teste que avalia a bioequivalência quando são usados um total de 24 voluntários. Observa-se que a recomendação da ANVISA só é válida quando CV é menor que 18,1% (o que corresponde a σ menor que 0,18) pois o poder é de pelo menos 80%.

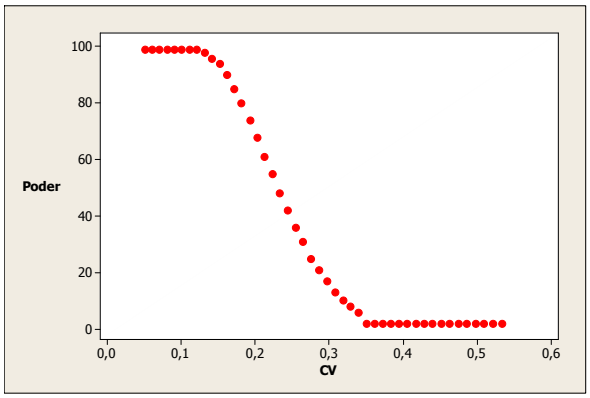


Figura 3.2: Poder do teste de bioequivalência em função de CV ($2n = 24$)

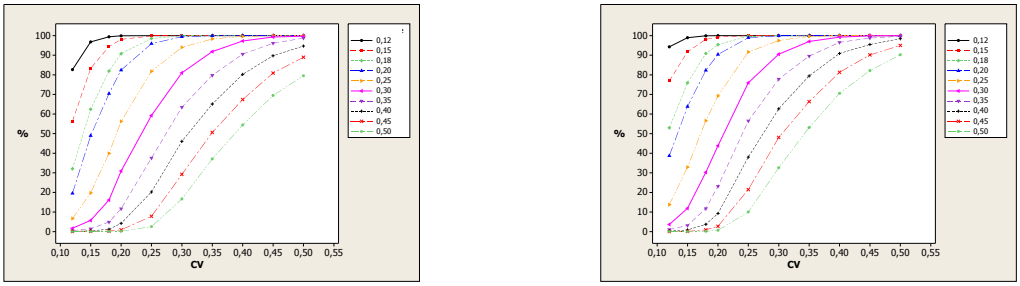
Dando continuidade ao trabalho investigou-se o impacto dessa escolha errada sobre a conclusão de bioequivalência. Para isso foi feito um estudo de simulações de Monte Carlo em que para cada valor de CV tomado como real foram calculados quantas vezes conclui-se por bioequivalência quando estima-se incorretamente que o valor de CV é menor ou maior que o verdadeiro.

Foram considerados vários valores para CV (0,12, 0,15, 0,18, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45 e 0,50) e três valores para θ_γ (0,00, 0,05 e 0,10).

Primeiramente foi gerada a medida resumo área sob a curva de concentração plasmática versus tempo segundo uma distribuição log-normal. Para todos os conjuntos de dados gerados foram testados os efeitos residual, da formulação e de período, foi construído o intervalo de 90% de confiança para $(\mu_T - \mu_R)$ e os dois testes de hipóteses unilaterais.

Para cada valor de θ_γ os resultados podem ser organizados em uma matriz, colocando nas linhas o valor real de CV e nas colunas o valor de CV utilizado na fórmula do cálculo de n. O corpo da tabela são as porcentagens de conclusão de bioequivalência obtido utilizando o valor incorreto de CV.

Na Figura 3.3 são apresentados os resultados para valores selecionados de CV, apenas para o caso em que $\theta_\gamma = 0,00$ para poder de 80% e de 90%.



(a) Poder de 80% (b) Poder de 90%

Figura 3.3: Percentual de conclusão de bioequivalência em função do coeficiente de variação

Na Tabela 3.10 são apresentados os resultados para valores selecionados de CV, para o caso em que $\theta_\gamma = 0,00$ e com poder de 80% e 90%.

Quanto maior o CV utilizado, maior a porcentagem de conclusão de bioequivalência. A seguir apresentamos alguns comentários para os mesmos casos especiais escolhidos anteriormente:

1. $CV = 0{,}12 \Leftrightarrow 2n = 12$: se o CV verdadeiro for de 0,12 e utilizarmos um valor mais conservador como 0,18, a conclusão de bioequivalência aumenta em mais de 10 pontos percentuais enquanto que para CV real maior que 0,12, o estudo ficará bastante comprometido.

2. $CV = 0{,}18 \Leftrightarrow 2n = 24$: se o CV real for menor que 0,18 estaremos garantindo ainda mais uma conclusão de bioequivalência porém se o CV real for maior que 0,18 estaremos correndo o risco de obter um resultado não favorável à bioequivalência.

3. $CV = 0{,}50 \Leftrightarrow 2n = 156$: com a postura bastante conservadora de utilizar CV de 0,50 pode-se chegar a garantir 100% de conclusão de bioequivalência, mas não se pode esquecer que aumenta muito o custo e dificulta o estudo.

Tabela 3.10: Percentuais de bioequivalência quando o valor de CV é mal especificado

			CV utilizado no cálculo do tamanho de amostra									
Poder	CV real	$2n$	0,12	0,15	0,18	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
80%	0,12	12	82,68	96,77	99,40	99,91	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,15	18	56,33	83,30	94,40	98,07	99,84	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,18	24	32,05	62,41	81,94	90,78	98,54	99,85	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,20	30	19,56	48,92	70,39	82,41	95,88	99,46	99,92	100,00	100,00	100,00
	0,25	44	6,69	19,73	39,91	56,25	81,80	94,02	98,31	99,61	99,93	99,99
	0,30	62	1,73	5,76	16,10	30,91	59,28	81,02	91,85	97,25	99,30	99,72
	0,35	82	0,56	1,47	4,89	11,67	37,54	63,48	79,78	90,55	96,11	98,72
	0,40	104	0,19	0,43	1,23	4,22	20,24	46,05	65,09	80,24	89,73	94,66
	0,45	130	0,07	0,14	0,31	0,94	7,82	29,22	50,60	67,35	80,91	88,94
	0,50	156	0,03	0,02	0,07	0,20	2,58	16,68	37,15	54,42	69,48	79,50
90%	0,12	16	94,27	98,96	99,89	99,99	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,15	22	76,87	91,74	98,07	99,29	99,99	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,18	30	52,99	75,88	90,87	95,41	99,74	99,98	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,20	36	38,71	63,82	82,30	90,39	98,93	99,93	99,98	100,00	100,00	100,00
	0,25	56	13,78	32,86	56,59	69,23	91,63	97,48	99,62	99,97	99,99	100,00
	0,30	78	3,66	11,89	30,27	43,84	75,92	90,49	97,03	99,22	99,89	99,99
	0,35	102	1,13	3,18	11,79	23,16	56,49	77,80	89,53	96,55	98,76	99,65
	0,40	132	0,31	0,88	3,76	9,26	38,04	62,65	79,45	90,89	95,49	98,43
	0,45	162	0,07	0,17	0,94	2,77	21,50	48,04	66,31	81,29	90,16	94,97
	0,50	196	0,04	0,06	0,21	0,73	10,04	32,64	53,10	70,58	82,18	90,22

$2n$ = número total de voluntários

Com o aumento de θ_γ há um aumento no número de voluntários necessários para o estudo de bioequivalência, como podemos observar adiante. A Tabela 3.11 nos mostra também a porcentagem com que concluímos bioequivalência e a porcentagem de inexistência de efeitos residual, da formulação e de período, para um poder de 80%.

Podemos observar que com o aumento de θ_γ há um aumento na conclusão de bioequivalência, isso pode ser devido ao aumento no número de voluntários. Nota-se ainda que os efeitos residual, da formulação e de período se alteram pouco, independente do CV e dos valores de θ_γ, ficando próximos aos 5% esperados.

Tabela 3.11: Percentuais de bioequivalência e dos efeitos residual (Ef), da formulação (Ef) e de período (Ep) para $\theta_\gamma = 0,00, 0,05, 0,10$

θ_γ	CV	$2n$	BE	Er	Ef	Ep
0,00	0,12	12	82,68	5,10	4,00	4,80
	0,15	18	83,80	4,40	4,30	5,90
	0,18	24	81,94	4,80	4,60	5,00
	0,20	30	82,41	5,10	4,50	5,50
	0,25	44	81,80	4,10	4,50	4,40
	0,30	62	81,02	5,00	5,00	5,20
	0,35	82	79,78	5,00	3,90	5,00
	0,40	104	80,24	4,50	5,90	4,80
	0,45	130	80,91	5,10	4,70	3,60
	0,50	156	79,50	5,70	3,90	6,30
0,05	0,12	14	90,04	5,90	4,60	4,70
	0,15	22	92,00	4,20	3,80	5,10
	0,18	30	90,74	4,70	5,20	4,40
	0,20	36	90,93	5,60	5,20	4,80
	0,25	54	89,49	5,70	4,90	4,90
	0,30	76	89,70	3,80	5,20	6,20
	0,35	100	88,90	3,80	5,50	4,50
	0,40	128	89,88	4,40	4,30	4,80
	0,45	158	89,06	6,10	4,60	4,40
	0,50	192	89,46	3,70	4,00	4,80
0,10	0,12	26	99,78	4,60	4,50	5,10
	0,15	38	99,65	5,00	5,30	4,60
	0,18	54	99,58	4,80	5,40	5,30
	0,20	66	99,68	4,90	5,00	5,00
	0,25	102	99,52	4,00	5,90	5,80
	0,30	144	99,68	4,90	4,70	5,20
	0,35	190	99,50	3,80	4,40	5,00
	0,40	244	99,54	4,20	5,80	5,90
	0,45	304	99,69	4,80	4,90	5,00
	0,50	366	99,57	3,90	4,00	4,50

$2n$ = número total de voluntários

3.2 Simulação da curva de concentração individual

Para esse estudo assumiu-se que o medicamento administrado segue o modelo monocompartimental, com absorção de primeira passagem, que é a situação que mais ocorre na prática. A curva de concentração versus tempo correspondente deve ser escrita como:

$$C(t) = \frac{DK_a}{Vd(K_a - K_e)}[e^{K_e t} - e^{K_a t}], \tag{3.2}$$

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

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

$$ASC_t = \sum_{i=1}^{c} \left[\frac{C_{t_i - 1} + C_i}{2} \right] (t_i - t_{i-1}) \tag{3.3}$$

Inicialmente foram fixados os seguintes 17 tempos de coletas (em horas): 0; 0,5; 1; 1,33; 1,67; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 6; 8; 10; 12; 16. Através de simulações de Monte Carlo, foram geradas concentrações plasmáticas para a construção da curva de concentração plasmática segundo uma distribuição log-normal, com número de total de voluntários por grupo de $2n = 24, 26, 28, 30$. A partir dos dados gerados, além do cálculo da ASC, foi identificado o $Cmax$. Assim, foram testados os efeitos residual, da formulação e de período, foi construído o intervalo de 90% de confiança para a diferença das médias do medicamento teste e do referência (na escala logarítimica) e os dois testes de hipóteses unilaterais de Schuirmann.

Os valores para K_a e K_e foram obtidos através de duas distribuições log-normais, cada um com um valor específico para a média e o desvio-padrão de cada seqüência do estudo. É razoável assumir que D e Vd são constantes, já que os estudos de bioequivalência são conduzidos em voluntários sadios. Sem perda de generalidade, os valores para D e Vd foram fixados em 400 mg e 10 litros.

3.2.1 Conclusão de bioequivalência

Para declarar que dois medicamentos são bioequivalentes, os intervalos de 90% de confiança para a razão ou diferença das médias, tanto para ASC quanto para $Cmax$, devem estar totalmente dentro do intervalo de bioequivalência, ou de forma análoga rejeitar as hipóteses nulas do teste de Schuirmann. Para investigar o que é esperado na prática, foram simuladas várias situações e comparadas as porcentagens de conclusão de bioequivalência somente para $Cmax$, somente para ASC e para as duas medidas simultaneamente.

Para gerar os dados foram consideradas as combinações para os parâmetros apresentados na Tabela 3.12.

Os percentuais de bioequivalência para os 27 casos da Tabela 3.12 são apresentados na Tabela 3.13.

Tabela 3.12: Parâmetros considerados na simulação para a constante de eliminação (K_e) e constante de absorção (K_a)

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

R: medicamento referência, T: medicamento teste

Quando os valores de K_{aR} e K_{aT} são próximos, há mais casos de conclusão de bioequivalência, podendo até chegar a 100%. Os piores casos aparecem quando a diferença entre os parâmetros (K_a) são maiores, isso porque os medicamentos terão comportamentos diferenciados em relação à absorção, sendo o caso 25 ($K_{aR} = 0,80$, $K_{aT} = 0,50$ e $K_e = 0,09$) a pior situação.

Percebe-se também que os percentuais de conclusões de bioequivalência para o $Cmax$ nunca são superiores aos percentuais para ASC_t, o que nos leva a pensar se o $Cmax$ é realmente uma boa medida para avaliar a velocidade de absorção. Conforme Noël *et al.* (2003a), o $Cmax$ é uma medida de maior variabilidade, e assim pode levar a uma conclusão errônea de não bioequivalência. Essa maior variabilidade de $Cmax$ pode ser observada pela Tabela 3.14.

Como as ordens de grandeza de ASC e $Cmax$ são bastante diferentes, é recomendável usar uma medida padronizada, tal como o coeficiente de variação. Para todas as situações o CV de $Cmax$ é maior que o da ASC. Quanto maior K_a, menor é CV, tanto para ASC como também para $Cmax$. Por outro lado, CV é inversamente proporcional a K_e para ASC, mas diretamente proporcional para $Cmax$. Assim, as maiores variabilidades, tanto para o medicamento referência quanto para o teste e para os todos valores de K_a, ocorrem para $K_e = 0{,}09$. A maior variabilidade encontrada foi para o medicamento referência com $K_a = 0{,}60$.

Tabela 3.13: Percentuais de conclusão de bioequivalência para $Cmax$, para ASC e para as duas medidas simultaneamente

Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas
1	24	99,93	99,89	99,88	10	24	99,47	99,95	99,46	19	24	98,13	99,98	98,13
	26	99,97	99,97	99,96		26	99,78	99,99	99,78		26	98,77	100,00	98,77
	28	99,97	99,98	99,96		28	99,77	100,00	99,77		28	99,22	100,00	99,22
	30	100,00	100,00	100,00		30	99,89	100,00	99,89		30	99,52	100,00	99,52
Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas
2	24	100,00	99,99	99,99	11	24	99,99	100,00	99,99	20	24	99,94	100,00	99,94
	26	100,00	100,00	100,00		26	99,99	100,00	99,99		26	99,95	100,00	99,95
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
	30	100,00	100,00	100,00		30	100,00	100,00	100,00		30	99,99	100,00	99,99
Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas
3	24	99,99	99,96	99,96	12	24	99,74	99,99	99,74	21	24	98,66	99,99	98,66
	26	99,99	99,99	99,99		26	99,91	100,00	99,91		26	99,04	100,00	99,04
	28	100,00	100,00	100,00		28	99,96	100,00	99,96		28	99,40	100,00	99,40
	30	100,00	100,00	100,00		30	99,96	100,00	99,96		30	99,69	100,00	99,69
Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas
4	24	99,51	99,61	99,32	13	24	91,55	99,28	91,55	22	24	88,22	99,88	88,22
	26	99,77	99,84	99,71		26	93,61	99,63	93,61		26	90,64	99,96	90,64
	28	99,79	99,86	99,76		28	95,15	99,78	95,15		28	92,09	99,97	92,09
	30	99,90	99,95	99,88		30	96,48	99,86	96,48		30	93,72	99,99	93,72
Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas
5	24	100,00	100,00	100,00	14	24	100,00	100,00	100,00	23	24	99,96	100,00	99,96
	26	100,00	100,00	100,00		26	100,00	100,00	100,00		26	99,98	100,00	99,98
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
	30	100,00	100,00	100,00		30	100,00	100,00	100,00		30	100,00	100,00	100,00
Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas
6	24	100,00	100,00	100,00	15	24	100,00	100,00	100,00	24	24	100,00	100,00	100,00
	26	100,00	100,00	100,00		26	100,00	100,00	100,00		26	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
	30	100,00	100,00	100,00		30	100,00	100,00	100,00		30	100,00	100,00	100,00
Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas
7	24	97,68	98,72	97,43	16	24	85,56	99,36	85,56	25	24	66,90	99,68	66,90
	26	98,49	99,11	98,30		26	88,26	99,64	88,26		26	69,28	99,90	69,28
	28	99,08	99,46	98,96		28	89,84	99,79	89,84		28	72,57	99,89	72,57
	30	99,32	99,64	99,23		30	91,81	99,86	91,81		30	74,93	99,92	74,93
Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas
8	24	100,00	100,00	100,00	17	24	99,96	100,00	99,96	26	24	99,58	100,00	99,58
	26	100,00	100,00	100,00		26	99,98	100,00	99,98		26	99,85	100,00	99,85
	28	100,00	100,00	100,00		28	99,99	100,00	99,99		28	99,85	100,00	99,85
	30	100,00	100,00	100,00		30	100,00	100,00	100,00		30	99,90	100,00	99,90
Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas	Caso	$2n$	$Cmax$	ASC_t	Ambas
9	24	100,00	100,00	100,00	18	24	100,00	100,00	100,00	27	24	100,00	100,00	100,00
	26	100,00	100,00	100,00		26	100,00	100,00	100,00		26	100,00	100,00	100,00
	28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00		28	100,00	100,00	100,00
	30	100,00	100,00	100,00		30	100,00	100,00	100,00		30	100,00	100,00	100,00

$2n$ = número total de voluntários

Tabela 3.14: Estatísticas descritivas para $ASC(ng/ml \cdot h)$ e $Cmax(ng/ml)$ para as formulações R e T

			R			T		
			$K_a = 0{,}60$	$K_a = 0{,}70$	$K_a = 0{,}80$	$K_a = 0{,}50$	$K_a = 060$	$K_a = 0{,}70$
$K_e = 0{,}05$		Média	310,81	315,22	318,44	305,61	311,77	316,05
	ASC	DP	14,05	11,83	10,14	13,75	11,23	9,40
		$CV(\%)$	4,52	3,75	3,18	4,50	3,60	2,97
		Média	24,41	24,99	25,45	23,73	24,46	25,03
	$Cmax$	DP	1,65	1,54	1,44	1,48	1,37	1,28
		$CV(\%)$	6,75	6,14	5,67	6,25	5,59	5,09
$K_e = 0{,}07$		Média	274,98	278,50	281,03	270,86	275,81	279,20
	ASC	DP	11,41	9,49	8,06	11,25	9,07	7,50
		$CV(\%)$	4,15	3,41	2,87	4,15	3,29	2,69
		Média	23,04	23,69	24,23	22,26	23,08	23,74
	$Cmax$	DP	1,86	1,76	1,66	1,66	1,55	1,46
		$CV(\%)$	8,09	7,42	6,87	7,45	6,73	6,16
$K_e = 0{,}09$		Média	245,01	247,82	249,82	241,72	245,73	248,42
	ASC	DP	9,33	7,68	6,45	9,28	7,37	6,04
		$CV(\%)$	3,81	3,10	2,58	3,84	3,00	2,43
		Média	21,90	22,61	23,20	21,05	21,94	22,65
	$Cmax$	DP	2,02	1,92	1,83	1,78	1,68	1,60
		$CV(\%)$	9,22	8,49	7,89	8,46	7,68	7,06

K_e: constante de eliminação, K_a: constante de absorção

Os resultados das Tabelas 3.13 e 3.14 estão de acordo com Noël *et al.* (2003a), que diz que os critérios de bioequivalência deveriam ser definidos baseados em dados de relação farmacocinética/farmacodinâmica, podendo levar a desvios racionais do padrão tradicional do intervalo de confiança e esta relação depende da natureza de cada fármaco. Assim, dados farmacodinâmicos podem favorecer intervalos de confiança mais largos ou exigir intervalos mais estreitos.

Um segundo nível de discussão seria o intervalo de confiança adotado no caso do $Cmax$. O FDA (agência regulatória americana) mantém o mesmo intervalo de confiança usado para ASC (0,80; 1,25), mas as agências regulatórias da Comunidade Européia, do Canadá e do México adotam uma posição mais flexível.

A Tabela 3.15 mostra quantas vezes (%) a medida ASC é declarada bioequivalente e $Cmax$ não e vice-versa. Não foram apresentados os casos em que a conclusão de bioequivalência é declarada para 100% das amostras, tanto para ASC quanto para $Cmax$.

Tabela 3.15: Percentuais de conclusão de bioequivalência para as situações em que somente $Cmax$ ou ASC são bioequivalentes

	$2n$	$Cmax$	ASC		$2n$	$Cmax$	ASC		$2n$	$Cmax$	ASC
1	24	0,05	0,01	13	24	0,00	7,73	21	24	0,00	1,33
	26	0,01	0,01		26	0,00	6,02		26	0,00	0,96
	28	0,01	0,02		28	0,00	4,63		28	0,00	0,60
	30	0,00	0,00		30	0,00	3,38		30	0,00	0,31
	$2n$	$Cmax$	ASC		$2n$	$Cmax$	ASC		$2n$	$Cmax$	ASC
4	24	0,19	0,29	16	24	0,00	13,80	22	24	0,00	11,66
	26	0,06	0,13		26	0,00	11,38		26	0,00	9,32
	28	0,03	0,10		28	0,00	9,95		28	0,00	7,88
	30	0,02	0,07		30	0,00	8,05		30	0,00	6,27
	$2n$	$Cmax$	ASC		$2n$	$Cmax$	ASC		$2n$	$Cmax$	ASC
7	24	0,25	1,29	17	24	0,00	0,04	23	24	0,00	0,04
	26	0,19	0,81		26	0,00	0,02		26	0,00	0,02
	28	0,12	0,50		28	0,00	0,01		28	0,00	0,00
	30	0,09	0,41		30	0,00	0,00		30	0,00	0,00
	$2n$	$Cmax$	ASC		$2n$	$Cmax$	ASC		$2n$	$Cmax$	ASC
10	24	0,01	0,49	19	24	0,00	1,85	25	24	0,00	32,78
	26	0,00	0,21		26	0,00	1,23		26	0,00	30,62
	28	0,00	0,33		28	0,00	0,78		28	0,00	27,32
	30	0,00	0,11		30	0,00	0,48		30	0,00	24,99
	$2n$	$Cmax$	ASC		$2n$	$Cmax$	ASC		$2n$	$Cmax$	ASC
12	24	0,00	0,25	20	24	0,00	0,06	26	24	0,00	0,42
	26	0,00	0,09		26	0,00	0,05		26	0,00	0,15
	28	0,00	0,04		28	0,00	0,00		28	0,00	0,15
	30	0,00	0,04		30	0,00	0,01		30	0,00	0,10

$2n$ = número total de voluntários

Nos casos 1, 4, 7 e 10, ocorreram situações em que apenas umas das medidas (ASC ou $Cmax$) foi declarada bioequivalente. Já para os outros casos representados em 3.15, não houve situações em que só se declarou bioequivalência para $Cmax$, isto é, ou as duas medidas foram bioequivalentes simultaneamente ou apenas ASC. Destacando o caso 25, onde a decisão de bioequivalência apenas em ASC é muito elevada.

3.2.2 Cronograma de coleta

Como foi dito anteriormente, de acordo com Kong e Rene (2000) um número apropriado de coletas seria entre seis e oito, sem contar a coleta inicial (t_0). Para verificar essa afirmação foram feitas simulações utilizando vários cronogramas de coleta e para cada cronograma foram retiradas coletas uma a uma até ficar somente com as sete coletas (contando a de t_0). Os tempos foram retirados levando em consideração o valor de $Tmax$ e a meia vida do princípio ativo, que são informações facilmente encontradas na literatura.

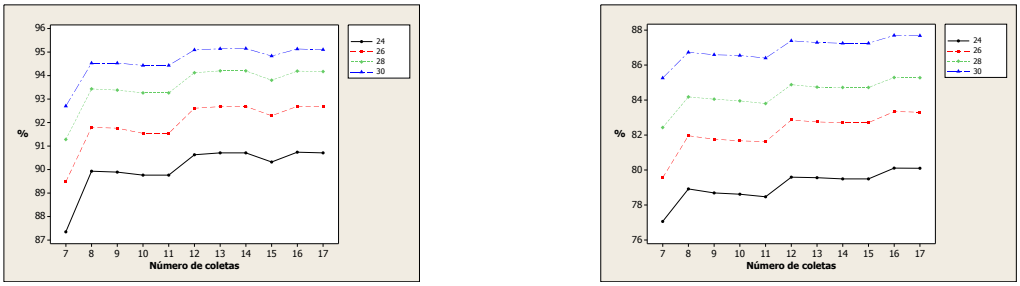
O primeiro cronograma utilizado foi o de 17 tempos de coletas (em horas): 0; 0,5; 1; 1,33; 1,67; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 6; 8; 10; 12; 16. Os resultados com a porcentagem de conclusão de bioequivalência para ASC_t e $Cmax$, para um medicamento com $Tmax$ entre 2 e 4 horas e meia vida de 2 a 4 horas, assim a última coleta é de 16h, são apresentados na Tabela 3.16

Tabela 3.16: Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ de acordo com o número de coletas ($t_{17} = 16h$)

Número	ASC				$Cmax$			
	$2n$				$2n$			
de coletas	24	26	28	30	24	26	28	30
17	90,71	92,67	94,17	95,10	80,10	83,31	85,28	87,68
16	90,74	92,69	94,19	95,13	80,11	83,34	85,29	87,70
15	90,32	92,29	93,80	94,83	79,49	82,71	84,72	87,25
14	90,71	92,69	94,20	95,15	79,49	82,71	84,72	87,25
13	90,71	92,68	94,20	95,14	79,56	82,75	84,74	87,29
12	90,63	92,61	94,12	95,09	79,59	82,86	84,88	87,39
11	89,76	91,54	93,26	94,43	78,47	81,62	83,80	86,40
10	89,76	91,54	93,26	94,43	78,62	81,67	83,95	86,55
9	89,89	91,76	93,38	94,53	78,69	81,76	84,05	86,59
8	89,93	91,79	93,43	94,53	78,92	81,96	84,18	86,73
7	87,35	89,48	91,28	92,70	77,06	79,56	82,43	85,26

$2n$ = número total de voluntários

Segundo os dados mostrados na Tabela 3.16 pode-se observar que mesmo para um número inferior de coletas, não há uma queda expressiva no percentual de conclusão de bioequivalência, sendo que a maior queda aparece para a ASC com $2n = 24$ (3,36%). O que nos leva a crer que podemos ter um número menor de coletas, diminuindo assim o custo do estudo e o desgaste do voluntário. Essa situação pode ser melhor visualizada através da Figura 3.4.



(a) ASC (b) Cmax

Figura 3.4: Percentuais de conclusão de bioequivalência de acordo com o número de coletas ($t_{17} = 16h$)

O mesmo procedimento foi realizado para outros cronogramas de coleta. A Tabela 3.17 mostra os resultados obtidos utilizando um cronograma original com 16 coletas, o $Tmax$ é em torno de 1,5h e a meia vida é de 5 horas, sendo a última coleta 24 horas após a administração do medicamento. Nota-se que o melhor resultado para ASC ocorre para 11 coletas, duas a menos que o cronograma original e a pior situação ocorre com 8 coletas.

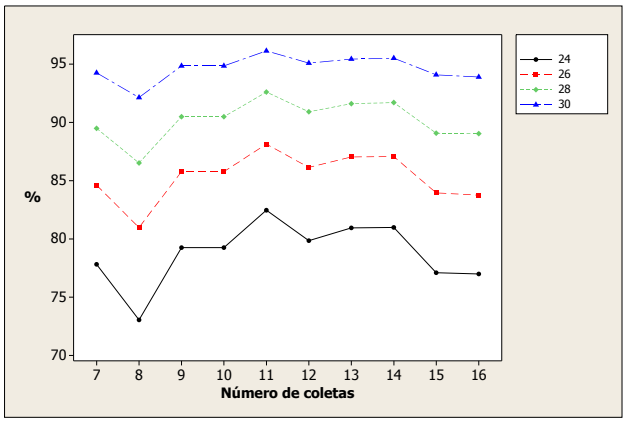


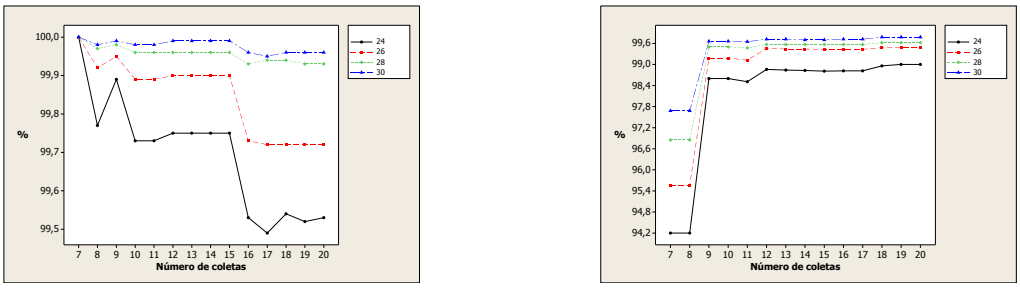
Figura 3.5: Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC de acordo com o número de coletas ($t_{16} = 24h$)

Tabela 3.17: Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ de acordo com o número de coletas ($t_{16} = 24h$)

Número de coletas	ASC				$Cmax$			
	$2n$				$2n$			
	24	26	28	30	24	26	28	30
16	77,00	83,75	89,03	93,89	100,00	100,00	100,00	100,00
15	77,10	83,95	89,07	94,08	100,00	100,00	100,00	100,00
14	80,99	87,07	91,70	95,51	100,00	100,00	100,00	100,00
13	80,95	87,04	91,61	95,43	100,00	100,00	100,00	100,00
12	79,85	86,14	90,91	95,09	100,00	100,00	100,00	100,00
11	82,46	88,13	92,60	96,14	100,00	100,00	100,00	100,00
10	79,25	85,78	90,49	94,85	100,00	100,00	100,00	100,00
9	79,25	85,78	90,49	94,85	100,00	100,00	100,00	100,00
8	73,05	80,98	86,52	92,13	100,00	100,00	100,00	100,00
7	77,82	84,61	89,49	94,25	100,00	100,00	100,00	100,00

$2n$ = número total de voluntários

A Tabela 3.18 e a Figura 3.6 mostram os resultados obtidos utilizando um cronograma original com 17 coletas sendo a última coleta 48 horas após a administração do medicamento, o $Tmax$ ocorre entre 2 e 4 horas e a meia vida entre 9 e 10 horas. Observa-se que mesmo para um número inferior de coletas, os percentuais de conclusão de bioequivalência se mantêm altos, maiores que 99% para ASC para todos os casos e com exceção de 8 e 7 coletas para $2n = 24$ para $Cmax$ (94,20%), todos os valores estão acima de 95%. A melhor situação para ASC é com apenas 7 coletas, porém essa é para $Cmax$ a pior situação.



(a) ASC (b) Cmax

Figura 3.6: Percentuais de conclusão de bioequivalência de acordo com o número de coletas ($t_{20} = 48h$)

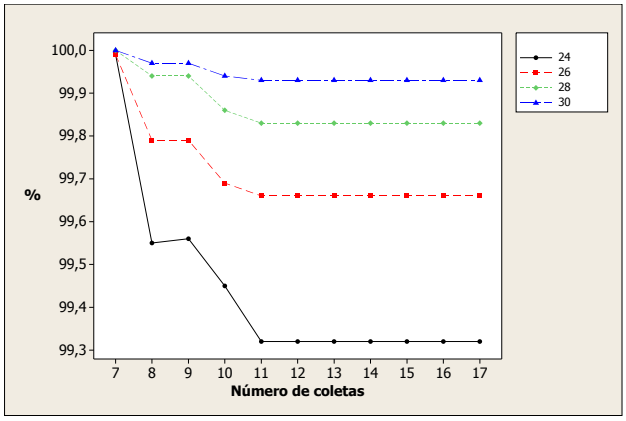


Figura 3.7: Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC de acordo com o número de coletas ($t_{17} = 96h$)

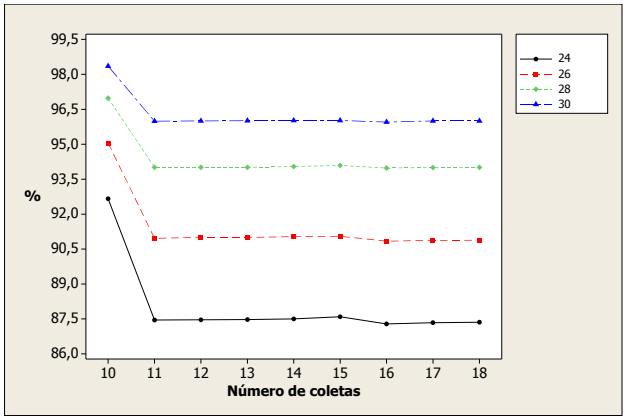


Figura 3.8: Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC de acordo com o número de coletas ($t_{18} = 120h$)

Tabela 3.18: Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ de acordo com o número de coletas ($t_{20} = 48h$)

Número	ASC				$Cmax$			
	$2n$				$2n$			
de coletas	24	26	28	30	24	26	28	30
20	99,53	99,72	99,93	99,96	99,00	99,49	99,62	99,78
19	99,52	99,72	99,93	99,96	99,00	99,49	99,62	99,78
18	99,54	99,72	99,94	99,96	98,96	99,48	99,62	99,78
17	99,49	99,72	99,94	99,95	98,82	99,43	99,57	99,72
16	99,53	99,73	99,93	99,96	98,82	99,43	99,57	99,72
15	99,75	99,90	99,96	99,99	98,81	99,43	99,57	99,70
14	99,75	99,90	99,96	99,99	98,83	99,44	99,57	99,70
13	99,75	99,90	99,96	99,99	98,84	99,44	99,57	99,72
12	99,75	99,90	99,96	99,99	98,86	99,46	99,57	99,72
11	99,73	99,89	99,96	99,98	98,51	99,12	99,47	99,65
10	99,73	99,89	99,96	99,98	98,60	99,18	99,50	99,66
9	99,89	99,95	99,98	99,99	98,60	99,18	99,50	99,66
8	99,77	99,92	99,97	99,98	94,20	95,56	96,85	97,68
7	100,00	100,00	100,00	100,00	94,20	95,56	96,85	97,68

$2n$ = número total de voluntários

As Tabelas 3.19 e 3.20 mostram os resultados obtidos utilizando um cronograma original com 17 e 18 coletas sendo as últimas coletas com 96 ($Tmax$ entre 2 e 3 horas e meia vida de aproximadamente 19 horas) e 120 horas ($Tmax$ de 4 a 8 horas e meia vida de 24 horas), respectivamente. Pela análise dessas tabelas destaca-se que para um número inferior de coletas há um aumento no percentual de conclusão de bioequivalência, isso é explicado devido ao fato de que quando se diminui o número de pontos para a construção da curva de concentração plasmática, perde-se precisão no cálculo da área sob a curva, podendo deixar os resultados mais próximos entre os voluntários, o que consequentemente interfere na conclusão de bioequivalência. Os percentuais encontrados para $Cmax$ se mantiveram constantes porque os tempos de coleta retirados foram feitos de forma a não influenciar $Tmax$.

Por fim, constata-se que não se pode generalizar sobre a quantidade de amostras coletadas, pois há uma grande influência dos parâmetros farmacocinéticos (K_a, K_e, Vd). Sendo assim, cabe ressaltar que a escolha do número e do horário das coletas é uma tarefa delicada para que a curva construída reflita bem o comportamento do fármaco no organismo em termos de absorção e eliminação.

Tabela 3.19: Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ de acordo com o número de coletas ($t_{17} = 96h$)

Número	ASC				$Cmax$			
	$2n$				$2n$			
de coletas	24	26	28	30	24	26	28	30
17	99,32	99,66	99,83	99,93	100,00	100,00	100,00	100,00
16	99,32	99,66	99,83	99,93	100,00	100,00	100,00	100,00
15	99,32	99,66	99,83	99,93	100,00	100,00	100,00	100,00
14	99,32	99,66	99,83	99,93	100,00	100,00	100,00	100,00
13	99,32	99,66	99,83	99,93	100,00	100,00	100,00	100,00
12	99,32	99,66	99,83	99,93	100,00	100,00	100,00	100,00
11	99,32	99,66	99,83	99,93	100,00	100,00	100,00	100,00
10	99,45	99,69	99,86	99,94	100,00	100,00	100,00	100,00
9	99,56	99,79	99,94	99,97	100,00	100,00	100,00	100,00
8	99,55	99,79	99,94	99,97	100,00	100,00	100,00	100,00
7	99,99	99,99	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

$2n$ = número total de voluntários

Tabela 3.20: Percentuais de conclusão de bioequivalência para ASC e $Cmax$ de acordo com o número de coletas ($t_{18} = 120h$)

Número	ASC				$Cmax$			
	$2n$				$2n$			
de coletas	24	26	28	30	24	26	28	30
18	87,36	90,88	94,01	96,00	100,00	100,00	100,00	100,00
17	87,34	90,87	94,00	96,00	100,00	100,00	100,00	100,00
16	87,29	90,84	93,98	95,95	100,00	100,00	100,00	100,00
15	87,59	91,05	94,09	96,02	100,00	100,00	100,00	100,00
14	87,50	91,03	94,04	96,02	100,00	100,00	100,00	100,00
13	87,47	91,00	94,01	96,01	100,00	100,00	100,00	100,00
12	87,46	91,00	94,01	96,00	100,00	100,00	100,00	100,00
11	87,45	90,96	94,01	95,99	100,00	100,00	100,00	100,00
10	92,66	95,05	96,98	98,35	100,00	100,00	100,00	100,00

$2n$ = número total de voluntários

4 Discussão e considerações finais

A equipe estatística tem um papel importante em estudos de bioequivalência, tanto no planejamento como na análise dos dados. No planejamento destacam-se a escolha do delineamento adequado, a determinação do cronograma de coleta e o cálculo do número de voluntários. Apesar da análise dos dados ter que seguir as normas da ANVISA, um desafio é adotar metodologias mais apropriadas para situações atípicas ou mais complicadas.

Quando o número de voluntários necessários é grande devido à alta variabilidade, planejamentos de ordens mais elevadas (por exemplo, mais de dois períodos) são mais eficientes. Um número maior de períodos diminui a quantidade de voluntários necessários em um estudo porém pode elevar a quantidade de desistências.

Para situações de incerteza da variabilidade em estudos de bioequivalência seria recomendável, sempre que possível, utilizar uma amostra maior que a calculada para o CV do fármaco. Entretanto, assumir uma posição extremamente conservadora pode acarretar um aumento desnecessário no número de participantes do estudo e por questões de custo e/ou dificuldades na prática pode se tornar inviável.

Segundo Patterson e Jones (2006), como o impacto da presença de *outliers* não pode ser controlado depois do estudo completo, o melhor jeito de lidar com esses valores é saber que eles podem aparecer aleatoriamente e proteger o poder do estudo contra as ocorrências desses *outliers* no momento do planejamento do estudo. Para isso, é recomendado que no planejamento o poder do teste seja fixado em 90% para que esses estudos, depois de realizados, tenham pelo menos 80% de poder sob um potencial aumento da estimativa da variabilidade e grandes mudanças no valor de θ_γ ($> 5\%$).

Para atingir a variabilidade tão baixa quanto possível e evitar a ocorrência de *outliers*, a estratégia é selecionar voluntários com a maior homogeneidade possível, ou seja, com características físicas e clínicas bastante semelhantes. Além disso, o esquema de aleatorização deve ser bastante cuidadoso no que diz respeito ao balanceamento dos voluntários. Se isso não for possível através de uma aleatorização simples, deve-se optar por uma aleatorização estratificada.

De acordo com Noël *et al.* (2003a) o principal desafio para uma agência regulatória é escolher as medidas farmacocinéticas, o intervalo de bioequivalência e as probabilidades associadas (nível

de significância e poder) para determinar o que constitui um perfil de absorção significativamente diferente entre produtos e poder avaliar a bioequivalência.

A medida da área sob a curva de concentração plasmática versus tempo é universalmente aceita como característica da extensão de absorção do fármaco. Entretanto, a melhor medida para caracterizar a velocidade de absorção é bastante discutida. A concentração máxima ($Cmax$) é tradicionalmente escolhida como medida farmacocinética para mensurar a velocidade de absorção, porém $Cmax$ têm algumas desvantagens. Por exemplo, não é uma medida pura da velocidade de absorção, sofre influência da extensão de absorção da droga, além de ser dependente do cronograma de coleta. Uma alternativa seria o uso de $Tmax$ como medida característica da velocidade de absorção, mas $Tmax$ também é totalmente dependente do cronograma de coleta estabelecido e em casos de medicamentos de liberação modificada $Tmax$ apresenta menor propriedade para caracterizar a velocidade de absorção. Assim, uma outra opção é a razão entre $Cmax$ e ASC, já que nesse caso a influência da extensão de absorção é eliminada. Esse critério não é adotado pelas agências regulatórias e é questionado por alguns autores (TOZER; HAUCK, 1997).

Outra questão bastante discutida refere-se ao intervalo de confiança adotado no caso do $Cmax$. A agência regulatória americana (FDA) mantém o mesmo intervalo de confiança usado para ASC (0,80; 1,25). A ANVISA reconhece que "outros limites de intervalo de 90% de confiança, para $Cmax$, poderão ser aceitos mediante justificativas científicas "(RE Nº 1170, 2006). A Comunidade Européia aceita intervalo de bioequivalência mais amplo, (0,75; 1,33), enquanto que no Canadá somente é exigido que a razão das médias geométricas de $Cmax$ esteja dentro dos limites de 0,80; 1,25 e não todo o intervalo de 90% de confiança.

Por questões éticas e financeiras o número de amostras sangüíneas coletadas por voluntário é limitado. Então o cronograma de coleta deve ser planejado adequadamente para que a curva de concentração plasmática possa reproduzir com precisão a biodisponibilidade do fármaco. Não existe um cronograma padrão, mas a recomendação é que as medidas farmacocinéticas devem ser consideradas (meia vida, $Tmax$, K_a, K_e). Uma opção interessante é simular possíveis cronogramas, observar o que ocorre e juntamente com as informações sobre o fármaco elaborar o cronograma de coleta.

Outro problema referente ao cronograma de coleta é a diferença entre o tempo teórico e o tempo real de coleta. Para minimizar os atrasos nas coletas é feito um escalonamento entre os coletores para cada voluntário de sua responsabilidade. Ou seja, o coletor tem um tempo de deslocamento entre um voluntário e outro, sendo que cada grupo de voluntários receberá a medicação em tempos diferentes e a primeira coleta é o tempo zero (t_0) para todos os voluntários. Se mesmo usando o escalonamento de coletas ainda houver atrasos uma opção é utilizar o tempo real para calcular a área sob a curva de concentração plasmática.

Os estudos de simulação apresentados no Capítulo 3 não só contribuem de forma teórica, como podem ser utilizadas na prática nos planejamentos experimentais. Apesar deste trabalho ser relativamente abrangente, há limitações e necessidade de extensões, tais como:

- Detecção de tratamento de *outlier*: comparar o teste da distância das estimativas como método de detecção de *outlier*, indicado com o melhor apontado por Ramsay e Elkum (2005), com o critério do gráfico tipo *box-plot*;
- Estudo de $Tmax$: estudo de simulações considerando o teste não paramétrico para $Tmax$, e analisar a proporção de estudos que tem resultado favorável;
- Estudos desbalanceados: a partir da simulação dos dados individuais, gerar amostras com dados faltantes, ou por perdas nas coletas ou quando por alguma razão o número de voluntários das duas seqüências não é o mesmo, isto é, $n_1 \neq n_2$.
- Estudos sobre a violação dos pressupostos dos métodos estatísticos utilizados para avaliar bioequivalência, especialmente a homocedasticidade das medidas farmacocinéticas dos medicamentos de referência e teste.

Se houver completa integração entre as equipes envolvidas (clínica, analítica e estatística), cuidado no planejamento, além de condução e análise adequadas, se os fármacos são realmente bioquivalentes, espera-se que o estudo de bioequivalência tenha resultado favorável, isto é, que as formulações (T e R) sejam declaradas bioequivalentes. Entretanto, na prática não se pode ignorar dois possíveis erros: (i) apesar de haver bioequivalência entre T e R, a conclusão é de não bioequivalência; (ii) T e R não são bioequivalentes, mas a conclusão é pela bioequivalência. O primeiro erro é relacionado ao patrocinador e o segundo ao paciente. As conseqüências destes dois tipos de erros são diferentes, mas em qualquer caso, obviamente indesejáveis.

A concentração do estudo de simulação desta dissertação foi com relação ao controle do primeiro tipo de erro. Assim, estudos adicionais são necessários simulando situações sob a hipótese de não bioequivalência para compreender em quais circunstâncias um estudo é declarado bioequivalente quando na realidade não é. Finalmente, é importante reafirmar que o compromisso de um centro de bioequivalência, e em particular da equipe estatística, é com a verdade e não com interesses do patrocinador do estudo.

Referências

BRASIL. *Resolução RDC Nº 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos.* [S.l.]: Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003.

BRASIL. *Resolução RE Nº 1170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos.* [S.l.]: Diário Oficial da União, Brasília, 24 de abril de 2006.

BRASIL. *Resolução RE N° 898, de 29 de maio de 2003. Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.* [S.l.]: Diário Oficial da União, Brasília, 31 de março de 2003.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman & Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 11. ed. [S.l.]: Mc Graw Hill, 2006.

CHOW, S.; SHAO, J.; WANG, H. *Sample Size Calculations in Clinical Research.* [S.l.]: Marcel Dekker, 2003.

CHOW, S. C.; LIU, J. P. *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies.* [S.l.]: Marcel Dekker, 2000.

CHOW, S.-C.; SHAO, J.; WANG, H. A note on sample size calculation for mean comparisons based on noncentral t-statistics. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, v. 12 (4), p. 441 – 445, 2002.

CHOW, S.-C.; WANG, H. On sample size calculation in bioequivalence trials on sample size calculation in bioequivalence trials. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, v. 28 (2), p. 155–169, 2001.

DILLETTI, E.; HAUSCHKE, D.; STEINIJANS, V. W. Sample size determination for bioequivalence assessment by means of confidence intervals. *International Journal of ClinicalTherapy and Toxology*, v. 29, p. 1 – 8, 1991.

DONNER, A.; HAUCK, W. W.; ZOU, G. The impact of missing values in the concentration-time curve on the assessment of bioequivalence. *Pharmaceutical Statistics*, v. 4, p. 91 – 99, 2005.

HAUSCHKE, D.; STEINIJANS, V.; PIGEOT, I. *Bioequivalence Studies in Drug Development.* [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

JULIOUS, S. A. Designing clinical trials with uncertain estimates of variability. *Pharmaceutical Statistics*, v. 23(2), p. 261 – 268, 2004.

KONG, F. H.; RENE, G. Optimal sampling times in bioequivalence tests. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, v. 10 (1), p. 31 – 44, 2000.

MANUAL de Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência Siqueira, A. L. and Wada, C. Y. and Chiann, C. and Bernasconi, G. and Ferreira, K. A. [S.l.], 2002.

NOëL, F.; SANTOS, F. M.; SILVEIRA, G. P. E. Análise crítica do uso do parâmetro cmáx como critério para determinação de bioequivalência. *Infarma*, v. 15, p. 48–50, 2003.

NOëL, F.; SILVEIRA, G. P. E.; SANTOS, F. M. Teste de bioequivalência para fármacos que apresentam farmacocinética altamente variável. *Infarma*, v. 15, p. 68–69, 2003.

PATTERSON, S.; JONES, B. *Bioequivalence and Statistics in Clinical Phamacology.* [S.l.]: Chapman & Hall, 2006.

PHILLIPS, K. E. Power of the two one-sided tests procedure in bioequivalence. *Journal of Pharmacokinetic and Biopharmaceutical*, v. 18, p. 137 – 143, 1990.

PORTA, V.; CHANG, K. H.; STORPIRTIS, S. Evaluation of the bioequivalence of capsules containing 150 mg of fluconazole. *International Journal of Phamaceutics*, v. 288, p. 81 – 86, 2005.

RAMSAY, T.; ELKUM, N. A comparison of four different methods for outlier detection in bioequivalence studies. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, v. 15, p. 43 – 52, 2005.

SENN, S.; D'ANGELO, G.; POTVIN, D. Carry-over in cross-over trials in bioequivalence: theoretical concerns and empirical evidence. *Pharmaceutical Statistics*, v. 3, p. 133 – 142, 2004.

SIQUEIRA, A. L. *et al.* Comparison of sample size formulae for 2 x 2 cross-over designs applied to bioequivalence studies. *Pharmaceutical Statistics*, v. 4(4), p. 233 – 243, 2005.

STORPIRTIS, S. *et al.* A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. *Infarma*, v. 16, p. 51–56, 2004.

TOZER, T. N.; HAUCK, W. W. Cmax/auc, a commentary. *Pharmaceutical Research*, v. 14 (8), p. 967–968, 1997.

Anexo

Dados de Chow e Liu (2000) página 73.

Seqüência		Voluntário	Período	
			1	2
1	RT	1	74,675	73,675
	RT	4	96,400	93,250
	RT	5	101,950	102,125
	RT	6	79,050	69,450
	RT	11	79,050	69,025
	RT	12	85,950	68,700
	RT	15	69,725	59,425
	RT	16	86,275	76,125
	RT	19	112,675	114,875
	RT	20	99,525	116,250
	RT	23	89,425	64,175
	RT	24	55,175	74,575
2	TR	2	74,825	37,350
	TR	3	86,875	51,925
	TR	7	81,675	72,175
	TR	8	92,700	77,500
	TR	9	50,450	71,875
	TR	10	66,125	94,025
	TR	13	122,450	124,975
	TR	14	99,075	85,225
	TR	17	86,350	95,925
	TR	18	49,925	67,100
	TR	21	42,700	59,425
	TR	22	91,725	114,050

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