

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EDUARDO AGOSTINHO FREITAS FERNANDES

**ANÁLISE DOS FATORES QUE INTERFEREM NOS RESULTADOS DOS ESTUDOS
DE BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra Dâmaris Silveira

Co-Orientador: Prof. Dr Maurício Homem de Melo

BRASÍLIA

2011

EDUARDO AGOSTINHO FREITAS FERNANDES

ANÁLISE DOS FATORES QUE INTERFEREM NOS RESULTADOS DOS ESTUDOS
DE BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS NO BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 26 de julho de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Dâmaris Silveira – presidente
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Francisco de A. Rocha Neves
Universidade de Brasília

Dra. Camila Fracalossi Redigueri
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Dedico esse trabalho:

Ao meu Pai, Nelson, que pelo pouco tempo de convívio conseguiu ensinar tantas coisas importantes.

A minha mãe, Nilza, pelo apoio e incentivo para que eu continuasse sempre estudando.

A minha irmã, Danielle, que sempre serviu de incentivo e recentemente presenteou a nossa família com a chegada do Murilo.

A minha esposa, Denise, pela convivência e apoio à realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe pelo carinho e incentivo para a realização deste trabalho.

À Denise, que sempre me apoiou desde a seleção até a defesa da dissertação.

Aos amigos da Anvisa Ana Cecília, Camila Redigueri, Carolina Pingret, Fábio Santana, Gisele Albo, Kalinka Carrijo, Renato Almeida Lopes e Rodrigo Cristofolletti pela ajuda na coleta dos dados, disponibilização de informações relevantes e desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos Diana Nunes, Daniela Vieira, João Tavares e Renato Hurtado pelo incentivo para concluir o curso de mestrado.

À professora Dâmaris e ao professor Maurício, pelos ensinamentos e orientação neste trabalho.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por permitir a utilização de dados.

RESUMO

Os estudos de bioequivalência, necessários para registro de medicamentos genéricos e similares no Brasil, tratam-se de ensaios comparativos, realizados com seres humanos, onde são avaliados os parâmetros pico da concentração máxima (C_{max}) e área sob a curva (ASC). Com esses estudos, pretende-se concluir que um candidato a medicamento genérico ou similar é bioequivalente ou bioinequivalente em relação ao seu respectivo medicamento de referência.

Dois fatores relacionados ao fármaco presente no medicamento que podem influenciar na conclusão do estudo são a classificação biofarmacêutica do fármaco e a sua variabilidade, enquanto dois fatores relacionados à formulação que também podem influenciar na conclusão são o perfil de dissolução e os excipientes.

A bioisenção consiste na correlação da dissolução *in vitro* do medicamento com a biodisponibilidade *in vivo* e baseia-se na solubilidade e permeabilidade gastrointestinal do fármaco como fatores fundamentais para controlar a velocidade e a quantidade de fármaco absorvido.

Medicamentos cujos fármacos foram classificados como classe I e III do sistema de classificação biofarmacêutica foram associados com a conclusão bioequivalência, enquanto que aqueles classificados como classe II foram associados com a conclusão bioinequivalência. Para os classe IV não foi possível fazer esta associação. Verificou-se também que o coeficiente de variação do fármaco também influencia na conclusão.

Com relação aos fatores relacionados à formulação, verificou-se que não houve associação entre o perfil de dissolução e a conclusão do estudo de bioequivalência.

Palavras chave: bioequivalência, sistema de classificação biofarmacêutica, bioisenção, variabilidade, perfil de dissolução e excipiente

ABSTRACT

The bioequivalence studies, required for registration of generic and similar medicines in Brazil, are comparative trials conducted with humans, where the parameters evaluated are peak concentration (C_{max}) and area under the curve (AUC). With these studies, we intend to conclude that a candidate for a generic or similar drug is bioequivalent or bioinequivalente in relation to their respective reference medicine.

Two factors related to the active principal ingredient of pharmaceuticals that may influence the conclusion of the study are the biopharmaceutic drug classification and its variability, while two factors related to the formulation that can also influence the conclusion is the dissolution profile and the excipients.

The biowaiver is the correlation of *in vitro* dissolution of the medicine with bioavailability *in vivo* and is based on the solubility and gastrointestinal permeability of the drug as key factors to control the speed and amount of drug absorbed.

Pharmaceuticals whose active principal ingredient were classified as class I and III of the biopharmaceutic classification system were associated with the outcome bioequivalence, while those classified as class II were associated with the outcome bioinequivalence. For class IV was not possible to make this association. It was also found that the coefficient of variation of the drug also influences the conclusion.

Therefore, regarding the factors related to the formulation, it was found that there was no association between the dissolution profile and the outcome of the bioequivalence study.

Key-words: bioequivalence, biopharmaceutic drug classification, biowaiver, variability, dissolution profile and excipient

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva de concentração do fármaco <i>versus</i> tempo de coleta, com representação das principais medidas farmacocinéticas(21).....	24
Figura 2 - Distribuição hipotética de resultados de estudos de bioequivalência (adaptado de Davit et al., 2008) (26).....	27
Figura 3 - Relação entre porcentagem de fármaco ionizado / não ionizado, e pH e pKa de ácidos fracos (adaptado de Martinez & Amidon, 2002)(35).....	31
Figura 4 - Relação entre porcentagem de fármaco ionizado / não ionizado, e pH e pKa de bases fracas (adaptado de Martinez & Amidon, 2002)(35)	32
Figura 5 - Transporte pela membrana gastrointestinal (adaptado de Lobenberg & Amidon, 2000)(36).....	33
Figura 6 - Relação entre permeabilidade humana e fração de dose absorvida (adaptado de Lobenberg & Amidon, 2000) (36)	36
Figura 7 - Média das concentrações plasmáticas (mais desvios padrões) de deferaxirox após administração de dose oral (▲) e endovenosa (●) (46).....	41
Figura 8 - Apresentação esquemática da técnica denominada Loc-I-Gut, permitindo perfusão intestinal seccional em humanos (adaptado de Petri et al., 2003)(51)	43
Figura 9 - Modelo de balanço de massa para perfusão intestinal no estado de equilíbrio (adaptado de Ehrardt & Kim, 2008) (52).....	44
Figura 10 - Exemplo de perfil de dissolução comparativo considerado semelhante ($f_1 = 3,05$ e $f_2 = 73,88$).....	62
Figura 11 - Exemplo de curvas de perfis de dissolução comparativo não semelhantes ($f_1 = 24,82$ e $f_2 = 30,16$).....	62
Figura 12 - Exemplo de perfil de dissolução comparativo considerado semelhante, pois ambos produtos, teste e referência, apresentaram dissolução muito rápida ($\geq 85\%$ em 15 minutos).....	63
Figura 13 - Média das concentrações plasmáticas de ranitidina em 20 voluntários sadios após a administração solução contendo ranitidina com a adição de 5 gramas de sorbitol (circulo aberto) e de 5 gramas de sacarose (círculo fechado)(Adaptado de Chen et al., 2007) (82).....	68

Figura 14 - Média das concentrações de ranitidina em 24 voluntários sadios após a administração de 150 mg de ranitidina em solução contendo a adição de 0 (●), 1,25 (▲), 2,5 (■) e 5 gramas (◆) de sorbitol (Adaptado de Chen et al., 2007)(82).....	70
Figura 15 - Prevalência de estudos bioequivalentes e não bioequivalentes em relação à classificação biofarmacêutica (SCB) do princípio ativo (período 2002 a 2009). Dados obtidos através do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência (padrão).....	78
Figura 16 - Porcentagem de estudos não bioequivalentes de acordo com a classificação biofarmacêutica do princípio ativo (período: 2002-2009). Dados obtidos através do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência.....	79
Figura 17 - Resultado da análise de correspondência para os estudos de bioequivalência obtidos no período 2002 a 2009. Dados obtidos através do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência.....	80
Figura 18 - Prevalência de estudos bioequivalentes e não bioequivalentes em relação à classificação biofarmacêutica do princípio ativo. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010	83
Figura 19 - Porcentagem de estudos não bioequivalentes de acordo com a classificação biofarmacêutica do princípio ativo. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.	84
Figura 20 - Resultado da análise de correspondência para os estudos de bioequivalência. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.....	85
Figura 21 - Prevalência de estudos bioequivalentes e não bioequivalentes obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010, cujos princípios ativos apresentam coeficiente de variação < 30 e coeficiente de variação > 30%.....	88
Figura 22 - Gráfico relacionando o número de estudos de bioequivalência conduzidos em relação ao CV do fármaco apresentado, a adequação do número de voluntários(29)	

incluídos no estudo e à conclusão do estudo, considerando uma diferença presumida entre T e R de 0%. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.....89

Figura 23 - Gráfico relacionando o número de estudos de bioequivalência conduzidos em relação ao CV do fármaco apresentado, a adequação do número de voluntários(29) incluídos no estudo e à conclusão do estudo, considerando uma diferença presumida entre T e R de 5%. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.....91

Figura 24 - Gráfico relacionando o número de estudos de bioequivalência conduzidos em relação à sua conclusão e à conclusão do perfil de dissolução. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/201094

Figura 25 - Gráfico relacionando o número de estudos de perfil de dissolução conduzidos em relação à sua conclusão, ao tipo de método de dissolução utilizado e à conclusão do estudo de bioequivalência. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/201095

Figura 26 - Gráfico relacionando a conclusão do estudo de perfil de dissolução e a adição de tensoativo ao meio de dissolução. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/201096

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Participação dos genéricos no mercado de medicamentos por país.....	17
Tabela 2 - Número de voluntários necessários para a condução do estudo de bioequivalência em relação ao CV intrassujeito do fármaco avaliado e a diferença esperada entre T e R(29)	28
Tabela 3 - Classificação dos fármacos pela SCB e o passo limitante da absorção	37
Tabela 4 - Comparação entre os programas usados para determinar Log P (adaptado de Leo & Hoekman, 2000)(60)	52
Tabela 5 - Principais vantagens e desvantagens de alguns métodos <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> , <i>in situ</i> e <i>in silico</i> utilizados para a determinação da permeabilidade de fármacos.	53
Tabela 6 - Comparação dos critérios estabelecidos pela FDA, OMS, EMA e Anvisa para estabelecer a classificação biofarmacêutica dos fármacos.....	56
Tabela 7 - Descrição comparativa das condições necessárias para a condução dos ensaios <i>in vitro</i> para fins de isenção da realização de estudos de bioequivalência de acordo com os guias da FDA, OMS, EMA e Anvisa.....	66
Tabela 8 - Principais vantagens e desvantagens do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência e do Sistema de Informações de Estudo de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb).....	76
Tabela 9 - Relação entre número de estudos de bioequivalência concluídos e sua adequação ao número de voluntários que concluíram o estudo, considerando uma diferença entre o medicamento teste e referência de 0%. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.....	90
Tabela 10 - Relação entre número de estudos de bioequivalência concluídos e sua adequação ao número de voluntários que concluíram o estudo, considerando uma diferença entre o medicamento teste e referência de 5%. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.....	91
Tabela 11 - Relação entre a conclusão do estudo de perfil de dissolução e o tipo de método de dissolução utilizado. Dados obtidos através do Sistema de Informações de	

Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.....	96
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fluxograma de seleção de estudos submetidos à Anvisa via Sineb no período de setembro de 2008 a agosto de 2010, para análise de prevalência da conclusão em relação ao SCB.....	82
Quadro 2 - Fluxograma de seleção de estudos submetidos à Anvisa via Sineb no período de setembro de 2008 a agosto de 2010, para análise da variabilidade	87
Quadro 3 - Fluxograma de seleção de estudos submetidos à Anvisa via Sineb no período de setembro de 2008 a agosto de 2010, para análise do perfil de dissolução	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC – Área Sob a Curva de Concentração

C_{max} – Pico da Concentração Máxima

CV – Coeficiente de Variação

DHA – Diidroartemisinina

EMA – European Medicines Agency (anteriormente conhecida pela abreviatura EMEA)

F – Fração de dose absorvida

FD – Quantidade Total de Fármaco Absorvido

FDA – Food And Drug Administration

FIP – Federação Internacional de Farmácia

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

K_e – Constante de Eliminação

P_{eff} – Permeabilidade

P-gp – Glicoproteína P

PNM – Política Nacional de Medicamentos

R – Medicamento Referência

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução Específica

SCB – Sistema de Classificação Biofarmacêutica

Sineb – Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência

SUS – Sistema Único de Saúde

T – Medicamento Teste

TSLR – Therapeutic System Research Laboratories

tk – Último Tempo de Coleta

T_{max} – Tempo no Pico da Concentração Máxima

UV – Ultra Violeta

Vd – Volume de Distribuição

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 BIOEQUIVALÊNCIA E BIODISPONIBILIDADE RELATIVA.....	19
1.2 VARIABILIDADE	25
1.3 BIOISENÇÃO	29
1.3.1 Solubilidade	30
1.3.2 Permeabilidade	33
1.3.3 Permeabilidade e Absorção	38
1.3.4 Determinação da Absorção	40
1.3.4.1 Modelos <i>in vivo</i>	40
1.3.4.1.1 <i>Biodisponibilidade absoluta</i>	40
1.3.4.1.2 <i>Loc-I-gut</i>	42
1.3.4.1.3 <i>Balanço de Massas</i>	44
1.3.4.2 Modelos <i>in vitro</i>	46
1.3.4.2.1 <i>Segmentos Intestinais:</i>	46
1.3.4.2.2 <i>Modelos celulares</i>	47
1.3.4.3 Modelo <i>in situ</i>	49
1.3.4.4 Modelo <i>in silico</i>	51
1.3.4.5 Comparação dos Métodos	52
1.3.5 Como classificar os fármacos	54
1.4 CORRELAÇÃO <i>IN VITRO/IN VIVO</i>	57
1.4.1 A regulamentação do estudo de perfil de dissolução pela Anvisa	60
1.4.2 Correlação <i>in vitro/in vivo</i> para bioisenção	65
1.5 EXCIPIENTES.....	67
2 OBJETIVO GERAL	73
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	73
3 MATERIAIS E MÉTODOS	74
3.1 MATERIAIS.....	74
3.2 MÉTODOS	74
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76

4.1 QUANTO AOS INTERFERENTES LIGADOS AO FÁRMACO	77
4.1.1 Classificação Biofarmacêutica	77
4.1.2 Variabilidade	87
4.2 QUANTO AOS INTERFERENTES LIGADOS À FORMULAÇÃO	93
4.2.1 Perfil de Dissolução Comparativo.....	93
4.2.2 Excipientes.....	97
5 CONCLUSÃO.....	99

1 INTRODUÇÃO

A política de saúde no Brasil, que inclui a Política Nacional de Medicamentos (PNM), a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), a promulgação da lei de medicamentos genéricos, bem como a publicação das resoluções que estabelecem os critérios técnicos para seu registro, revolucionou o mercado farmacêutico brasileiro na última década, introduzindo vários conceitos como equivalência farmacêutica, terapêutica e biodisponibilidade, aliados à certificação de boas práticas de fabricação e controle de qualidade (1).

Com o objetivo de aumentar o acesso ao medicamento e garantir sua qualidade, segurança e eficácia, foi estabelecido o registro de medicamentos genéricos, pela Lei nº. 9787/1999, atendendo a uma das prioridades da PNM e implementando a Política de Medicamentos Genéricos (2).

A Lei 9.787/1999 também definiu a Anvisa como órgão incumbido de regulamentar os critérios para o estabelecimento das condições para o registro e o controle da qualidade dos medicamentos genéricos, incluindo provas de biodisponibilidade, aferição da equivalência terapêutica para caracterização de sua intercambiabilidade e critérios para dispensação e prescrição (2).

Apesar da lei 9.787/1999 apresentar a definição de medicamentos genéricos, similares, inovadores, bioequivalência e biodisponibilidade relativa, ela ainda não descreve toda a regulamentação necessária para a introdução desses medicamentos no mercado. Isto foi feito somente com as regulamentações posteriores da Anvisa (2).

Sendo assim, em 9 de agosto de 1999, foi publicada pela Anvisa a resolução da diretoria colegiada (RDC) n. 391, de 09 de agosto de 1999, estabelecendo as normas para registros de medicamentos genéricos no país e trazendo, anexos, o guia para realização de estudo de estabilidade, o guia para protocolo e relatório técnico de estudo de biodisponibilidade ou de bioequivalência, o guia para validação de métodos analíticos, o guia para modelo de relatório de estudo de equivalência farmacêutica, o guia para isenção de estudos de bioequivalência e a primeira lista de medicamentos de referência (3).

A RDC 391/1999 foi revisada um ano e meio após a sua publicação, dando origem à RDC n. 10, de 02 de janeiro de 2001. A partir daquele momento foi iniciado um processo de revisão sistemático do regulamento técnico para registro de medicamentos genéricos (4). Por meio da RDC n. 84, de 19 de março de 2002, foi publicada uma atualização dos critérios a serem seguidos pelas empresas interessadas em registrar medicamentos genéricos no país (5). Os critérios técnicos para o registro de medicamentos genéricos foram atualizados, por meio da RDC n. 135, de 29 de maio de 2003 (6), que foi substituída por uma nova norma, a RDC n. 16, de 02 de março de 2007, que estabeleceu os preceitos e procedimentos técnicos para registro de medicamento genérico no Brasil e está em vigor até o momento (7).

Após 11 anos de sua implantação no Brasil, os genéricos respondem por 20,6% das vendas em unidades no conjunto do mercado farmacêutico. Em países como Espanha, França, Alemanha e Reino Unido, onde o mercado de genéricos já se encontra mais maduro, a participação desses medicamentos é de 30%, 35%, 60% e 60%, respectivamente. Nos EUA, mercado onde os genéricos têm mais de 20 anos de existência, o índice é de aproximadamente 60% de participação em volume. A Tabela 1 apresenta uma comparação da participação dos genéricos no mercado de medicamentos para alguns países (8).

Tabela 1 - Participação dos genéricos no mercado de medicamentos por país

<i>País</i>	<i>% em Valor</i>	<i>% em Unidades</i>
E.U.A	13	60
Alemanha	26	60
Reino Unido	26	60
Canadá	22	45
França	14	35
Espanha	13	30

A primeira tentativa de inserir medicamentos a preços mais acessíveis no País foi a introdução, no mercado brasileiro, dos medicamentos similares, quando o governo brasileiro, por meio da Lei nº 5.772/1971, decidiu não reconhecer patentes para medicamentos. A Lei nº 5772/1971 aboliu os privilégios sobre patentes no Brasil,

estabelecendo que não são privilegiáveis as substâncias, matérias, misturas ou produtos alimentícios, químicos, farmacêuticos e medicamentos de qualquer espécie, bem como os respectivos processos de obtenção ou modificação. A partir da sua publicação, qualquer substância ativa descoberta podia ser copiada, por similaridade (9, 10).

Com a Lei nº 6.360/1976, as indústrias farmacêuticas foram autorizadas a registrar produtos similares ao medicamento inovador, e para tais produtos não era exigida a comprovação da equivalência terapêutica (equivalência farmacêutica + biodisponibilidade relativa) com o inovador; somente a semelhança de princípio ativo, concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica(11, 12). A autorização de registro sem provas de equivalência terapêutica perdurou até o ano de 2003, quando foi publicada a RDC n. 133, de 29 de maio de 2003, que estabeleceu a necessidade da apresentação das provas de equivalência farmacêutica e biodisponibilidade relativa para os similares a serem registrados, praticamente igualando os critérios técnicos necessários para o registro de medicamentos genéricos (13).

Concomitantemente foi publicada a RDC n. 134, de 29 de maio de 2003, estabelecendo o prazo de até 10 anos para a adequação dos medicamentos similares já existentes no mercado (14).

Sendo assim, com a publicação das normas RDC 133/2003, RDC 134/2003 e RDC 135/2003 tanto para o registro dos medicamentos genéricos e quanto para os similares é necessário apresentar as provas quanto à equivalência terapêutica aos respectivos medicamentos de referência (6, 13). Com essas normas foi assegurada, a partir do término do prazo de adequação, a intercambiabilidade do medicamento similar com o medicamento referência, assim como para os medicamentos genéricos, passou a ser assegurada por testes de equivalência farmacêutica (por meio de ensaios *in vitro* é provado que o medicamento genérico ou similar possui os mesmos padrões de qualidade referentes à identificação, dosagem, pureza, potência, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução, quando for o caso, que o medicamento referência) e bioequivalência (onde é mostrado que o medicamento genérico ou similar não possui diferenças estatisticamente significativas em relação à

biodisponibilidade quando administrado na mesma dose molar do medicamento referência) (15).

1.1 BIOEQUIVALÊNCIA E BIODISPONIBILIDADE RELATIVA

A primeira definição oficial de bioequivalência no Brasil foi apresentada na Lei 9.787/1999, que estabeleceu os medicamentos genéricos (3). De acordo com o texto oficial, bioequivalência consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre dois produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio(s) ativo(s), e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental (1). A Lei 9787 não trouxe o conceito de equivalentes terapêuticos, que surgiu somente nas resoluções da Anvisa que tratam do tema. Em 02 de março de 2007, foi publicada a RDC 16/2007 que estabeleceu que medicamentos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos que, ao serem administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação à biodisponibilidade (7). Concomitantemente foi publicada a RDC 17, de 02 de março 2007, que estabeleceu que biodisponibilidade relativa é o quociente da quantidade e velocidade de princípio ativo que chega à circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um preparado e a quantidade e velocidade de princípio ativo que chega à circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um produto de referência que contenha o mesmo princípio ativo (16). Essas normas, até o momento, vigoram para registro de medicamentos genéricos no Brasil.

Considerando que, para a ação sistêmica, os fármacos devem estar disponíveis na corrente sanguínea para desencadear a resposta farmacodinâmica, a biodisponibilidade significa a quantidade de fármaco e a velocidade com a qual esse atinge a corrente circulatória. Sendo assim, dois medicamentos são considerados bioequivalentes, quando possuírem a mesma biodisponibilidade, não apresentando diferenças significativas na quantidade absorvida do fármaco ou na velocidade de

absorção, quando administrados em dose equivalente, sob as mesmas condições experimentais.

No entanto, há a possibilidade de alguns medicamentos serem equivalentes em relação à quantidade absorvida, diferindo em relação à velocidade de absorção e, mesmo assim, serem considerados bioequivalentes. Isso ocorre quando a diferença de velocidade de absorção é intencional, como nas preparações de liberação controlada, ou ainda nos casos em que a mesma não é essencial para alcançar a concentração terapêutica efetiva, como por exemplo, nos fármacos de uso crônico (17).

De acordo com o *Code of Federal Regulation* (18), a biodisponibilidade e a bioequivalência podem ser determinadas por métodos *in vivo* e/ou *in vitro* diversos. No entanto, o método selecionado dependerá dos objetivos do estudo, das técnicas analíticas disponíveis e da natureza do produto, devendo ser usado aquele que apresente maior exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade. Considerando esses parâmetros, os principais estudos para a determinação da biodisponibilidade e bioequivalência de produtos farmacêuticos podem ser listados, em ordem decrescente em relação à exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade (18):

1. Ensaio *in vivo* em humanos onde a concentração do fármaco, ou, quando apropriado, a do seu metabólito, é determinada em sangue total, plasma ou outro líquido biológico em função do tempo. Este método é aplicável para formas farmacêuticas destinadas a introduzir o fármaco na corrente sanguínea para posterior distribuição sistêmica no organismo.
2. Ensaio *in vivo* em humanos onde a concentração do fármaco, ou, quando apropriado, a do seu metabólito, é determinada em urina em função do tempo. Os intervalos das medidas devem ser os menores possíveis para que a velocidade de eliminação seja a mais exata possível. Este método não é apropriado quando a excreção urinária não é um mecanismo de liberação significativa.
3. Ensaio *in vivo* em humanos no qual o efeito farmacológico do fármaco, ou, quando apropriado, o do seu metabólito, é determinado em função do tempo, com exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade suficiente. É aplicável na inexistência de métodos capazes de quantificar o fármaco ou seus metabólitos em líquidos biológicos ou produtos de excreção, mas há métodos disponíveis para a determinação do efeito

farmacológico agudo do fármaco. Este tipo de método pode ser particularmente aplicável para formas farmacêuticas que não liberem o fármaco para a corrente sanguínea para distribuição sistêmica.

4. Ensaios clínicos em humanos que estabelecem a segurança e a eficácia do produto, com o propósito de determinar a biodisponibilidade ou com delineamento comparativo apropriado para demonstrar a bioequivalência. Este método é o menos exato, sensível e reprodutível para a determinação da bioequivalência e deverá ser aceito somente quando da inexistência de método analítico apropriado. No entanto, este método pode ser considerado suficientemente exato para a quantificação da biodisponibilidade ou demonstração da bioequivalência para fármacos de efeito local, como por exemplo, preparações para a pele, olhos e mucosas, formas farmacêuticas orais não absorvíveis ou até broncodilatadores administrados por inalação se o início e a duração do efeito farmacológico são bem definidos.

5. Teste *in vitro* que assegure a biodisponibilidade e que seja aceito pelas autoridades reguladoras.

6. Qualquer outro estudo que seja considerado adequado para determinação da biodisponibilidade ou estabelecer a bioequivalência.

Entretanto, apesar da RDC 17/2007 prever a realização dos mesmos tipos de estudos citados anteriormente para a determinação da biodisponibilidade e da bioequivalência, a grande maioria dos estudos realizados para registro de medicamentos no Brasil segue o modelo farmacocinéticos *in vivo* em humanos, onde a concentração do fármaco em estudo, ou a do seu metabólito, deve ser determinada em função do tempo na corrente sanguínea ou em urina (7, 19, 20).

Estudos de biodisponibilidade em humanos normalmente são conduzidos em uma população adulta normal sob condições padronizadas. No entanto, em algumas situações é possível que haja uma preferência para a condução desses estudos em pacientes adequados. Pacientes em estado crítico não devem ser incluídos nesses estudos, a não que ser seja determinado um potencial benefício para o paciente (18).

As medidas farmacocinéticas avaliadas na bioequivalência derivam diretamente da curva de concentração do medicamento ao longo do tempo, que é caracterizada pela quantificação de um determinado número de amostras biológicas, relativas a

tempos de coleta previamente estabelecidos. A primeira e mais importante medida avaliada é a área sob a curva de concentração plasmática (ASC) do fármaco *versus* tempo, freqüentemente utilizada para medir a extensão da absorção, ou o montante total de droga absorvido pelo organismo, após administração de dose única de um medicamento. A determinação da bioequivalência entre dois medicamentos resulta da comparação das ASC obtidas no experimento, que pode ser representada matematicamente como (21):

$$ASC = FD/Ke.Vd$$

Esta medida é diretamente proporcional à quantidade de fármaco efetivamente absorvida e disponível para ser distribuída no organismo (*FD*). O termo *Ke.Vd* expressa o *clearance* total do fármaco (depuração), ou seja, sua velocidade de eliminação a partir do volume de distribuição aparente (*Vd*) e *Ke*, corresponde à constante de velocidade de eliminação total do fármaco no organismo (21).

Dentre diversos métodos para a determinação da ASC do tempo zero até o tempo da última coleta (*t_k*), o mais utilizado é o método dos trapezóides. Esse método consiste na soma das áreas dos trapézios determinados pelos tempos de coleta e respectivas concentrações, conforme apresentado na figura 1 abaixo. Sejam *C₀*, *C₁*, *C₂*, ..., *C_k*, as concentrações obtidas em um experimento para os tempos de coleta 0, *t₁*, *t₂*, ..., *t_k*, respectivamente. A ASC de zero a *t_k*, denotada por *ASC_{0-t_k}*, é obtida da seguinte forma(21):

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

A área sob a curva de concentração *versus* tempo pode também ser extrapolada e calculada do tempo zero até o tempo relativo à completa eliminação do fármaco. Essa medida é denominada área sob a curva do tempo zero a infinito. A porção adicional é expressa por uma relação entre a última concentração medida *C_k* e a constante de

velocidade de eliminação do fármaco K_e . A constante de eliminação é calculada para cada voluntário como o coeficiente de inclinação da reta de regressão ajustada nos 4 a 6 últimos valores de concentração transformados em \log_{10} , multiplicada por 2,303. A área sob a curva de zero a infinito é obtida da seguinte maneira (21):

$$ASC_{\infty} = ASC_{t_k} + \frac{C_k}{K_e}$$

A ocorrência de alguns valores ausentes e/ou valores inesperados na curva de concentração, geralmente não acarretará um grande impacto no cálculo de ASC. Por outro lado, se esses valores forem relativos aos últimos pontos da curva, como por exemplo, t_k , a estimativa de ASC pode vir a ter um viés. De acordo com a RE n. 1170, de 19 de abril de 2006, a área sob a curva do tempo zero ao tempo t_k , deve ser igual ou superior a 80% da área sob a curva de zero a infinito, exceto em casos específicos (22).

A medida que representa a maior concentração do fármaco observada é o C_{\max} que é diretamente proporcional ao montante total de droga absorvido pelo organismo. T_{\max} é o tempo de coleta no qual foi observado a ocorrência de C_{\max} . Juntos, esses dois parâmetros relacionam-se com a velocidade de absorção do fármaco.

A determinação da bioequivalência entre dois medicamentos inclui a comparação das medidas de ASC e C_{\max} obtidas no experimento para cada uma das formulações (medicamentos teste e medicamento referência). A comparação dos valores de T_{\max} obtidos a partir de dois medicamentos não é necessária para determinação da bioequivalência entre eles.

As medidas ASC, C_{\max} e T_{\max} estão representadas na Figura 1 a seguir (21):

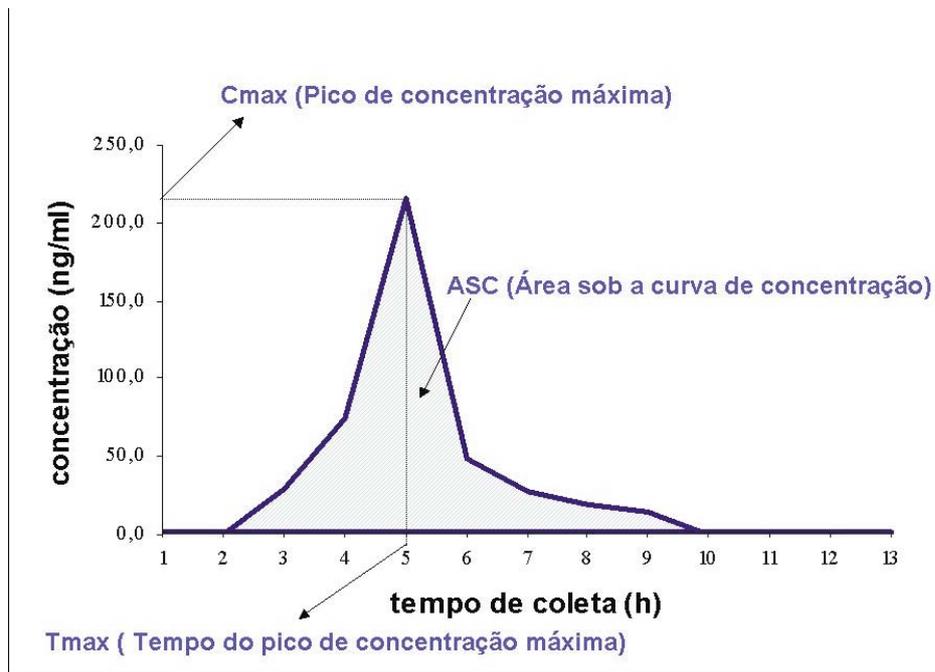


Figura 1 - Curva de concentração do fármaco *versus* tempo de coleta, com representação das principais medidas farmacocinéticas(21)

Em geral, o principal desenho utilizado para a realização de estudos de bioequivalência é denominado delineamento cruzado 2x2, onde cada indivíduo participante é designado para uma seqüência RT ou TR em dois períodos. Isto é, indivíduos alocados na seqüência RT recebem a formulação referência (R) no primeiro período de administração, e formulação teste (T) no segundo. Os indivíduos alocados na seqüência TR recebem a formulação teste (T) no primeiro período de administração, e formulação referência (R) no segundo. Os períodos são separados por um período de eliminação adequado ao fármaco (23).

Dois medicamentos são considerados bioequivalentes quando os valores extremos do intervalo de confiança de 90% da razão das médias geométricas (ASC_{0-tk} teste / ASC_{0-tk} referência e C_{max} teste / C_{max} referência) forem maiores que 0,8 e menores que 1,25. Ou seja, a conclusão da bioequivalência é alcançada quando o intervalo de confiança de 90% para os parâmetros C_{max} e ASC, obtidos através da média dos parâmetros dos voluntários, está compreendido entre 80 e 125% (17, 22). Com base nesses parâmetros, também adotados pela *Food and Drug Administration* (FDA), para efeitos regulatórios, dois medicamentos (teste e referência) que

apresentem bioequivalência farmacocinética são considerados intercambiáveis tanto no que se refere à equivalência terapêutica quanto à qualidade farmacêutica (24).

Contudo, deve ser considerado que a bioequivalência média é baseada na comparação das médias populacionais para medidas farmacocinéticas selecionadas e não nas variâncias de tais medidas (variabilidade intersujeitos). Conseqüentemente, o critério da bioequivalência média não consegue responder totalmente todas as questões relacionadas a intercambiabilidade para fármacos de janela terapêutica estreita, quer aquela relacionada ao novo usuário do medicamento (prescritabilidade), quer ao paciente em tratamento (permutabilidade) (25).

Outro ponto a considerar é a intercambiabilidade entre dois genéricos. A regulação baseia-se na bioequivalência estabelecida entre o medicamento genérico e o referência. Contudo, não está bem estabelecido que dois medicamentos genéricos para um mesmo medicamento referência possam ser intercambiáveis, considerando que a bioequivalência entre dois genéricos de um mesmo referência não é requerida (25).

1.2 VARIABILIDADE

Há um grande número de fatores que pode contribuir para a alta variabilidade de alguns fármacos. Alguns desses fatores estão relacionados ao trato gastrointestinal, como, por exemplo, o esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, pH do lúmen, presença de surfactantes como a bile e presença de alimento. A alta variabilidade pode também ser devida a um extensivo metabolismo pré-sistêmico, ocorrendo tanto no lúmen do trato gastrointestinal, células da mucosa intestinal; ou mesmo devido ao metabolismo de primeira passagem (26).

Ainda, diferenças absorptivas regionais do trato gastrointestinal podem levar a um perfil de absorção irregular para algumas substâncias. Pequenas substâncias hidrofílicas, como por exemplo, o paracetamol, e substâncias com lipofilia suficiente para cruzar a membrana, apresentam permeação da mucosa uniforme e eficiente ao

longo do intestino. Enquanto isto, a absorção é diminuída ao longo de todo o intestino delgado para substâncias altamente hidrofílicas (27).

Os fatores descritos acima descrevem as causas da variabilidade na absorção de substâncias relacionadas apenas às características do fármaco. No entanto, a formulação também pode contribuir para a alta variabilidade se, por exemplo, a velocidade de liberação do fármaco da forma farmacêutica for altamente variável. Neste caso, esse fato seria refletido numa baixa qualidade dos resultados dos testes de dissolução realizados antes do estudo de bioequivalência (26).

A variabilidade de um fármaco pode ser transformada em uma variável denominada coeficiente de variação (CV) que representa numericamente o quanto os parâmetros farmacocinéticos variam entre indivíduos diferentes (CV intersujeitos) e para o mesmo indivíduo (CV intrassujeito). Como a maioria dos estudos de bioequivalência realizados são do tipo cruzado 2 x 2, em que um mesmo sujeito toma os medicamentos teste e referência em períodos distintos, é utilizado o CV intrassujeito na determinação do número de voluntários necessários. Quanto maior o CV intrassujeito, maior o número de voluntários necessários para a condução do estudo de bioequivalência (23).

Como em bioequivalência há duas relações de grandezas entre o medicamento teste e o medicamento referência sendo avaliadas (C_{max} e ASC), cada uma apresenta seu CV próprio. Para fins de cálculo do número de voluntários necessários para a condução do estudo de bioequivalência, é utilizado o maior valor de CV intrassujeito disponível. Por exemplo, se durante a montagem do desenho do estudo de bioequivalência para o fármaco Albendazol forem encontrados na literatura disponível que o CV intrassujeito para C_{max} é de 41% e o CV intrassujeito para ASC é 34%, utiliza-se o valor de 41% para a realização dos cálculos relacionados ao número de sujeitos de pesquisa participantes.

Durante a condução de um estudo de bioequivalência, fármacos altamente variáveis são geralmente definidos como aqueles que apresentam coeficiente de variação intrassujeito para os parâmetros C_{max} ou ASC maior ou igual a 30% e, por causa de sua variabilidade, eles tendem a fazer que o intervalo de confiança calculado após a realização do estudo de bioequivalência seja mais largo, conforme demonstrado na Figura 2 (26, 28).

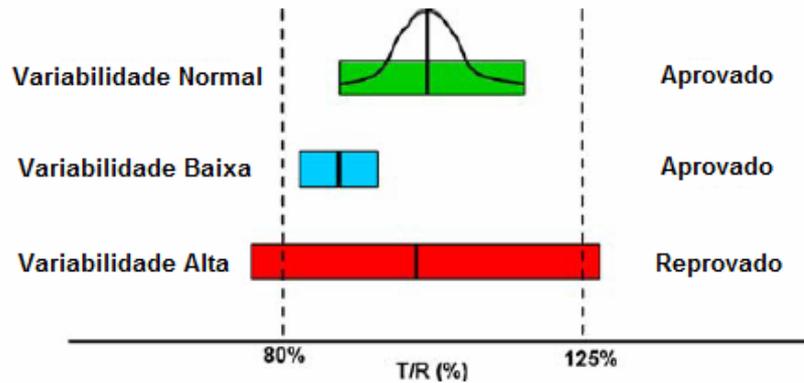


Figura 2 - Distribuição hipotética de resultados de estudos de bioequivalência (adaptado de Davit et al., 2008) (26)

A Figura 2 apresenta três resultados possíveis da análise estatística de estudos de bioequivalência. As três barras representam a largura do intervalo de confiança a 90% de estudos de bioequivalência com variabilidade normal (barra verde), baixa variabilidade (barra azul) e alta variabilidade (barra vermelha). Sobre a barra verde, também está sobreposta a curva que representa o intervalo de confiança de 90%, distribuído geometricamente simétrico sobre a média formulação teste / formulação referência, para um fármaco de variabilidade normal. Para a Anvisa, o produto teste é bioequivalente ao produto de referência quando o intervalo de confiança da média geométrica para C_{max} e ASC estiver dentro dos limites de 80 a 125%. Para fármaco de alta variabilidade o intervalo de confiança pode ultrapassar os limites estabelecidos para a conclusão da bioequivalência em virtude da variabilidade. A utilização de mais sujeitos de pesquisa no estudo tende a fazer com que o intervalo de confiança seja mais estreito (26).

Chow & Liu (2008) (29) apresentaram o cálculo do tamanho da amostra necessária para a condução de estudo de bioequivalência, com base na função de poder do teste de 80% por hipótese de intervalo de Schuirmann (Tabela 2). Entende-se por poder do teste como sendo a probabilidade de aceitar a bioequivalência entre o produto teste (T) e referência (R) corretamente, ou seja, de concluir que duas formulações T e R são bioequivalentes, quando de fato elas são (23, 29).

Para o cálculo do tamanho de amostra proposto por Chow & Liu (2008) (29), também devem ser consideradas as diferenças esperadas para T e R, descritas pelo termo $100 \times (\mu_T - \mu_R)/\mu_R$. Segundo a RDC 31/2010 (30), é recomendável que esta diferença não seja superior a 5%.

Tabela 2 - Número de voluntários necessários para a condução do estudo de bioequivalência em relação ao CV intrassujeito do fármaco avaliado e a diferença esperada entre T e R(29)

CV (%)	$100 \times (\mu_T - \mu_R)/\mu_R$	
	0%	5%
10	8	8
12	8	10
14	10	14
16	14	16
18	16	20
20	20	24
22	24	28
24	28	34
26	32	40
28	36	46
30	40	52
32	46	58
34	52	66
36	58	74
38	64	82
40	70	90

Analisando a Tabela 2, pode ser observado que quanto maior a diferença esperada entre T e R, maior é o número de sujeitos de pesquisa participando do estudo de bioequivalência. Ou seja, nos casos em que o cálculo do número de sujeitos de pesquisa partir do pressuposto que a diferença entre T e R for de 5%, o número será maior do que nos casos onde a diferença esperada entre T e R for de 0%.

Entretanto, é importante ressaltar que é possível que um estudo de bioequivalência apresente um resultado estreito dentro dos limites do intervalo de confiança, permitindo assim sua aprovação, com a utilização de um número de sujeitos de pesquisa menor do que o indicado na Tabela 2. O que está sendo exposto é que

quanto maior o número de sujeitos de pesquisa participantes, maiores são as chances de estreitar o intervalo de confiança, contribuindo assim para a aprovação do estudo.

Entretanto Cook e colaboradores (2010) afirmam que o aumento do número de sujeitos de pesquisa é limitado, pois eleva os custos envolvidos para a realização dos estudos de bioequivalência (31).

1.3 BIOISENÇÃO

A solubilização do fármaco e sua posterior absorção são pré-requisitos para obtenção da resposta clínica para a maioria dos medicamentos. Sendo assim, é óbvia a correlação existente entre o processo de solubilização e a biodisponibilidade dos fármacos. Apesar de haver um intenso processo de pesquisa envolvendo a criação de modelos que pretendem relacionar a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo*, prever a biodisponibilidade do fármaco com base na sua dissolução ainda é difícil, por conta da complexidade de fatores que ocorrem no trato gastrointestinal, como por exemplo, estado de jejum ou alimentado, tempo de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, variação do conteúdo do lúmen (variação de pH, enzimas, surfactantes, lipídios), assim como mecanismo de absorção, permeabilidade e variação das propriedades físico-químicas durante o trânsito no TGI (32).

Sendo assim, após a realização de experimentos em 1995, foi proposto por Gordon L. Amidon e colaboradores (32) a criação do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB). Este sistema busca correlacionar a dissolução *in vitro* do medicamento com a biodisponibilidade *in vivo* do fármaco, considerando que a dissolução, a solubilidade e a permeabilidade gastrointestinal são fatores fundamentais para controlar a velocidade e a quantidade de fármaco absorvido de formas farmacêuticas sólidas (32).

O objetivo do SCB é fornecer uma ferramenta regulatória para substituir alguns estudos de bioequivalência, realizados em humanos, por ensaios de dissolução *in vitro*, diminuindo assim a utilização de voluntários de pesquisa, bem como o custo e o tempo

para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. Essa substituição de estudos *in vivo* por aqueles desenvolvidos *in vitro* é denominada bioisenção (33).

O SCB pode também auxiliar na previsão de absorção *in vivo* e identificar se a biodisponibilidade de determinado produto farmacêutico é sensível a alterações do processo produtivo, dos constituintes da formulação ou da concentração do fármaco.

1.3.1 Solubilidade

A solubilidade é um fator determinante para a biodisponibilidade de um fármaco. Para que ele seja absorvido, ele deve estar solubilizado no sítio de absorção, independente do mecanismo de absorção, seja por transporte passivo, mediado por carreador ou especializado (34).

A solubilidade aquosa de uma substância é dependente de suas características estruturais e está diretamente ligada à sua capacidade em formar ligações de hidrogênio com a água (35).

No entanto, é importante ressaltar que enquanto uma solubilidade alta contribui para a dissolução completa de alguns fármacos, estes mesmos compostos frequentemente exibem baixa permeabilidade devido à sua alta polaridade e sua baixa lipofilia (35).

De acordo com Lobenberg e Amidon (2000) (36), muitos fármacos são ionizáveis na faixa do pH fisiológico, o que interfere em sua solubilidade aquosa. Devido ao valor de pH, a solubilidade pode aumentar, ou o valor de pH desfavorável pode induzir a precipitação de um composto já dissolvido. *In vivo*, a complexidade é aumentada devido à variação do pH em relação ao tempo e posição no trato gastrointestinal, assim como a variação das concentrações de surfactante durante o trânsito gastrointestinal. Assim, prever a solubilidade *in vivo* mediante estes fatores torna-se muito difícil (36).

Substâncias ionizáveis tendem a exibir uma solubilidade aquosa muito maior do que aquelas não ionizáveis. Considerando que 95% das moléculas dos fármacos

constituem de ácidos ou bases fracas, o conhecimento do pH do meio e do pKa destas substâncias é fundamental para o estudo da sua solubilidade (37).

De acordo com Martinez e Amidon (2002) (35), para avaliar o efeito do pH na ionização dos fármacos, pode ser usada a equação de Henderson-Hasselback (35):

$$\text{Ácido fraco: \% não ionizado} = 100/[1 + \text{antilog}(\text{pH}-\text{pKa})]$$

$$\text{Base fraca: \% não ionizado} = 100/[1 + \text{antilog}(\text{pKa}-\text{pH})]$$

Bases fracas tendem a ter uma solubilização mais lenta em valores de pH mais altos, diferente dos ácidos fracos, que se solubilizam mais facilmente em valores de pH mais altos.

As Figuras 3 e 4 mostram a relação entre a porcentagem de fármacos ionizados *versus* não ionizados e pH e pKa de ácidos fracos e bases fracas.

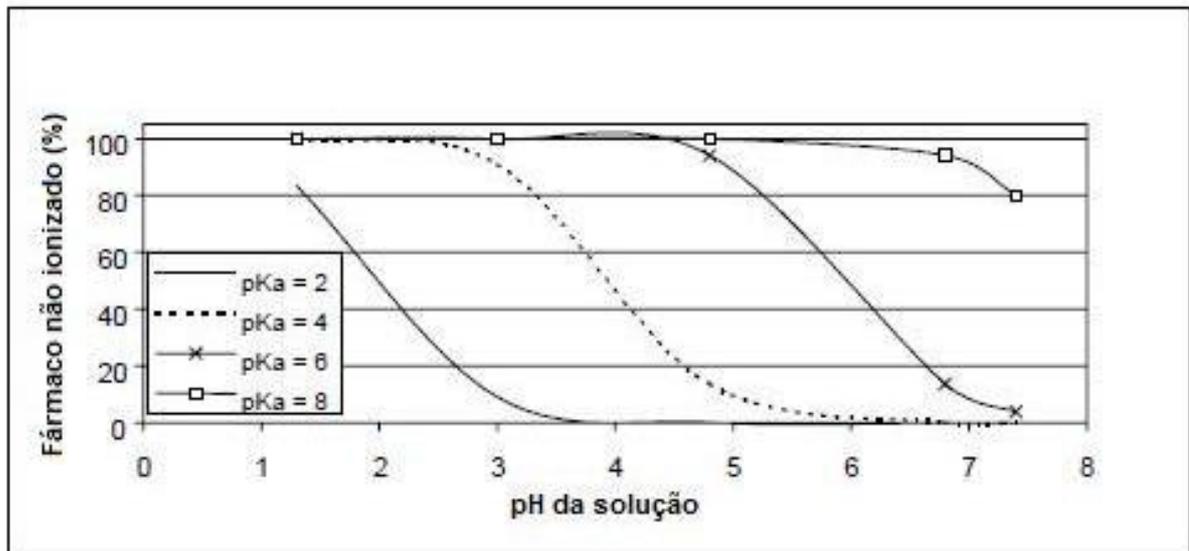


Figura 3 - Relação entre porcentagem de fármaco ionizado / não ionizado, e pH e pKa de ácidos fracos (adaptado de Martinez & Amidon, 2002)(35)

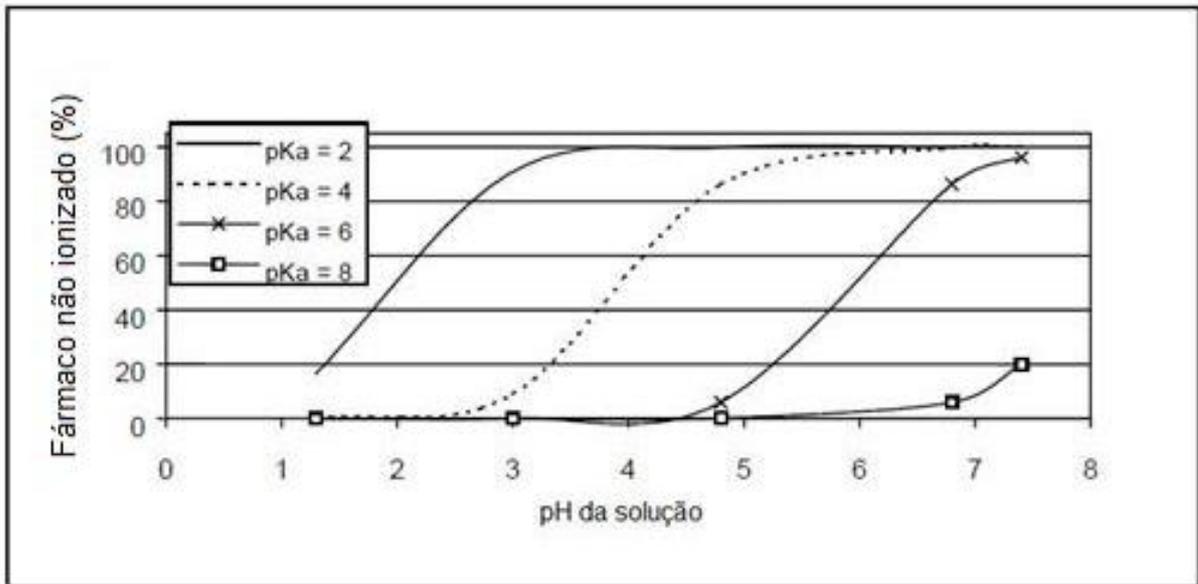


Figura 4 - Relação entre porcentagem de fármaco ionizado / não ionizado, e pH e pKa de bases fracas (adaptado de Martinez & Amidon, 2002)(35)

Conforme mostrado na Figura 3, com a elevação do pH da solução, aumenta a proporção de ácidos fracos em estado ionizado, o que contribui para aumentar a solubilidade. Analogamente, elevando-se o pH, eleva-se a proporção de bases fracas não ionizadas, contribuindo assim na redução da absorção. Assim, refeições que elevam o pH gástrico podem diminuir a solubilidade de bases fracas.

Experimentalmente, a solubilidade de uma substância pode ser determinada facilmente pelo método clássico do *Shake Flask* ou *Saturation Shake-Flask Method*. Este ensaio é realizado sob condição de equilíbrio da solução, requerendo longos tempos de repouso (12h – 7 dias). Para sua realização, o fármaco é adicionado a um balão volumétrico contendo solução tamponada até que ocorra a saturação da solução, indicado por um excesso insolúvel de fármaco. A solução em questão é então agitada até que um equilíbrio entre as duas fases seja alcançado. Após microfiltração e centrifugação, a concentração da substância em questão é determinada usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), geralmente com detecção em ultravioleta (UV). No caso de ser necessário determinar a solubilidade em diferentes valores de pH então devem ser conduzidos vários ensaios paralelos, cada um utilizando solvente em meio tamponado com o pH indicado (38).

1.3.2 Permeabilidade

Para que a absorção ocorra, o fármaco deve atravessar a membrana das células da parede intestinal. A permeabilidade do fármaco no sítio de absorção está intimamente ligada à estrutura molecular do fármaco em questão e com as propriedades das membranas celulares¹.

A membrana gastrointestinal é a principal barreira para absorção de fármacos administrados por via oral. Sua natureza é complexa, composta por lipídeos, proteínas lipoproteínas, polissacarídeos e apresenta uma estrutura de bicamada fosfolipídica².

Conforme apresentado por Lobenberg e Amidon (2000) (36), a Figura 5 mostra que as principais vias para absorção dos fármacos são transcelular (pelas células) e a paracelular (entre as células). O transporte transcelular ainda pode ser subdividido entre passivo, mediado por carreadores e endocitose.

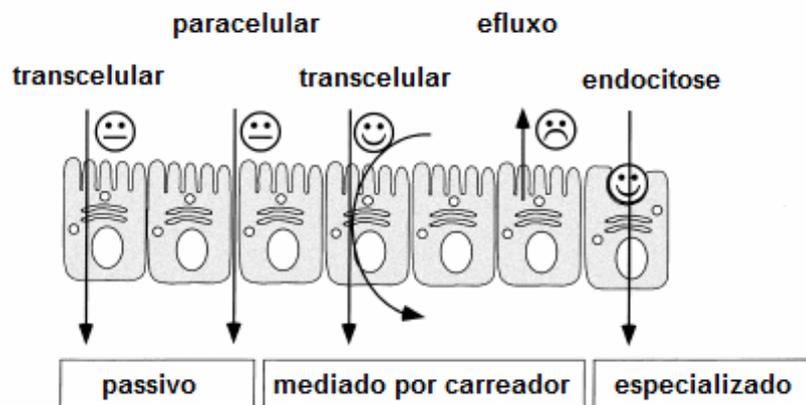


Figura 5 - Transporte pela membrana gastrointestinal (adaptado de Lobenberg & Amidon, 2000)(36)

Em geral, difusão passiva é o principal mecanismo para absorção de muitos compostos lipofílicos, enquanto transportes mediados por carreadores controlam a

¹ (Shargel *et al.*, 2005 apud Bonamici, 2009, p. 171)37. Bonamici D. Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisencões [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

² (Ashford, 2005 apud Bonamici, 2009, p. 171)37. Ibid.

absorção de substrato dos transportadores. Em alguns casos, junções paracelulares são a principal via de administração de muitos compostos hidrofílicos pequenos. Sob condições fisiológicas, várias vias de administração podem contribuir para a absorção de fármacos ao mesmo tempo e a rota mais rápida é preponderante na absorção deste composto específico (39).

A teoria do SCB define três números adimensionais, número de dose (Do), número de dissolução (Dn) e número de absorção (An), para caracterizar os fármacos. Estes números são combinações físico-químicas e fisiológicas e representam a visão mais fundamental da absorção de fármacos no trato gastrointestinal (36).

O número de absorção é a razão de permeabilidade (P_{eff}) e o diâmetro interno intestinal (R) vezes o tempo de residência (T_{si}) em um intestino pequeno, que pode ser descrito como a razão do tempo de residência e tempo de absorção (T_{abs}), conforme descrito na equação a seguir:

$$An = \frac{P_{\text{eff}}}{R} \times \langle T_{\text{si}} \rangle = \frac{\langle T_{\text{si}} \rangle}{\langle T_{\text{diss}} \rangle}$$

É o número de dissolução (Dn), que é a razão entre o tempo de residência e o tempo de dissolução (T_{diss}), que inclui solubilidade (C_s), difusividade (D), densidade (ρ) e o diâmetro da partícula inicial (r) de um composto e o tempo de trânsito intestinal (T_{si}).

$$Dn = \left(\frac{3D}{r^2} \right) \left(\frac{C_s}{\rho} \right) \langle T_{\text{si}} \rangle = \frac{\langle T_{\text{si}} \rangle}{T_{\text{diss}}}$$

E, finalmente o número de dose (Do) é definido como sendo a razão da concentração pela solubilidade do fármaco.

$$Do = \frac{M/V_0}{C_s}$$

Onde:

C_s = Solubilidade

M = Dose

V_0 = Volume de água administrado com a dose (geralmente sendo 250 mL)

A fração absorvida (F) segue uma função exponencial, e pode ser descrita pela equação a seguir:

$$F = 1 - e^{-2An}$$

Em relação à permeabilidade, seguindo o movimento de uma formulação através do trato gastrointestinal e aplicando a primeira lei de Fick, para absorção através da superfície da mucosa, obtém-se a seguinte equação:

$$J_w = P_w * C_w$$

Onde:

J_w = fluxo do fármaco (massa/área/tempo) transportado através da parede intestinal em qualquer posição e qualquer tempo;

P_w = permeabilidade relativa;

C_w = concentração do fármaco na membrana intestinal

Esta equação nos mostra que a solubilidade e a permeabilidade são as variáveis fundamentais para descrever o transporte de massas pela membrana. Com base nessa equação e em outros desdobramentos desta teoria, Amidon e colaboradores (1995) (32) afirmaram que:

Se dois produtos, contendo o mesmo fármaco, têm o mesmo perfil de concentração em função do tempo na superfície da membrana intestinal, então eles terão a mesma velocidade e extensão de absorção.

Isso implica que:

Se dois produtos têm o mesmo perfil de dissolução in vivo, sob todas as condições do lúmen intestinal, então eles terão a mesma velocidade e extensão de absorção do fármaco.

Para fazer essas afirmações deve ser assumido que não há qualquer outro componente na formulação que afete a permeabilidade da membrana e/ou a velocidade de trânsito intestinal. Caso isso ocorra, essas variáveis devem ser consideradas. Devido ao trânsito intestinal variável e ao conteúdo do lúmen no momento da administração do

medicamento, assim como diferenças populacionais (por exemplo, diferenças de estado gastrointestinais de indivíduos diferentes), variações na velocidade e na extensão de absorção são esperadas.

Um esquema da relação geral entre a permeabilidade (P_{eff}) e a fração de dose absorvida (F) é apresentada na Figura 6.

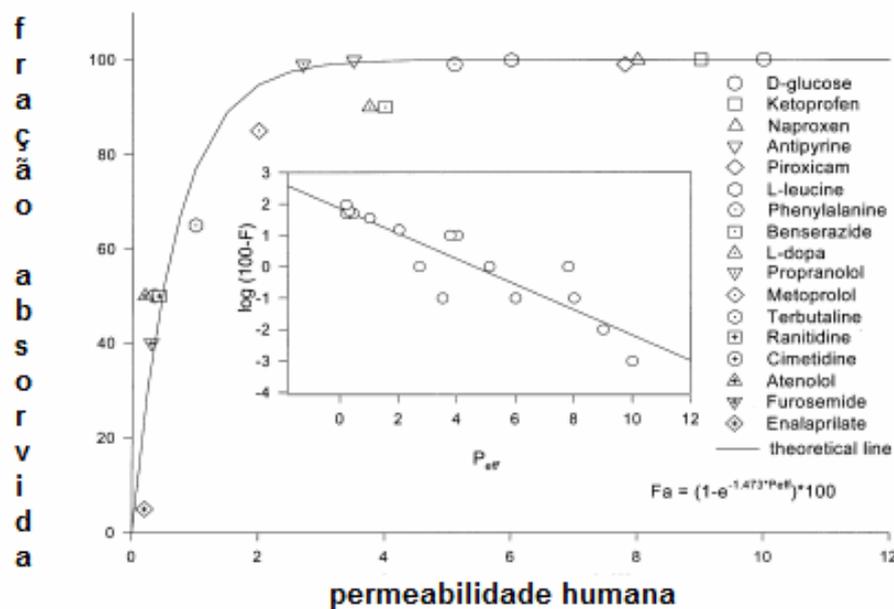


Figura 6 - Relação entre permeabilidade humana e fração de dose absorvida (adaptado de Lobenberg & Amidon, 2000) (36)

Uma informação importante que pode ser visualizada na Figura 6 é que se o valor de P_{eff} é abaixo de 2, a absorção do fármaco é incompleta (inferior a 100%). Se o valor for acima de 2, então uma absorção completa pode ser esperada (próximo a 100%).

As informações apresentadas anteriormente mostram como a solubilidade e a permeabilidade influenciam a absorção dos fármacos pelo trato gastrointestinal. Assim, de acordo com as características dos fármacos, Amidon e colaboradores (1995) (32) os dividiram em 4 classes pelo SCB, conforme apresentado na Tabela 3 a seguir:

Tabela 3 - Classificação dos fármacos pela SCB e o passo limitante da absorção

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Passo limitante da absorção
I	Alta	Alta	Tempo de esvaziamento gástrico ou dissolução <i>in vivo</i>
II	Baixa	Alta	Dissolução <i>in vivo</i>
III	Alta	Baixa	Permeabilidade
IV	Baixa	Baixa	Dissolução <i>in vivo</i> e permeabilidade

Classe I: Fármacos com alta solubilidade e alta permeabilidade. Este é o caso onde os fármacos são bem absorvidos (embora sua disponibilidade sistêmica possa ser baixa devido ao metabolismo de primeira passagem) e o passo limitante para a sua absorção é a dissolução do fármaco ou o esvaziamento gástrico, se a dissolução for muito rápida. Neste caso, o perfil de dissolução deve ser bem definido para garantir a biodisponibilidade. Para formas de liberação imediata que dissolvem muito rápido, a taxa de dissolução será controlada pelo esvaziamento gástrico e nenhuma correlação com a taxa de dissolução é esperada. Sugere-se que a especificação de dissolução *in vitro* para formas de liberação imediata seja dissolução de 85% em menos de 15 minutos, para garantir a bioequivalência.

Classe II: Fármacos com baixa solubilidade e alta permeabilidade. Este é o caso de fármacos cujo perfil de dissolução deve ser mais claramente definido e reprodutível. A dissolução *in vivo* é um fator controlador da absorção e normalmente é menor do que para fármacos da classe I. Uma vez que o conteúdo luminal e a membrana mudam ao longo do intestino, uma maior parte do intestino é exposto ao fármaco, a dissolução irá determinar a concentração ao longo do intestino por um período maior de tempo e a absorção irá ocorrer por um período maior de tempo. Assim o perfil de dissolução deve ser mais definido e reprodutível, contendo de 4 a 6 pontos de coleta tendo como especificação a dissolução em pelo menos 85% em vários valores de pH fisiológico.

As condições do meio também devem refletir condições fisiológicas e o uso de surfactantes deve ser considerado. Espera-se que fármacos nesta classe tenham uma absorção muito variada devido a diferentes formulações e variáveis *in vivo* que podem afetar o perfil de dissolução.

Classe III: Fármacos com alta solubilidade e baixa permeabilidade. Neste caso, a permeabilidade é quem controla a absorção do fármaco. O perfil de dissolução será bem definido e a simplificação das especificações para o perfil de dissolução, como para fármacos classe I, é aplicável para formulações de liberação imediata, onde a passagem do fármaco para o intestino é controlada pelo tempo de esvaziamento gástrico. A velocidade e a extensão de absorção podem ser altamente variáveis, mas se a dissolução for rápida, esta variação será devida ao trânsito gastrointestinal, conteúdo do lúmen e à permeabilidade da membrana, e não à formulação.

Classe IV: Fármacos com baixa permeabilidade e baixa solubilidade. Os fármacos desta classe apresentam problemas significativos para administração por via oral. O número de fármacos nesta classe irá depender dos limites utilizados para classificação da solubilidade e permeabilidade.

1.3.3 Permeabilidade e Absorção

A absorção de substâncias é afetada por fatores fisiológicos relacionados ao trato gastrointestinal, características físico-químicas do fármaco e influência da forma farmacêutica e seus excipientes(40). A absorção do fármaco no trato gastrointestinal é um parâmetro determinante em sua biodisponibilidade oral.

A absorção intestinal das substâncias após a administração oral é mediada pelo processo de difusão simples, que depende das propriedades físico-químicas das drogas, tais como hidrofobia, lipofilia, tamanho e estado de ionização (41, 42).

Além disto, o transporte de fármaco para o interior da membrana intestinal é complexo e dinâmico que inclui o transporte passivo, através de enterócitos (transcelular), das junções entre os enterócitos (transcelular), e os mecanismos ativos, vias transportadores (43).

Há inúmeros transportadores de fármaco que provocam a absorção e que são subdivididos em famílias, de acordo com suas características. Dentre as principais classes de transportadores descritos estão os transportadores de peptídeos (mediados

por H⁺), transportadores de cátions orgânicos e transportadores de ânions orgânicos (41).

Dentre os transportadores, podem ser destacados os chamados transportadores de efluxo, aqueles que transportam os fármacos da membrana intestinal para o lúmen, ou seja, trabalham em desfavor da absorção. Os principais representantes desta classe são as glicoproteínas-P (P-gp) que estão relacionadas à regulação do mecanismo de absorção de vários fármacos, como talatinol, digoxina e tacrolimus (41).

Dentre os fatores fisiológicos podem ser ressaltados o tempo de esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal das diversas formas farmacêuticas. O primeiro é mais lento em presença de alimento, sendo o segundo menos afetado pelas condições alimentares. A combinação entre os efeitos referentes ao maior tempo para ocorrer o esvaziamento gástrico e a potencial ligação entre os componentes alimentares e o fármaco pode diminuir sua absorção, principalmente para fármacos hidrossolúveis com alta biodisponibilidade. Fármacos pouco solúveis em água ou com solubilidade pH-dependente são também afetados pelas mudanças pós-prandial do trato gastrointestinal podendo ter diferenças significativas na sua biodisponibilidade. A área superficial de contato, a atividade enzimática, e a microflora presente também podem modificar a absorção de fármacos (40, 44).

A variação do pH é determinante para definir a absorção dos fármacos. O fluido gástrico é muito ácido, normalmente apresentando pH entre 1 e 3,5 em jejum. Após a ingestão de alimentos, o suco gástrico é tamponado para um meio menos ácido, sendo os valores usuais de pH observados após a ingestão de alimentos verificados na faixa de 3 a 7. Considerando que uma grande parte dos fármacos são constituídos de ácidos ou bases fracas, o pH influencia enormemente na solubilidade de muitos fármacos, determinando assim sua absorção (35).

1.3.4 Determinação da Absorção

A determinação da absorção dos fármacos é necessária para sua classificação no SCB. No entanto, além disto, entender os fatores que influenciam a absorção dos fármacos e, em particular, prever estes valores com bases em testes pré-clínicos permanece crucial para verificar a segurança e eficácia de substâncias que ainda serão comercializadas. Sendo assim, duas razões fundamentais para o desenvolvimento de modelos capazes de prever a absorção dos fármacos são (a) para obter estimativas razoáveis da absorção de fármacos sem, na medida do possível, a necessidade de utilização de seres humanos e (b) compreender melhor os limitantes do processo de absorção dessas substâncias para o desenvolvimento de novas estratégias de liberação dos fármacos (45).

Assim, a seguir estão apresentados os principais modelos utilizados para prever a absorção dos fármacos atualmente:

1.3.4.1 Modelos *in vivo*

1.3.4.1.1 *Biodisponibilidade absoluta*

Um método clássico para determinação da absorção é a determinação da biodisponibilidade absoluta (F) de um fármaco, sendo realizada através da comparação dos valores de concentração plasmática do fármaco após administração oral comparado com os valores obtidos após administração endovenosa.

Séchaud e colaboradores (2008)(46) determinaram a biodisponibilidade oral absoluta do fármaco deferasirox em sujeitos de pesquisas sadios, nas mesmas condições experimentais. Os sujeitos foram divididos em dois grupos, onde um dos grupos inicialmente foi submetido à administração do fármaco por via oral e o outro foi

submetido à administração por via endovenosa. Num segundo momento, os tratamentos foram invertidos até que, no final do experimento, todos os sujeitos foram submetidos a ambos os tratamentos (47).

Os resultados da curva concentração versus tempo para o exemplo descrito acima está apresentado a seguir:

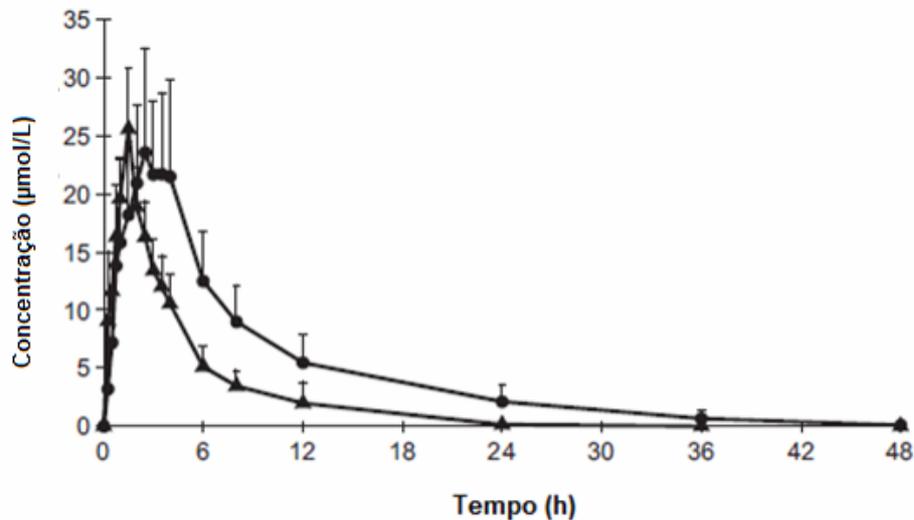


Figura 7 - Média das concentrações plasmáticas (mais desvios padrões) de deferasirox após administração de dose oral (▲) e endovenosa (●) (46)

Após a determinação das concentrações plasmáticas do fármaco em questão, foram determinadas as principais variáveis farmacocinéticas que permitem determinar o valor de F através da seguinte equação:

$$F = \frac{ASC_{0-\infty}(\text{Oral}) \times D_{IV}}{ASC_{0-\infty}(\text{IV}) \times D_{\text{Oral}}}$$

Onde:

$ASC_{0-\infty}(\text{Oral})$: Área sob a curva (concentração x tempo) para a administração oral

D_{IV} : Dose administrada por via endovenosa

$ASC_{0-\infty}(\text{IV})$: Área sob a curva (concentração x tempo) para a administração endovenosa

D_{Oral} : Dose administrada por via oral

No experimento conduzido por Séchaud e colaboradores (2008) (46) é possível observar que a dose administrada por via oral e endovenosa seja diferente, sendo que a correção pode ser feita nos cálculos do resultado final (47).

Esse método apresenta as vantagens de, por ser em humanos, conseguir mimetizar as reais condições de absorção dos fármacos. Além disto, é um método recomendável pela FDA e EMA para comprovação da alta permeabilidade de fármacos (48, 49).

No entanto, há necessidade de seres humanos para sua condução, o que pode representar problemas para a avaliação da absorção de moléculas novas (ainda não testadas em seres humanos) além de envolver considerações éticas e apresentar custo elevado quando comparado com os métodos *in vitro*. Além disto, não permite quantificar a permeabilidade do fármaco pelo epitélio intestinal, somente a absorção (43, 47, 50).

1.3.4.1.2 *Loc-I-gut*

Esta técnica é baseada na utilização de um dispositivo que é diretamente introduzido no jejuno do voluntário de pesquisa. A inserção se faz pela boca do sujeito de pesquisa, com a utilização de anestésico (lidocaína). Após a inserção, é verificado se o dispositivo está localizado na posição correta através de fluoroscopia. O dispositivo consiste em um tubo com múltiplos canais feito de cloreto de polivinila possuindo 5,3 mm de diâmetro externo. Este tubo possui 6 canais (corte seccional) com dois balões de 40 mm cada um acoplado às suas extremidades, a uma distância de 10 cm entre eles (comprimento do tubo). Cada balão está acoplado isoladamente a dois canais, um para administração da solução de infusão ou outro para aspiração do fluido intestinal. Os outros dois canais são para administração de substâncias marcadas ou drenagem. Acoplado na porção distal do dispositivo há um peso de tungstênio, para facilitar a passagem do tubo pelo jejuno. Os balões são inflados quando o dispositivo se encontra no lugar correto para que o espaço entre eles seja vedado. Utiliza-se também, durante

a realização do experimento, a substância $[^{14}\text{C}]\text{-PEG 4000}$ que possui alto peso molecular e não é absorvível, tendo a função de servir de marcador para verificar a vedação do sistema(51). A Figura 8 representa esquematicamente a inserção do dispositivo no tubo digestório humano.

A absorção do fármaco é calculada pela taxa de desaparecimento do fármaco no segmento que sofreu a perfusão, ou seja, pela quantidade absorvida. A coleta de sangue nos antebraços geralmente acontece simultaneamente para permitir medições para a determinação da permeabilidade absoluta (52).

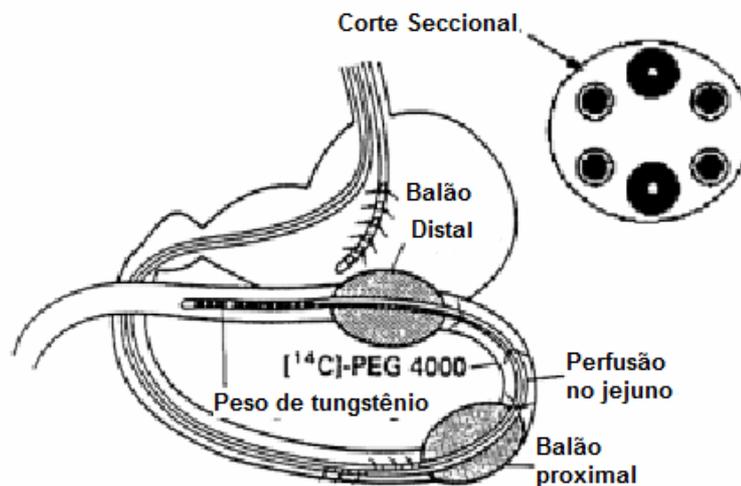


Figura 8 - Apresentação esquemática da técnica denominada Loc-I-Gut, permitindo perfusão intestinal seccional em humanos (adaptado de Petri et al., 2003)(51)

Apresenta a vantagem de, por ser um método com utilização de seres humanos, conseguir mimetizar as reais condições de absorção dos fármacos (é o método de perfusão intestinal considerado como padrão ouro devido à sua complexidade). Permite também a medição de permeabilidade, metabolismo e excreção (no caso de proteínas de efluxo) sem a influência de outros fatores gastrointestinais, como o tempo de trânsito e a diferença de pH entre as regiões do intestino (51).

No entanto, é considerado um método invasivo com a utilização de seres humanos para sua condução, o que envolve questões éticas. Também apresenta custo elevado (50, 51).

1.3.4.1.3 Balanço de Massas

Esta técnica leva em consideração que o intestino humano é cilíndrico e está em estado de equilíbrio para tentar prever a fração de dose absorvida. Um cilindro é utilizado como modelo de um pequeno intestino onde ocorrem, simultaneamente, absorção e fluxo de fármacos. A área do cilindro é tida como $2\pi rL$, onde r é o raio e L o comprimento do tubo, conforme apresentado na Figura 9. A quantidade de fármaco que entra no tubo é o produto da concentração que entra (C_{in}) vezes a velocidade do fluxo (Q); e a quantidade de fármaco que sai do tubo é o produto da concentração que sai do tubo (C_{out}) vezes o fluxo (Q). Assumindo que a massa perdida no tubo é devida à absorção e ao fluxo de saída do tubo, a massa absorvida por unidade de tempo é a diferença entre a quantidade de fármaco que entrou e que saiu do tubo (45).

Fármaco que entra – fármaco que sai = fármaco absorvido

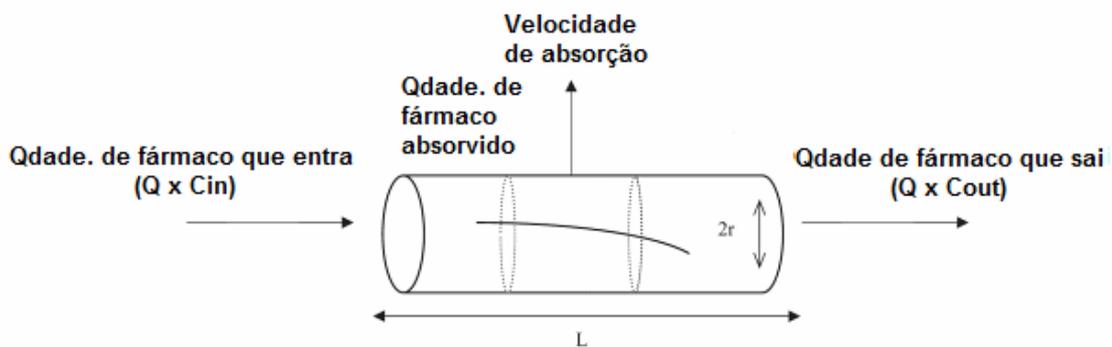


Figura 9 - Modelo de balanço de massa para perfusão intestinal no estado de equilíbrio (adaptado de Ehrardt & Kim, 2008) (52)

No entanto, a determinação da velocidade de absorção é dependente da dinâmica do fluxo no intestino. Há modelos matemáticos complexos que procuram determinar a velocidade de absorção, como por exemplo, o Well-Stirred Model e o Parallel tube model (52).

Na prática, a determinação da absorção pelo modelo de balanço de massas geralmente utiliza um marcador, como por exemplo, o ^{14}C , que faz parte da estrutura

do fármaco a ser administrado. A quantidade de fármaco absorvida é determinada pela relação entre a dose administrada e quantidade encontrada através da quantificação da radioatividade total encontrada nas fezes e urina. Neste caso, deve-se assegurar que todos os metabólitos encontrados na urina não são provenientes de nenhuma degradação do fármaco nos fluidos gástrico e intestinal (49, 53).

Xie e colaboradores (2009) (53) fizeram um estudo em ratos para avaliar a absorção, distribuição e eliminação de diidroartemisinina (DHA), um poderoso agente anti-malárico, pela técnica de balanço de massas. Foi administrado, por via endovenosa, DHA marcado com ^{14}C e posteriormente verificada a quantidade de DHA e de seus metabólitos em sangue total, plasma e outros tecidos, bem como as vias de eliminação, urina e fezes. Foi observado então que o fármaco é altamente distribuído pelos tecidos, inclusive nos tecidos encefálicos, e que a principal via de eliminação é a via urinária (53).

Para situações em que são usados animais para a condução deste ensaio, a verificação da distribuição do fármaco pelos tecidos é facilitada pela possibilidade da coleta desses tecidos para posterior quantificação da substância pesquisada. Entretanto, para estudos utilizando seres humanos, por razões fisiológicas e éticas, não é possível avaliar a total distribuição do fármaco pelos tecidos (50, 53).

No entanto, pelo fato deste método fornecer estimativas com alta variabilidade, pode ser necessária a utilização de um maior número de sujeitos de pesquisa para a obtenção de resultados confiáveis ou até mesmo a utilização de outras técnicas de determinação da extensão de absorção de fármacos (49).

Apresenta a vantagem de, por ser um método em humanos, conseguir mimetizar as reais condições de absorção dos fármacos (48, 49).

No entanto, para conseguir mimetizar as reais condições de absorção dos fármacos, é necessário que seja conduzido com humanos, o que pode envolver considerações éticas. Além disto, os resultados podem apresentar variabilidade considerável e não permite a quantificação da permeabilidade pelo epitélio intestinal, somente a quantificação da fração total absorvida dos compostos (49, 50).

1.3.4.2 Modelos *in vitro*

Os modelos de permeação *in vitro* existentes procuram estabelecer correlações estatisticamente aceitáveis entre o processo de absorção do fármaco e a sua liberação da forma farmacêutica determinada *in vitro* (54).

O sucesso desses modelos em prever a absorção dos fármacos na mucosa intestinal depende da capacidade de mimetizar as características do epitélio intestinal. Embora seja muito difícil obter um único modelo capaz de simular todas as condições existentes no intestino humano, muitos modelos *in vitro* têm sido usados rotineiramente para fornecer dados para pesquisas voltadas para a descoberta de novas moléculas (43).

Cada método *in vitro* possui vantagens e desvantagens específicas, entretanto, em geral, são menos trabalhosos e de menor custo se comparado aos métodos *in vivo*. Outra vantagem significativa é a grande relevância ética, pois minimiza testes em voluntários sadios (43, 50).

Por outro lado, fatores fisiológicos que podem afetar a absorção do fármaco como o tempo de esvaziamento gástrico, tempo de trânsito gastrointestinal, pH, entre outros, não podem ser incorporados durante a interpretação dos resultados obtidos (43).

A seguir serão descritos alguns dos principais modelos *in vitro* para a determinação da absorção de fármacos administrados por via oral:

1.3.4.2.1 Segmentos Intestinais:

Esta técnica procura determinar o fluxo de fármaco através de um segmento intestinal animal de tamanho apropriado, isolado e contido em equipamento adequado. A permeabilidade é calculada de acordo com o aparecimento do fármaco no lado seroso e no desaparecimento no lado mucoso. No entanto, a resistência elétrica da

membrana deve ser monitorada durante o experimento, indicando a viabilidade do modelo (43).

A determinação da permeabilidade (P) é calculada da seguinte forma:

$$P = (V / A \times C_0) (dC / dT)$$

Onde:

V= volume da câmara receptora;

A = área superficial da membrana;

C₀ = concentração inicial do fármaco na câmara doadora;

dC/dT = representa a mudança de concentração do fármaco no compartimento em função do tempo.

Este método permite avaliar a diferença na absorção de fármacos em várias regiões intestinais. Permite também avaliar a permeabilidade utilizando intestino humano ou tecido animal de diferentes espécies, efetuando as correções necessárias (50).

Entretanto, assim como outros métodos *in vitro*, apresenta como desvantagens a falta de circulação sanguínea e nervos, restrita viabilidade dos tecidos, além da dificuldade de preparação que pode lesionar os tecidos (50).

1.3.4.2.2 Modelos celulares

Modelos celulares constituem-se de monocamadas de células com o intuito de mimetizar o epitélio humano para serem utilizadas em experimentos para determinar a permeabilidade intestinal dos fármacos(43).

Esses modelos são uma rápida ferramenta de screening para realização de estudo de permeabilidade de compostos que apresentam potencial terapêutico, pois possibilitam prever sua absorção *in vivo* contribuindo para a triagem de moléculas previamente aos estudos pré-clínicos. Pode ser utilizado pela indústria farmacêutica na

descoberta de novos fármacos ou como sistema integrado a métodos de dissolução para prever a relação dissolução-absorção (43, 50).

Antes do início do experimento, as células são colocadas sobre um suporte de policarbonato permeável. A monocamada celular estará pronta após atingir o estado de confluência total e estar na forma diferenciada. Ainda assim, antes de iniciar o experimento, a integridade da membrana celular deve ser avaliada, seja através de sua resistência elétrica ou com a utilização de substâncias marcadoras de difusão celular, como o manitol e o polietilenoglicol, ambos impermeáveis através da membrana. Posteriormente, o fármaco cuja permeabilidade será avaliada, é adicionado utilizando-se soluções que procuram mimetizar as condições fisiológicas encontradas, mantendo o pH entre 5,5 e 7,4 (55).

Os experimentos podem ser realizados determinando-se a permeação do sentido apical para o basolateral, simulando a absorção do lúmen intestinal para a circulação sanguínea ou no sentido inverso, basolateral para o apical, simulando o efluxo do composto, da corrente sanguínea para o lúmen intestinal (55).

A determinação da permeabilidade (P) é calculada exatamente da mesma forma que a determinação da permeabilidade em segmentos intestinais, utilizando a seguinte fórmula:

$$P = (V / A \times C_0) (dC / dT)$$

Onde:

V= volume da câmara receptora;

A = área superficial da membrana;

C₀ = concentração inicial do fármaco na câmara doadora;

dC/dT = representa a mudança de concentração do fármaco no compartimento em função do tempo.

As células Caco-2 são oriundas de um adenocarcinoma de cólon humano e tornaram uma promissora ferramenta nos estudos de avaliação das funções das células intestinais por apresentarem capacidade de diferenciação espontânea em cultivo *in vitro*, expressando muitas características morfológicas e bioquímicas presentes no intestino delgado humano (55).

O modelo *in vitro* utilizando células Caco-2 deve ser empregado mais eficientemente na caracterização da permeabilidade de compostos absorvidos passivamente pela via transcelular, uma vez que expressam menor número de transportadores de membrana, como P-gp, PEPT1 e PEPT2, quando comparado às células epiteliais humanas (56).

Além disto, a existência de células Caco-2 mantidas em diferentes laboratórios, com diferentes origens clonais, e variações dos protocolos de cultivo levam a uma maior variabilidade entre os resultados dos ensaios para avaliação da permeabilidade de fármacos, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos (55).

Outras desvantagens a serem consideradas na utilização de células Caco-2 são a baixa permeabilidade de compostos hidrofílicos, os danos causados à membrana devido à presença de cossolventes, a aderência física do fármaco ao filtro de polycarbonato, o que causa uma diminuição da permeação e o elevado tempo de crescimento das células (43, 50).

As células MDCK são um modelo de células de rim canino também utilizadas para a condução de estudos de permeabilidade de fármacos. Quando comparadas às células Caco-2, apresentam junções intercelulares semelhantes, embora seu tempo de cultivo seja consideravelmente inferior. Entretanto, a expressão de transportadores é diferente quando comparado aos tecidos intestinais, o que faz com que haja diferença entre os resultados obtidos utilizando-se células Caco-2 e MDCK (50).

1.3.4.3 Modelo *in situ*

Experimentos *in situ* com o objetivo de estudar a absorção de fármacos são baseados na perfusão de solução contendo o fármaco no intestino em tampão fisiológico através de segmentos intestinais isolados. Para isto, são utilizados animais (geralmente ratos) em estados de jejum e anestesiados. O abdômen é então aberto para permitir a introdução de cânulas no jejuno para a introdução da solução contendo o fármaco. Deve-se também adicionar padrão de uma substância não absorvível para a

realização da medição de fluxo de água. A absorção é medida verificando-se a quantidade de fármaco que vai desaparecendo do lúmen intestinal, utilizando a seguinte fórmula:

$$P_{\text{eff}} = \left[-Q_{\text{in}} * \text{Ln} \left(\frac{C_o}{C_i} \right) \right] 2\pi RL$$

Onde:

P_{eff} : Permeabilidade efetiva

Q_{in} : velocidade do fluxo do tampão que contem o fármaco

C_o/C_i : Relação entre a concentração de saída do fármaco e a concentração inicial ou de entrada do fármaco

$2\pi RL$: Área de absorção disponível considerando um cilindro, sendo L o comprimento e R o raio.

Modelos *in situ* possuem a vantagem sobre modelos *in vitro* porque, embora o animal esteja anestesiado e cirurgicamente manipulado, os sistemas nervoso, endócrinos, linfático e o suprimento de sangue mesentérico continuam intactos, e, portanto, todos os mecanismos de transportes presentes em um animal vivo deverão estar funcionais. Assim, os resultados obtidos utilizando modelos *in situ* poderão se aproximar mais do valor real do que aqueles determinados por modelos *in vitro* (52).

Apesar das vantagens descritas acima, este método é considerado limitado porque a determinação da permeabilidade se dá pela quantidade do fármaco que desaparece da porção luminal do seguimento intestinal. Entretanto, a diminuição da concentração do fármaco na porção luminal pode não significar sua absorção para a circulação sistêmica, especialmente para aqueles compostos que sofrem metabolismo pré-sistêmico ou no lúmen. Outra desvantagem a ser considerada é que é necessário um grande número de animais para serem obtidos valores de permeabilidade estatisticamente significativos, o que torna o custo relevante (43).

Deve ser considerado ainda que a manipulação do intestino concomitantemente à administração de anestesia pode levar a alteração significativa no fluxo sanguíneo no intestino, o que pode afetar a velocidade de absorção do fármaco (57).

1.3.4.4 Modelo *in silico*

Em termos gerais, o termo *in silico* refere-se ao uso de computadores e *softwares* para a condução de estudos biológicos. Atualmente, a simulação de experimentos utilizando estruturas biológicas complexas é rotineiramente conduzida. Modelos computacionais constituem uma maneira rápida e barata de avaliar o potencial de permeabilidade intestinal de uma molécula antes de sua síntese e priorizá-las na realização de estudos *in vitro* e *in vivo*, significando uma diminuição do número de etapas necessárias para a síntese de determinados compostos (42, 43, 58).

Os métodos computacionais utilizados atualmente tentam prever a absorção dos fármacos levando em consideração somente o transporte passivo da substância, que é considerado um dos fatores mais importantes para se alcançar a biodisponibilidade oral (42). Para que isto seja realizado, algumas características do fármaco, tais como lipofilia, capacidade de formar ligações de hidrogênio, tamanho molecular e área polar da superfície da molécula, devem ser consideradas (42, 43).

A lipofilia é determinada experimentalmente pela medição em Log₁₀ do coeficiente de partição entre o octanol e a água (LogP). No entanto, há modelos computacionais capazes de determinar o LogP (42).

A relação entre o valor de LogP e a permeabilidade não é linear, com diminuição da permeabilidade em valores altos e baixos de LogP. Essa não linearidade é devida à: (a) limitada difusão de moléculas pouco lipofílicas pela membrana fosfolipídica e (b) partição preferencial de moléculas altamente lipofílicas para o interior da membrana fosfolipídica, dificultando assim sua passagem pela porção aquosa da membrana (42).

A maior parte dos *softwares* disponíveis para a determinação do LogP trabalha agrupando átomos em fragmentos ao qual se atribui um valor (*fragment values*). No entanto há também *softwares* que realizam este cálculo baseado no tamanho molecular e número de pontes de hidrogênio dos grupos funcionais das moléculas (59).

O valor de LogP, calculado pelo modelo computacional CLogP, define as porções de hidrocarboneto hidrofóbicas de qualquer estrutura de tal forma que os fragmentos restantes polares ficam claramente definidos e de tamanho conhecido (60).

Leo & Hoekman (2000) (60) demonstraram a proximidade do valor encontrado para LogP utilizando o *software* CLogP em relação aos valores determinados experimentalmente, para as substâncias óxido de piridina, óxido de quinolona, óxido de cinolina e dióxido de benzotriazina. A substância dióxido de benzotriazina teve sua posição 3 modificada com a adição dos grupos químicos H, NH₂ e NHAc. Os resultados encontrados estão dispostos na Tabela 4 (60).

Tabela 4 - Comparação entre os programas usados para determinar Log P (adaptado de Leo & Hoekman, 2000)(60)

Substância	Valor experimental	CLogP	Desvio
Óxido de piridina	- 1,20	- 1,23	+ 0,03
Óxido de quinolona	+ 0,36	+ 0,15	+ 0,21
Óxido de cinolina	+ 2,24	+ 2,20	+ 0,04
Dióxido de benzotriazina (3-H)	- 0,80	- 0,50	- 0,30
Dióxido de benzotriazina (3-NH ₂)	- 0,30	- 0,37	+ 0,07
Dióxido de benzotriazina (3-NHAc)	- 0,60	- 0,38	+ 0,22

Pode ser observado que os valores de LogP calculados pelo *software* CLogP se aproximam bastante dos valores obtidos experimentalmente, pois apresentam desvios pequenos.

Os métodos *in silico*, por serem modelos computacionais, apresentam baixo custo para estimar a permeabilidade dos compostos, além de fornecer resultados rápidos. No entanto, esses *softwares* fazem a previsão da permeabilidade intestinal apenas levando em consideração o coeficiente de partição do composto, ignorando assim, os transportes ativos que podem influenciar na permeabilidade de muitos fármacos (42).

1.3.4.5 Comparação dos Métodos

A Tabela 5 apresenta um resumo das principais vantagens e desvantagens dos métodos de determinação da permeabilidade discutidos anteriormente.

Tabela 5 - Principais vantagens e desvantagens de alguns métodos *in vivo*, *in vitro*, *in situ* e *in silico* utilizados para a determinação da permeabilidade de fármacos.

		Vantagens	Desvantagens
<i>In vivo</i>	Biodisponibilidade Absoluta	Consegue mimetizar as reais condições de absorção dos fármacos.	Utilização de seres humanos; Não permite quantificar a permeabilidade, somente a absorção; Custo elevado se comparado com métodos <i>in vitro</i> .
	Loc-I-gut	Consegue mimetizar as reais condições de absorção dos fármacos; Considerado método padrão ouro para estudos de permeabilidade; Obtenção dos valores de permeabilidade, metabolismo e excreção (no caso de efluxo) sem a influência de outros fatores intestinais.	Método invasivo com a utilização de seres humanos (implicações éticas); Custo elevado.
	Balanço de Massas	Consegue mimetizar as reais condições de absorção dos fármacos.	Utilização de seres humanos. Não permite quantificar a permeabilidade, somente a absorção; Alta variabilidade dos resultados.
<i>In vitro</i>	Segmentos Intestinais	Técnica ideal para estudar diferença de absorção em várias regiões intestinais; Permite tanto a utilização de tecidos humanos, quanto de animais, fazendo as correções necessárias.	Falta de sangue e nervos; Restrita viabilidade dos tecidos; Dificuldade na preparação do tecido, o que pode ocasionar danos.
	Modelos Celulares	Apresentam resultados rápidos; Ideal para prever a relação dissolução / absorção.	Menor número de transportadores de membrana; Variabilidade dos resultados entre diferentes laboratórios; Menor permeabilidade para compostos hidrofílicos; Uso de co-solventes; Aderência do fármaco ao filtro de polycarbonato; Tempo necessário para o crescimento celular.
<i>In situ</i>		Utilização de sistema vivo, onde todos os mecanismos de transporte presentes no animal deverão estar funcionais.	Não permite a distinção da quantidade de fármaco absorvido e de fármaco metabolizado no lúmen; Utilização de grande número de animais para obtenção de valores estatisticamente significativos, impactando no custo; Manipulação intestinal concomitante a anestesia pode alterar o fluxo sanguíneo influenciando na velocidade de absorção do fármaco.
<i>In silico</i>		Baixo custo Resultados rápidos	Considera apenas o coeficiente de partição do composto, ignorando o transporte ativo.

1.3.5 Como classificar os fármacos

Um fármaco será considerado altamente solúvel se sua maior dose administrada oralmente como uma formulação de liberação imediata (dose máxima por administração descrita em bula) solubilizar-se completamente em até 250 mL de cada uma das soluções tampão utilizadas dentro da faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. O método para determinação da solubilidade em equilíbrio (*shake-flask*) é amplamente aceito pelas agências reguladoras para determinação da solubilidade (48, 61).

Com exceção da FDA que considera que o pH mais alto a se comprovar a alta solubilidade do fármaco é 7.5, a *European Medicines Agency* (EMA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) consideram que ensaios de solubilidade até o pH 6.8 já são adequados para a comprovação da solubilidade dos fármacos (48, 49, 61).

Os critérios para determinação da permeabilidade também não possuem consenso entre as principais agências reguladoras do mundo. Para a FDA, um fármaco é considerado de alta permeabilidade quando um estudo conduzido em humanos demonstrando que a fração da dose absorvida apresenta resultado igual ou superior a 90%; ou quando 90% ou mais da dose do fármaco administrado oralmente é recuperado na urina (49).

Já para a EMA, um fármaco será considerado de alta permeabilidade quando a quantidade recuperada do fármaco inalterado em urina somado ao dos seus metabólitos for igual ou superior a 85% da dose administrada em um estudo de balanço de massas ou quando a quantidade do fármaco inalterado em urina e fezes é igual ou superior a 85% dose administrada (27, 48).

A FDA recomenda que, para a comprovação da permeabilidade das substâncias, sejam utilizados os estudos farmacocinéticos em humanos de balanço de massas e biodisponibilidade absoluta (49). Essa agência permite também que para a determinação da permeabilidade sejam utilizados modelos de perfusão intestinal em humanos; estudos de perfusão *in situ*, utilizando modelos animais; estudos de permeação *in vitro*, utilizando tecidos intestinais humanos ou animais; e, por último, estudos de permeação, utilizando monocamadas de células humanas ou animais. No

entanto, existe uma preocupação com relação aos estudos *in situ* e *in vitro* que utilizam modelos animais pela possibilidade de uma ausência ou uma menor expressão das proteínas relacionadas ao efluxo das substâncias quando comparadas ao intestino humano, o que poderia levar a uma classificação errada dos fármacos. Sendo assim, esses modelos são adequados somente para as substâncias cujo mecanismo de absorção é o transporte passivo (49).

Entretanto, para a EMA, apenas os ensaios de biodisponibilidade absoluta e de balanço de massas são aceitos para determinação da permeabilidade das substâncias para fins de isenção da apresentação do estudo de bioequivalência para registro de medicamentos, não permitindo assim a utilização de modelos *in situ* e *in vitro* (48).

A OMS, por sua vez, apresenta critérios para classificação dos fármacos semelhantes aos estabelecidos pela EMA (maior dose deve ser solúvel em 250 mL, pH 1 – 6,8, a 37°C e absorção $\geq 85\%$). No entanto, assim como a FDA, permite que os dados utilizados para determinação da permeabilidade provenham de ensaios de biodisponibilidade absoluta, balanço de massas, perfusão intestinal em humanos/animais, permeação *in vitro* e utilizando tecidos e monocamadas celulares (61).

No segundo semestre de 2010, a Anvisa lançou duas consultas públicas (CP n. 91 e CP n. 92, de 24 de agosto de 2010) acerca dos critérios que devem ser seguidos para que algumas formas farmacêuticas de liberação imediata para uso oral sejam isentas da apresentação do estudo de bioequivalência no momento do seu registro. Consequentemente, foram também divulgados os critérios adotados pela Anvisa para a classificação biofarmacêutica dos fármacos. Até o presente momento, as resoluções resultantes dessas consultas públicas ainda não foram publicadas (62, 63).

Para a determinação da solubilidade, a Anvisa considera que o pH mais alto no qual o fármaco deve se solubilizar é 6,8, indo ao encontro do estabelecido pela EMA e pela OMS. Ainda, um fármaco é considerado de alta permeabilidade quando sua absorção é superior a 85%, assim como EMA e OMS. No entanto, para a determinação da permeabilidade, os únicos modelos aceitos são a biodisponibilidade absoluta e o Balanço de Massas (62).

A Tabela 6 apresenta uma comparação entre os critérios da FDA, EMA, OMS e Anvisa para classificação SCB dos fármacos.

Tabela 6 - Comparação dos critérios estabelecidos pela FDA, OMS, EMA e Anvisa para estabelecer a classificação biofarmacêutica dos fármacos

	FDA	OMS	EMA	Anvisa
Alta solubilidade	Maior dose deve ser solúvel em 250 mL, pH 1 – 7.5, 37°.	Maior dose deve ser solúvel em 250 mL, pH 1 – 6.8, 37°.	Maior dose administrada deve ser solúvel em 250 mL, pH 1 – 6.8, 37°.	Maior dose administrada deve ser solúvel em 250 mL, pH 1 – 6.8, 37°.
Alta permeabilidade	Absorção ≥ 90%	Absorção ≥ 85%	Absorção ≥ 85%	Absorção ≥ 85%
Determinação da permeabilidade	Biodisponibilidade Absoluta, Balanço de Massas, Perfução Intestinal em Humanos / Animais, Permeação <i>in vitro</i> e utilizando tecidos e monocamadas celulares.	Biodisponibilidade Absoluta, Balanço de Massas, Perfução Intestinal em Humanos / Animais, Permeação <i>in vitro</i> e utilizando tecidos e monocamadas celulares.	Biodisponibilidade Absoluta e Balanço de Massas	Biodisponibilidade Absoluta e Balanço de Massas

Pelas dificuldades de classificação SCB das substâncias apresentadas e pelos diversos dados que possam surgir acerca da permeabilidade dos fármacos utilizando diferentes técnicas, a Federação Internacional de Farmácia (FIP) tem conduzido um grupo de trabalho com o objetivo de coletar informações disponíveis sobre os medicamentos considerados essenciais, para posteriormente classificá-los no SCB. As informações disponíveis são então revisadas, criticamente organizadas e publicadas na forma de monografia (64).

Essas monografias são, essencialmente, revisões de literatura, onde são discutidos dados como solubilidade, farmacocinética, permeabilidade, dissolução da

forma farmacêutica, uso e janela terapêutica do princípio ativo, interação com excipientes e problemas em se estabelecer a bioequivalência entre produtos (64).

Um exemplo de fármaco que esteve sob investigação é o levofloxacino, que, após a verificação do histórico dos ensaios de bioequivalência já conduzidos com esta substância, sua solubilidade, seu perfil de dissolução *in vitro*, dentre outras informações, permitiu-e concluir que a classificação para esta substância é SCB I (65).

1.4 CORRELAÇÃO *IN VITRO/IN VIVO*

Um importante aspecto do desenvolvimento de um produto é a determinação das características *in vitro* de uma potencial formulação que reflita seu desempenho *in vivo*. Embora uma forma farmacêutica de liberação imediata seja rotineiramente avaliada em relação à uniformidade de conteúdo, peso, dureza, friabilidade e desintegração, o ensaio que está mais diretamente ligado com o desempenho do produto *in vivo* é o teste de dissolução (66).

O ensaio de dissolução *in vitro* fornece informações nos vários estágios de desenvolvimento do produto permitindo a seleção dos excipientes mais adequados ao produto. Além disto, permite também, entre várias formulações testadas, selecionar aquela que apresenta perfil de dissolução mais adequado e mais reprodutível. Entretanto, caso o ensaio de dissolução não seja realizado sob condições apropriadas, a previsão do comportamento que o produto terá *in vivo* pode se dar de forma errada (66).

A correlação *in vitro/in vivo* é um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma característica *in vitro* da forma farmacêutica e uma resposta variável *in vivo*. Geralmente, a característica *in vitro* é a velocidade de dissolução do fármaco, ao passo que a resposta *in vivo* é a concentração plasmática do fármaco ou sua quantidade absorvida em função do tempo³.

³ Alvarez et al., 2002 *apud* Barros, 2010, p. 5167. Barros ACS. Aspectos científicos e regulatórios do ensaio de dissolução [Monografia]. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz; 2010.

A falta de uma relação entre os resultados do teste de dissolução e o comportamento *in vivo* pode levar a um controle inadequado dos parâmetros críticos de produção do medicamento e também confundiria a interpretação dos resultados do ensaio de dissolução. Portanto, as especificações para o ensaio de dissolução devem ser definidas de acordo com uma relação estabelecida entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, melhor alcançada por uma correlação *in vitro/in vivo* bem desenhada (68).

Sendo assim, os ensaios de dissolução *in vitro* constituem importante meio de caracterização da qualidade biofarmacêutica de uma forma farmacêutica sólida oral, possibilitando o controle de qualidade farmacêutico e o estabelecimento de correlações com os dados obtidos *in vivo*. O conhecimento e controle das variáveis que podem influenciar a liberação da substância ativa contribuem para a importância desse ensaio, tornando-o mais confiável (69).

Os ensaios de dissolução podem ser classificados em ensaios de dissolução de um único ponto; ensaio de dissolução de dois pontos e estudo de perfil de dissolução comparativo. Os perfis de dissolução, que são obtidos através da porcentagem dissolvida de fármaco em diferentes tempos de amostragem, permitem uma análise mais conclusiva (70).

Os ensaios de dissolução de um único ponto geralmente são empregados para formas farmacêuticas de liberação imediata, contendo fármaco altamente solúvel e que se dissolve rapidamente. A especificação de um único ponto é útil para testes de controle de qualidade e para avaliação da uniformidade lote a lote. Os ensaios de dissolução de dois pontos são, normalmente, utilizados para caracterizar a qualidade do medicamento e também como um teste de controle de qualidade de rotina para alguns medicamentos como, por exemplo, fármacos pouco solúveis em água (71).

O perfil de dissolução comparativo, que é definido como a porcentagem de fármaco dissolvida *versus* tempo, torna possível orientar o desenvolvimento e a otimização de formulações, acompanhar os processos de fabricação, reduzir o risco da ausência de bioequivalência entre os lotes, conseguir a aprovação de registro junto às agências competentes, pesquisar e detectar a influência de variáveis críticas do processo produtivo, definir o mecanismo e a cinética de liberação, bem como realizar correlações *in vitro/in vivo* e estudos comparativos entre formulações diferentes (72).

Regulatoriamente, o perfil de dissolução tem sido avaliado pelas agências através dos fatores f1 (fator de diferença) e f2 (fator de similaridade), os quais fazem a comparação direta da diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvida em uma unidade de tempo para os produtos teste e referência (30, 48, 49, 61).

Assim, o fator (f1) calcula a porcentagem de diferença entre os dois perfis avaliados a cada tempo de coleta e corresponde a uma medida do erro relativo entre os perfis. O fator (f2) corresponde a uma medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas em ambos os perfis (73).

Estes fatores são calculados através das seguintes fórmulas:

$$F_1 = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^n |R_f - T_t|}{\sum_{i=1}^n R_f} \right\} * 100$$

$$F_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \times \sum_{i=1}^n (R_f - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

Onde:

n = número de tempos de coleta;

R_f = valor de porcentagem dissolvida no tempo t, obtido com o medicamento de referência ou com a formulação original (antes da alteração);

T_t = valor de porcentagem dissolvida do produto teste ou da formulação alterada, no tempo t.

O ensaio de dissolução é influenciado por fatores da formulação e processo produtivo tais como dureza dos comprimidos, adição de desintegrantes, lubrificantes e tensoativos, utilização de revestimento e formação de complexos fármaco-excipiente e fatores do processo produtivo. Além disso, a dissolução é afetada pelas características físico-químicas da substância ativa, como por exemplo, polimorfismo, tamanho da partícula, higroscopia e solubilidade (74).

Para fármacos pouco solúveis, os surfactantes naturais (ácidos biliares, sais biliares e lecitina) podem contribuir tanto para a sua solubilização no organismo quanto

no processo de absorção deste fármaco. Devido ao maior custo dos tensoativos naturais ou endógenos, não é usual utilizá-los nos estudos de dissolução, podendo esses ser substituídos por tensoativos sintéticos, como o lauril sulfato de sódio e o polissorbato 80 (75).

A velocidade de dissolução de uma forma farmacêutica tem relação com as condições do ensaio de dissolução. No trato gastrointestinal, a espessura da camada de difusão da forma farmacêutica é afetada pelo nível de agitação a que cada partícula do fármaco é submetida. Por isto, o aumento da motilidade gástrica e/ou intestinal pode levar a um aumento na velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis, devido à redução na espessura da camada de difusão ao redor das partículas do fármaco (76).

Similarmente, a dissolução dos sólidos no ensaio *in vitro* varia com o tipo e velocidade de agitação utilizada. De modo geral, procura-se evitar um fluxo turbulento, a fim de favorecer a reprodutibilidade nos ensaios. Geralmente, condições suaves de agitação precisam ser mantidas durante o ensaio de dissolução a fim de permitir um poder discriminativo máximo e detectar produtos que possam vir a apresentar baixo desempenho *in vivo* (66).

1.4.1 A regulamentação do estudo de perfil de dissolução pela Anvisa

Em 03 de setembro de 2004, a Anvisa publicou a RE nº 310, de 01 de setembro de 2004 que determinou a publicação do "Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução" (77).

De acordo com essa normativa, os estudos de perfil de dissolução comparativo devem cumprir em sua totalidade com os requisitos farmacopéicos da monografia individual para a forma farmacêutica em estudo, inscrita na Farmacopéia Brasileira ou na de farmacopéias internacionais autorizadas pela legislação vigente [Farmacopéia Alemã, Americana, Argentina, Britânica, Européia, Francesa, Internacional (OMS), Japonesa, Mexicana e Portuguesa], complementando-as com os ensaios descritos em métodos gerais da Farmacopéia Brasileira vigente (78).

Ainda de acordo com a RE n. 310/2004, no caso da inexistência de método de dissolução farmacopéico, os perfis devem ser realizados em, pelo menos, três meios de dissolução diferentes, dentro da faixa de pH fisiológico. A apresentação dos perfis de dissolução em três meios poderá ser dispensada nos casos em que a empresa apresentar o dossiê de desenvolvimento analítico, comprovando que o método proposto para análise é o mais adequado para o produto. Esse procedimento também pode ser adotado nos casos em que o método de dissolução presente na(s) farmacopéia(s) não é adequado para o produto, desde que devidamente justificado (77).

Ainda de acordo com o guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução, o perfil de dissolução comparativo deve ser realizado entre o medicamento candidato a registro de genérico ou similar (medicamento teste) e o medicamento inovador comercializado no País (medicamento de referência), e avaliado por meio do cálculo dos fatores f_1 e f_2 , de acordo com as equações apresentadas anteriormente. Além disso, devem ser empregadas doze unidades de cada um dos medicamentos teste e de referência e, no mínimo, cinco pontos (tempos) de coleta (77).

Para permitir o uso de médias no cálculo de f_1 e f_2 , os coeficientes de variação dos primeiros pontos (15 minutos, por exemplo) não devem exceder 20%. Para os demais pontos, considera-se o máximo de 10%. E, ainda, no cálculo, deve ser incluído apenas um ponto acima de 85% de dissolução para ambos os produtos.

Atendendo a esses critérios, para que os perfis de dissolução sejam considerados semelhantes, o valor de f_1 deve estar compreendido entre 0 e 15 e o de f_2 entre 50 e 100.

A Figura 10 representa um exemplo de perfis de dissolução comparativos considerado semelhantes, conforme os critérios propostos pela RE nº. 310/2004, pois os resultados calculados para f_1 e f_2 satisfizeram os limites estabelecidos ($f_1 = 3,05$ e $f_2 = 73,88$).

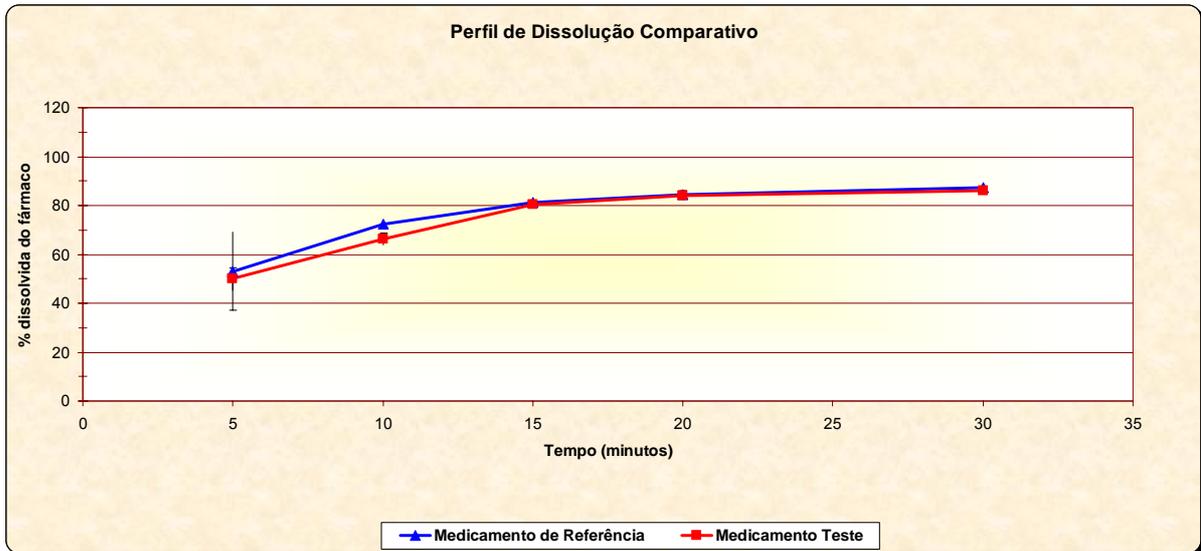


Figura 10 -Exemplo de perfil de dissolução comparativo considerado semelhante ($f_1 = 3,05$ e $f_2 = 73,88$)

No entanto, a Figura 11 representa um exemplo de perfis de dissolução comparativos considerados não-selhantes em virtude dos valores calculados para f_1 e f_2 estarem fora dos limites propostos pela RE nº. 310/2004 ($f_1 = 24,82$ e $f_2 = 30,16$).

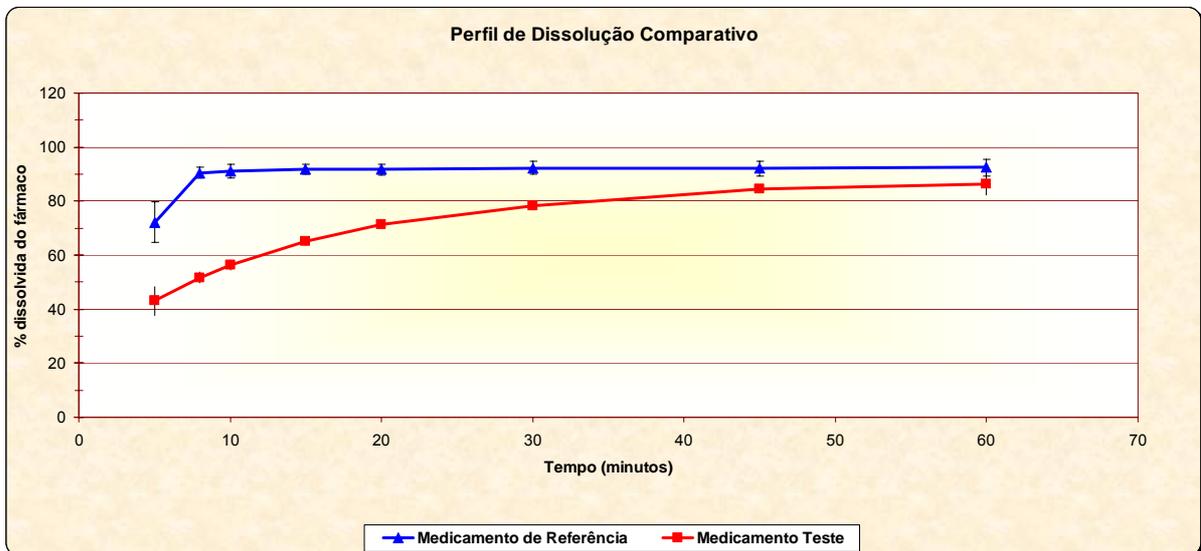


Figura 11 -Exemplo de curvas de perfis de dissolução comparativo não semelhantes ($f_1 = 24,82$ e $f_2 = 30,16$)

A RE nº. 310/2004 também dispõe que nos casos em que a dissolução é muito rápida, isto é, apresenta valor médio igual ou superior a 85% de fármaco dissolvido em 15 minutos para ambos os medicamentos teste e de referência, os fatores f1 e f2 perdem o seu poder discriminativo, não sendo então, necessário calculá-los. Nesses casos, a semelhança de perfis de dissolução é comprovada pela rápida dissolução dos produtos, devendo ser mostradas as curvas realizando coletas em, por exemplo: 5, 10, 15 e 20 ou 30 minutos (77).

A Figura 12 representa um exemplo onde o cálculo dos fatores f1 e f2 não foi efetuado e, mesmo assim, o perfil de dissolução apresentado foi considerado semelhante, em virtude da velocidade de dissolução ser considerada muito rápida.

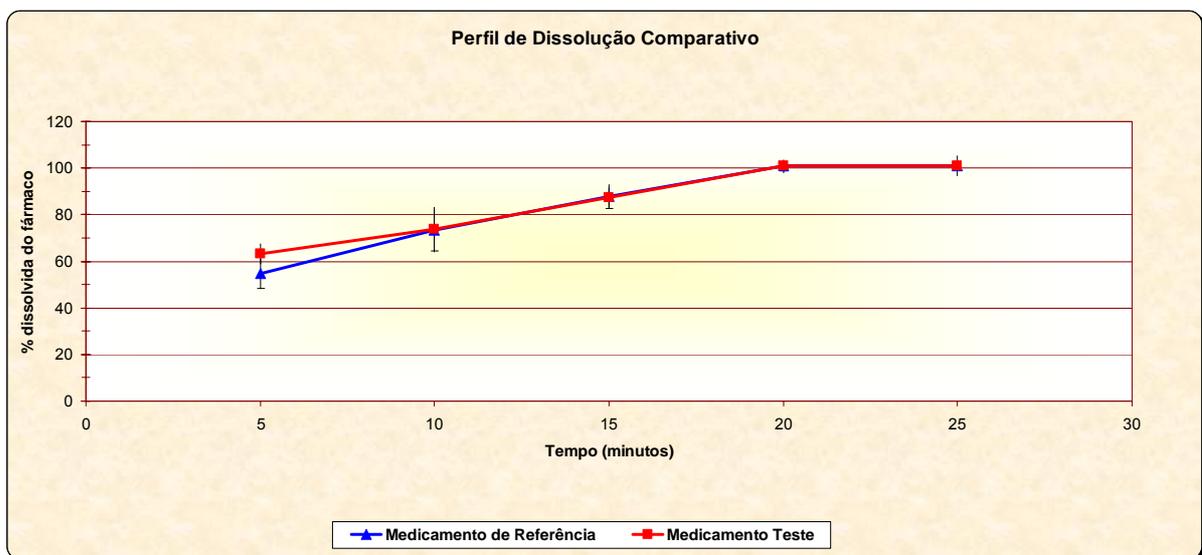


Figura 12 -Exemplo de perfil de dissolução comparativo considerado semelhante, pois ambos produtos, teste e referência, apresentaram dissolução muito rápida ($\geq 85\%$ em 15 minutos)

Em 11 de agosto de 2010, a Anvisa publicou a RDC nº 31/2010(30), que revogou, a partir de 12/10/2010, a RE nº 310/2004.

Assim como a RE nº. 310/2004, os estudos de perfil de dissolução comparativo sob a vigência da RDC nº. 31/2010 devem cumprir em sua totalidade com os requisitos farmacopéicos da monografia individual para a forma farmacêutica em estudo, inscrita na Farmacopéia Brasileira ou na de farmacopéias internacionais autorizadas pela

legislação vigente, complementando-as com os ensaios descritos em métodos gerais da Farmacopéia Brasileira vigente (30, 77, 78).

A RDC nº 31/2010 apresentou um avanço no tocante à condução do estudo de perfil de dissolução comparativo no caso da inexistência de método de dissolução farmacopéico. Ao invés da realização de perfis em três meios de dissolução diferentes, dentro da faixa de pH fisiológico, de acordo com a nova legislação é obrigatório o desenvolvimento e validação do método de dissolução, conforme preconizado em guias internacionais, que demonstre que o método é discriminativo. Esse relatório também pode ser adotado quando o método de dissolução descrito em farmacopeia não é adequado para o produto, desde que devidamente comprovado (30).

Esta normativa ainda especifica alguns itens mínimos que devem ser contemplados no relatório de desenvolvimento de dissolução:

a) avaliação quantitativa da solubilidade da substância ativa na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), considerando a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, conforme, por exemplo, o método de diagrama de fase para análise de solubilidade. A avaliação requer que quantidades crescentes da substância ativa sejam testadas em volume fixo de, pelo menos, três diferentes meios como, por exemplo, em pH 1,2; 4,5 e 6,8;

b) demonstração de que o meio de dissolução é o mais adequado à substância ativa na forma farmacêutica em estudo. A demonstração requer a investigação de curvas de dissolução na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), como, por exemplo, em pH 1,2; 4,5 e 6,8, considerando a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;

c) demonstração de que o aparato, a rotação e os filtros utilizados no procedimento de coleta de amostras são os mais adequados à substância ativa e à forma farmacêutica em estudo;

d) justificativa da necessidade da utilização de âncoras, quando aplicável;

e) comprovação da necessidade de uso de tensoativos, bem como da quantidade empregada, quando aplicável;

f) demonstração e justificativa da escolha do valor de Q (quantidade de substância ativa dissolvida expressa como porcentagem do valor rotulado da dose unitária); e

g) justificativa da necessidade da aplicação de método de deaeração, quando aplicável.

Ainda segundo a RDC nº. 31/2010, o perfil de dissolução comparativo deve ser realizado entre o medicamento teste e o medicamento de referência, e avaliado por meio do método modelo independente, empregando doze unidades de cada um dos medicamentos. No entanto, diferentemente da resolução anterior e aproximando-se dos guias internacionais, **somente o fator de similaridade (f2) deve ser calculado.**

1.4.2 Correlação *in vitro/in vivo* para bioisenção

Yu e colaboradores, em 2002, sugeriram que formulações contendo fármacos da classe 3 do SCB também fossem isentas da realização do estudos de bioequivalência já que, por possuírem alta solubilidade, sua absorção seria limitada apenas por sua permeabilidade. Caso sua dissolução seja rápida sob as condições fisiológicas, espera-se que esta formulação comporte-se como uma solução *in vivo*, que já são isentas da realização de estudo de bioequivalência (79).

Contudo, a cinética de absorção dos fármacos é influenciada por uma combinação de fatores fisiológicos e propriedades biofarmacêuticas tais como motilidade gastrointestinal, permeabilidade, metabolismo e interação entre o fármaco e os excipientes da formulação. Sendo assim, a formulação contendo fármaco pertencente à classe III do SCB e que pretende ser isenta da realização de estudo de bioequivalência deve, além de possuir uma dissolução muito rápida (dissolução > 85% em 15 minutos para medicamento teste e medicamento referência), possuir excipientes que podem afetar a biodisponibilidade quantitativamente e qualitativamente os mesmos do produto referência; e para os outros excipientes, devem ser qualitativamente os mesmos e quantitativamente serem muito similar ao produto referência. Este entendimento já foi contemplado pelos guias da OMS e da EMA (48, 61, 79).

Outra possível extensão da isenção da condução de estudo de bioequivalência sugerida por Yu e colaboradores envolve formulações contendo fármacos da classe II

do SCB. Segundo Yu e colaboradores (2002) (79), fármacos da classe II exibem baixa solubilidade e alta permeabilidade e, portanto, tem sua absorção limitada pelo processo de dissolução *in vivo*. Sendo assim, caso seja possível desenvolver um método de dissolução *in vitro* que mimetize exatamente as condições de dissolução *in vivo*, é possível estabelecer uma correlação *in vitro/in vivo* com segurança. Entretanto, devido aos numerosos processos *in vivo* envolvidos na dissolução de um fármaco, não é tarefa simples desenvolvê-lo.

O guia de bioisenção da OMS já prevê uma possível extensão da substituição da condução de estudos de bioequivalência para produtos contendo fármacos classe II por estudos *in vitro*. Neste caso, o produto candidato a genérico deve possuir dissolução rápida ($\geq 85\%$ em 30 minutos) no pH 6.8 e os perfis de dissolução comparativos devem exibir similaridade entre o medicamento referência e o candidato a bioisenção nos pH 1.2, 4.5 e 6.8.

Na tabela 7 estão descritas as condições necessárias para a condução dos ensaios *in vitro* para fins de isenção da realização de estudos de bioequivalência de acordo com os guias da FDA, OMS, EMA e Anvisa.

Tabela 7 - Descrição comparativa das condições necessárias para a condução dos ensaios *in vitro* para fins de isenção da realização de estudos de bioequivalência de acordo com os guias da FDA, OMS, EMA e Anvisa.

	FDA	OMS	EMA	Anvisa
Candidato à bioisenção	Classe I	Classe I, II* e III**	Classe I e III**	Classe I
Meios de dissolução	pH 1.2, 4.5 e 6.8	pH 1.2, 4.5 e 6.8	pH 1.2, 4.5 e 6.8 e pH de menor solubilidade do fármaco	pH 1.2, 4.5 e 6.8
Uso de surfactante	Não disponível	Não disponível	Vedado	Vedado
Volume de meio	900 mL	Não disponível	900 mL ou menos	900 mL
Aparato e agitação	Pá: 50 rpm Cesto: 100 rpm	Pá: 75 rpm Cesto: 100 rpm	Pá: 50 rpm Cesto: 100 rpm	Pá: 50 rpm Cesto: 100 rpm
Similaridade	f2 > 50 para	f2 > 50 para	f2 > 50 para	f2 > 50 para

dissolução rápida	dissolução rápida ou ambos produtos possuem dissolução muito rápida	dissolução rápida ou ambos produtos possuem dissolução muito rápida	dissolução rápida ou ambos produtos possuem dissolução muito rápida
-------------------	---	---	---

* Apresentando dissolução rápida ($\geq 85\%$ em 30 minutos), utilizando meio de dissolução pH 6.8, e apresentando similaridade para perfis de dissolução; e apresentando perfil de dissolução semelhante ($f_2 > 50$) para pH 1.2 e 4.5.

** Apresentando dissolução muito rápida ($\geq 85\%$ em 30 minutos) nos pH 1.2, 4.5 e 6,8.

1.5 EXCIPIENTES

A absorção de substâncias a partir do trato gastrointestinal é complexa e pode ser influenciada por diversas variáveis. De todos os fatores possíveis, a solubilidade do fármaco e a permeabilidade intestinal são os fatores reconhecidos como críticos para a determinação da velocidade e da extensão da absorção (32).

Como já mostrado anteriormente, o SCB tem como base a solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal para considerar formulações orais de liberação imediata como potenciais candidatas para serem isentas da realização do estudo de bioequivalência (49).

Por muitos anos os excipientes farmacêuticos foram considerados inertes e seu papel na biodisponibilidade do princípio ativo foi ligado simplesmente à sua função na formulação. Por exemplo, para fármacos considerados pouco solúveis, um aumento de solubilidade pode ser alcançado pela adição de agentes solubilizantes na formulação, tais como cossolventes (80, 81).

Muitos excipientes são considerados inertes, e assim, não afetam a biodisponibilidade das substâncias ativas das formulações. Entretanto, alguns excipientes são, de certa forma, ativos, havendo relatos de efeitos sobre a velocidade e a quantidade absorvida dos princípios ativos das formulações (82).

Um exemplo para os casos onde a adição de excipientes afeta a biodisponibilidade é a utilização de açúcares para dar o gosto adocicado às

formulações líquidas para administração oral (82). Foram encontrados na literatura dados descrevendo a influência desses açúcares e de outras substâncias no trânsito gastrointestinal bem como na biodisponibilidade dos fármacos (82-84).

Outro exemplo é a adição de pirofosfato de sódio para o desenvolvimento de comprimidos efervescentes de ranitidina, que diminui a absorção deste princípio ativo em cerca de 50% quando comparado com soluções que não contem pirofosfato de sódio (80).

Chen e colaboradores (2007) (82) desenvolveram um estudo de bioequivalência procurando avaliar a influência da presença de sorbitol e sacarose na formulação. Para esse estudo, utilizaram uma formulação de ranitidina 150 mg (solução oral) que continha 5 gramas de sacarose e uma formulação na qual a sacarose foi substituída por sorbitol. Cada formulação foi administrada em 20 voluntários saudáveis e em condição de jejum, onde cada voluntário foi submetido duas vezes a cada tratamento, de acordo com as sequências RTRT e TRTR. Após a administração das formulações em cada período, foram analisadas amostras de sangue obtidas nos tempos de coleta estipulados no protocolo do estudo, para quantificação do ranitidina em plasma. Em seguida, com a média das concentrações de ranitidina obtida dos sujeitos de pesquisa, foi construída uma curva (Figura 13) que relaciona a presença dos excipientes sob avaliação na biodisponibilidade da ranitidina.

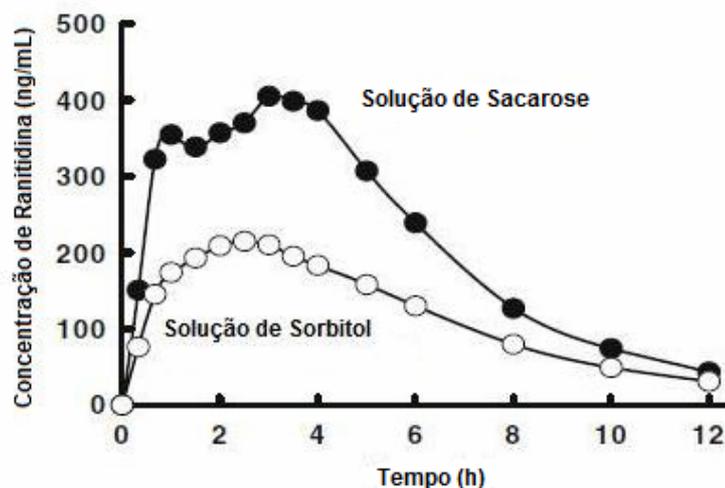


Figura 13 -Média das concentrações plasmáticas de ranitidina em 20 voluntários saudáveis após a administração solução contendo ranitidina com a adição de 5 gramas de sorbitol (círculo aberto) e de 5 gramas de sacarose (círculo fechado)(Adaptado de Chen *et al.*, 2007) (82)

De acordo com esses autores (82), o valor de C_{max} para a solução de ranitidina foi diminuído em cerca de 50% na presença de sorbitol, quando comparado à formulação contendo sacarose. Da mesma maneira, o valor de $ASC_{0-\infty}$ diminuiu aproximadamente 45% na solução contendo sorbitol em relação àquela contendo sacarose. Sendo assim, para ambos os parâmetros C_{max} e ASC , as soluções não seriam consideradas bioequivalentes, considerando o limite de 80-125% com 90% de confiança (22).

Ao mesmo tempo, Chen e colaboradores (2007)(82) também conduziram estudo similar comparando o fármaco metoprolol, como princípio ativo da formulação e os mesmos excipientes. Como resultado, foi verificado que a absorção do metoprolol em solução contendo sorbitol foi atrasada em cerca de 30 minutos, quando comparada com sua absorção na solução contendo sacarose. No mesmo sentido, houve também diminuição de 23% para o parâmetro C_{max} e 7% para ASC , estando fora dos parâmetros para a bioequivalência.

Em um segundo momento, Chen e colaboradores (2007) (82) avaliaram a influência de 4 diferentes concentrações de sorbitol (0 g, 1,25 g, 2.5 g e 5 g) em solução contendo ranitidina como princípio ativo. O resultado da concentração *versus* tempo está mostrado na Figura 14.

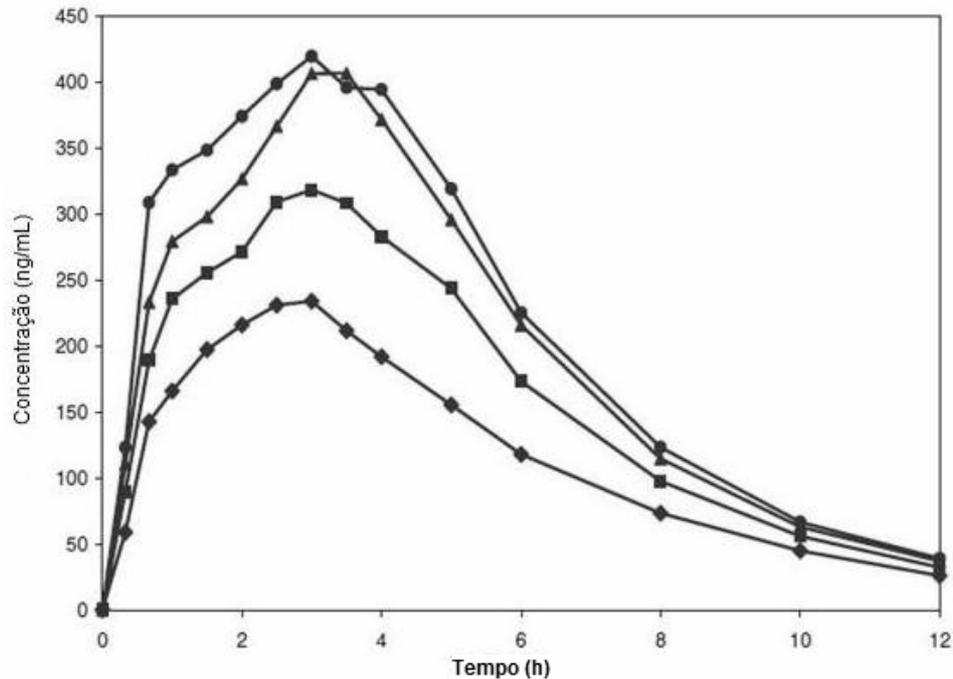


Figura 14 -Média das concentrações de ranitidina em 24 voluntários sadios após a administração de 150 mg de ranitidina em solução contendo a adição de 0 (●), 1,25 (▲), 2,5 (■) e 5 gramas (◆) de sorbitol (Adaptado de Chen et al., 2007)(82)

Foi observado que a diminuição da absorção do fármaco (C_{max} e ASC) é proporcional ao aumento da concentração de sorbitol na solução.

O sorbitol é uma substância também utilizada como um laxante osmótico e conhecidamente causa distúrbios, reduzindo o tempo de trânsito gastrointestinal, mesmo a baixas concentrações (85). Ainda, a diferença de biodisponibilidade da ranitidina entre as concentrações contendo sorbitol e sacarose pode ser parcialmente explicada pelo aumento do fluxo de líquido no trato gastrointestinal por conta da pressão osmótica do sorbitol. O sorbitol pode ainda levar a um aumento da motilidade gastrointestinal, reduzindo o tempo de contato da ranitidina com seu sítio de absorção. Outro mecanismo proposto é que o aumento do fluxo de líquido no trato gastrointestinal leva a um tempo insuficiente para a absorção de ranitidina na porção proximal do intestino, levando o fármaco para a porção distal, região onde sua absorção é menor (82).

Outra tentativa de avaliar o efeito de diferentes excipientes na absorção de fármacos é descrita por Schulze e colaboradores (2006) (80). Nesse experimento foi

medida a aceleração do trânsito intestinal após a ingestão de três agentes solubilizantes: Polietilenoglicol, VitE-TPGS[®] (succinato de D- α -tocoferilpolietilenoglicol 1000, surfactante não iônico solúvel em água) e Capmul MCM[®] (mistura de mono, di e triglicerídeos de ácidos graxos de cadeia média, preponderantemente ácido cáprico e caprílico). Essas substâncias foram radiomarcadas com tecnécio-99 m para permitir a obtenção de imagem demonstrando a velocidade do fluxo gastrointestinal. Para este estudo especificamente, embora tenham sido encontradas diferenças na velocidade de trânsito intestinal para os diferentes agentes solubilizadores quando comparadas com o controle, nenhum dos resultados foi estatisticamente significativo (80).

No entanto, os efeitos dos excipientes sobre a absorção de substâncias não foram investigadas somente em modelos *in vivo*. Rege e colaboradores (2001) (86) conduziram um estudo com a finalidade de investigar o efeito de nove diferentes excipientes [lactose, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), Tween 80[®], propilenoglicol, polietilenoglicol 400 (PEG 400), laurilsulfato de sódio, docusato sódico, EDTA sódico e essência de cereja anidra] sobre a permeabilidade de sete diferentes fármacos (atenolol, ranitidina, aciclovir, furosemida, cimetidina, hidroclorotiazida e manitol) em células Caco-2. Todos os sete fármacos são conhecidos por possuir baixa solubilidade(86). Além disto, esses fármacos diferem em suas propriedades físico-químicas, sendo atenolol, ranitidina, aciclovir e cimetidina substâncias básicas; furosemida e hidroclorotiazida ácidas e manitol neutro (86).

Nesse trabalho, Rege e colaboradores (2001) verificaram que, de uma maneira geral, a maioria dos excipientes não apresentou efeito sobre a permeabilidade dos fármacos. Com a exceção de lauril sulfato de sódio, nenhum outro excipiente afetou a integridade da monocamada de células Caco-2, o que causou um aumento moderado da permeabilidade de quase todos os fármacos. Tween 80[®] aumentou significativamente a permeabilidade na direção apical-basolateral de furosemida, cimetidina e hidroclorotiazida, presumidamente por inibir as proteínas de membrana responsáveis pelo efluxo. Da mesma maneira, docusanato sódico aumentou moderadamente a permeabilidade de cimetidina, provavelmente por inibir as proteínas responsáveis pelo efluxo da cimetidina (86).

Em outro trabalho realizado por Rege e colaboradores (2002)(87), foi investigada a atividade inibitória de três surfactantes não iônicos (Tween 80[®], Cremophor EL[®] e Vitamin E TPGS[®]) sobre transportadores de membrana (P-gp, transportadores de peptídeos do intestino humano e transportador de ácido monocarboxílico), utilizando células Caco-2 como monocamadas de células (87). Todos os três surfactantes inibiram a atividade da P-gp, entretanto, em diferentes magnitudes. Essa inibição pareceu estar relacionada com a modulação da fluidez da membrana celular. Entre os surfactantes, somente o Tween 80[®] inibiu os transportadores de peptídeos e somente o Cremophor EL[®] inibiu os transportadores de ácido monocarboxílico (87).

Os estudos apresentados acima descrevem como vários excipientes, antes considerados inertes, afetam a absorção dos fármacos no intestino humano, sugerindo ainda que, estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar *in vivo* as conseqüências das observações obtidas para os experimentos conduzidos com culturas celulares (86).

2 OBJETIVO GERAL

Verificar possíveis fatores que interferem nos resultados dos estudos de bioequivalência de medicamentos realizados no Brasil no período de 2002 a agosto de 2010.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a influência dos fatores ligados ao fármaco (sistema de classificação biofarmacêutica e variabilidade) para a conclusão dos estudos de bioequivalência,

Verificar a influência dos fatores ligados à formulação (excipientes e perfil de dissolução *in vitro*) para a conclusão dos estudos de bioequivalência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Foram selecionados estudos de bioequivalência realizados para o registro de medicamentos no Brasil, que tenham sido declarados como conduzidos através do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência, durante o período de 2002 a 2009.

Foram também selecionados estudos de bioequivalência concluídos no período de setembro de 2008 a agosto de 2010 (2 anos completos) realizados para o registro de medicamentos no Brasil, que tenham sido apresentados através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb).

3.2 MÉTODOS

Os estudos de bioequivalência provenientes do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência foram classificados de acordo com o SCB utilizando como base de dados para realizar a classificação o sistema *in silico* desenvolvido pela empresa Therapeutic System Research Laboratories (TSRL inc) (88). Os estudos, cujos fármacos não puderam ser classificados pelo TSRL inc, foram excluídos dos cálculos. Posteriormente, foram calculadas a porcentagem de estudos bioequivalentes por classe SCB e a distribuição dos resultados de bioequivalência/bioinequivalência de acordo com a classificação biofarmacêutica.

Os estudos de bioequivalência provenientes do Sineb foram classificados de acordo com o SCB, utilizando como base de dados para realizar a classificação o sistema *in silico* desenvolvido pela empresa Therapeutic System Research Laboratories (TSRL inc) (88). Os estudos, cujos fármacos não puderam ser classificados pela TSRL

inc, aqueles que não estavam concluídos ou que não se referem a formas farmacêuticas de administração oral, foram excluídos dos cálculos. Posteriormente, foram calculadas a porcentagem de estudos bioinequivalentes por classe SCB e a distribuição dos resultados de bioequivalência/bioinequivalência de acordo com a classificação biofarmacêutica.

Os estudos concluídos listados no Sineb cujos valores do coeficiente de variação intrassujeitos estavam disponíveis foram classificados de acordo com a variabilidade do fármaco (coeficiente de variação $< 30\%$ ou coeficiente de variação > 30), relacionando a conclusão do estudo de bioequivalência com a variabilidade do fármaco.

Utilizando a Tabela 2, o número de voluntários que finalizaram os estudos de bioequivalência foi definido como “Adequado” e “Não Adequado”, considerando a diferença entre os medicamentos teste (T) e referência (R) de 0% e 5%. Posteriormente a conclusão do estudo de bioequivalência foi relacionada com o número de voluntários que finalizaram os estudos.

Em seguida, os estudos concluídos listados no Sineb foram classificados de acordo com o perfil de dissolução apresentado (semelhante ou não semelhante). Para isto, aqueles perfis de dissolução proveniente de métodos não farmacopeicos, validados pela própria empresa, foram classificados como não semelhantes quando pelo menos um dos três perfis apresentados foi considerado não semelhante. Para métodos de dissolução farmacopeico, a avaliação se deu em cima do único perfil de dissolução apresentado.

Posteriormente, o perfil de dissolução apresentado foi relacionado ao Método de Dissolução utilizado (Método farmacopeico ou Método validado); e com o Uso de Tensoativos no meio de dissolução.

Na análise de todos os resultados, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado para verificar a associação entre os grupos pesquisados (89).

Para a realização da análise da distribuição da conclusão dos estudos de bioequivalência em relação ao SCB, foi utilizada também uma análise de correspondência para verificação da associação entre os grupos pesquisados (89).

Para esse trabalho foi obtida a autorização da Anvisa para uso dos banco de dados utilizados no estudo, bem como para a posterior divulgação dos resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram obtidos a partir da análise dos dados contidos nos bancos Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência e Sistema de Informações de Estudo de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb). Como cada banco de dados tem sua peculiaridade, a tabela 8 descreve as principais características desses bancos:

Tabela 8 - Principais vantagens e desvantagens do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência e do Sistema de Informações de Estudo de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb)

	Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência	Sistema de Informações de Estudo de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb)
Vantagens	<p>Mais representativa, pois ficou ativa durante o período de 2002 e 2009.</p> <p>Alimentada tanto por centro de bioequivalência situados no Brasil quanto por centros internacionais.</p>	<p>Envio de dados vinculados à realização do estudo de bioequivalência, o que elimina possibilidade de subalimentação do banco de dados.</p> <p>Apresenta outras informações relacionadas ao estudo de bioequivalência, como equivalência farmacêutica, perfil de dissolução comparativo, relatório clínico, analítico e estatístico.</p>
Desvantagens	<p>Envio de dados, apesar de ser obrigatório, não era vinculado à realização do estudo, o que apresenta possibilidade de subalimentação do banco de dados.</p> <p>Não apresenta algumas informações relacionadas ao estudo de bioequivalência, como equivalência farmacêutica, perfil de dissolução comparativo, relatório clínico, analítico e estatístico.</p>	<p>Menos representativa, pois teve seu início em set/2008.</p> <p>Alimentada somente por centros de bioequivalência situados no Brasil.</p>

Por conter menos informações, a utilização do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência permitiu realizar apenas a avaliação da distribuição dos resultados de bioequivalência e bioinequivalência de acordo com o SCB, a porcentagem de bioinequivalência por classe do SCB e a análise de correspondência das conclusões do estudo de bioequivalência em relação às classes do SCB.

Por outro lado, a partir do Sineb, foi possível realizar todas as análises descritas acima além de relacionar o coeficiente de variação do fármaco com a conclusão do estudo de bioequivalência, relacionar a adequação do número de voluntários que concluíram os estudos de bioequivalência e suas conclusões considerando uma diferença presumida de 0 e 5% entre o medicamento teste e o medicamento de referência, concluindo assim a avaliação dos interferentes ligados ao fármaco.

Quanto aos interferentes ligados à formulação, através do Sineb foi relacionado o perfil de dissolução apresentado, incluindo as variáveis: utilização de método farmacopeico ou validado e a utilização de tensoativo no meio de dissolução.

A seguir estão apresentados os resultados obtidos para avaliação dos interferentes ligados ao fármaco e à formulação.

4.1 QUANTO AOS INTERFERENTES LIGADOS AO FÁRMACO

4.1.1 Classificação Biofarmacêutica

Um total de 1247 estudos de bioequivalência foram apresentados à Anvisa no período de 2002 a 2009, via Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência. No entanto, 410 não foram classificados no SCB, pois os fármacos não constavam no banco de dados TSRL. Sendo assim, a análise da prevalência da conclusão dos estudos ocorreu levando em conta um total de 837 estudos de bioequivalência. Deste total, 611 apresentaram conclusão indicando bioequivalência e

226 indicando bioequivalência. Na Figura 15, estão os resultados obtidos para esta avaliação:

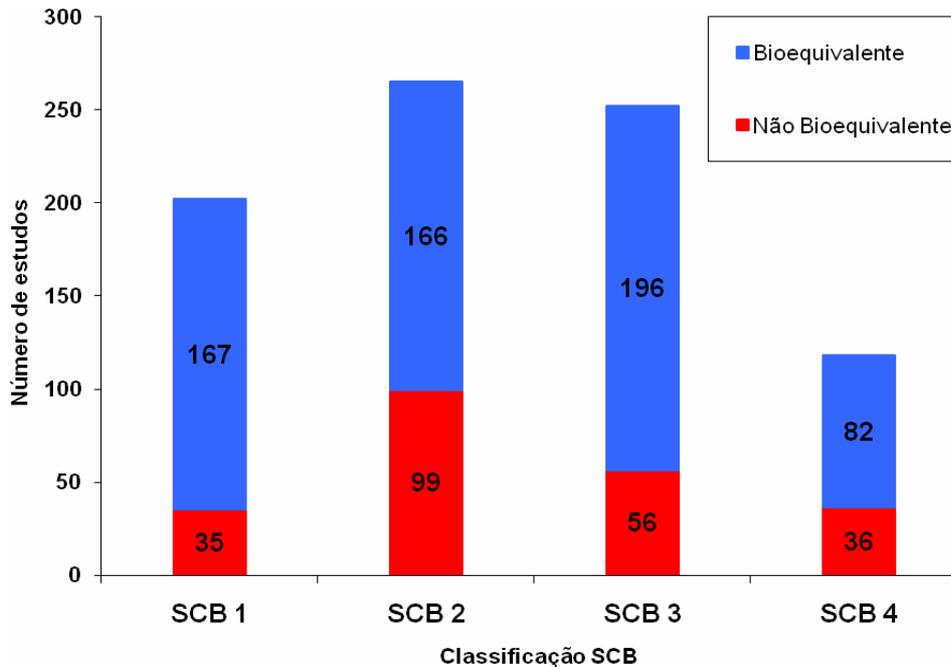


Figura 15 -Prevalência de estudos bioequivalentes e não bioequivalentes em relação à classificação biofarmacêutica (SCB) do princípio ativo (período 2002 a 2009). Dados obtidos através do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência (padrão)

Partindo dos dados dispostos na Figura 15, foi calculada a porcentagem de estudos de bioequivalência reprovados, de acordo com sua classificação biofarmacêutica. Os valores de porcentagem de reprovação estão apresentados na Figura 16.

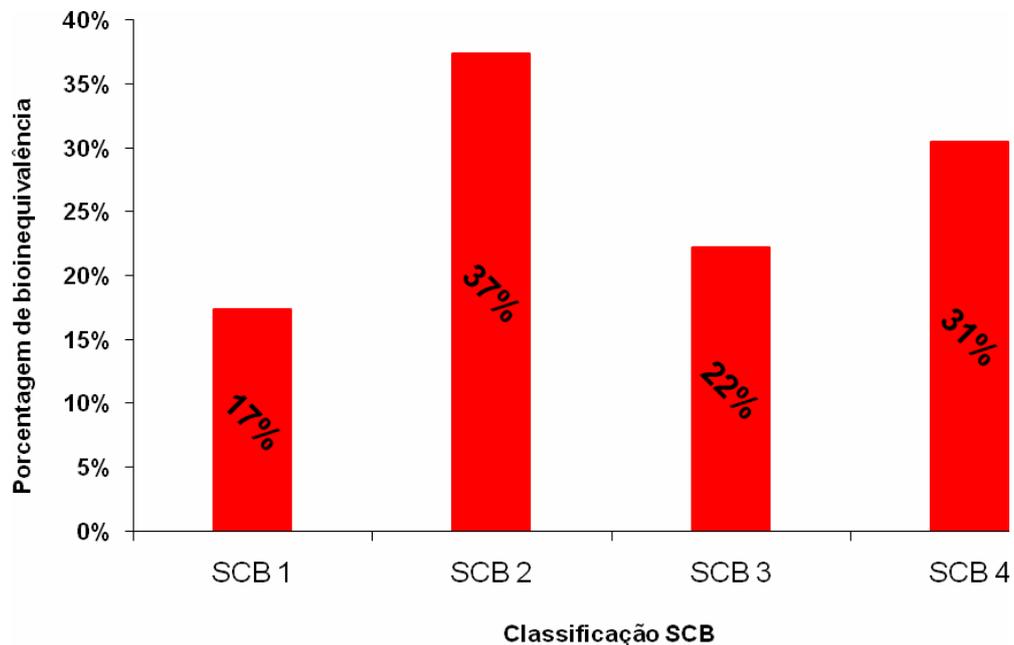


Figura 16 -Porcentagem de estudos não bioequivalentes de acordo com a classificação biofarmacêutica do princípio ativo (período: 2002-2009). Dados obtidos através do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência

Ao utilizar o teste estatístico de Qui-Quadrado para verificar se há associação entre a bioequivalência e a classificação biofarmacêutica dos fármacos, foi encontrado um p valor $< 0,05$ (p valor $< 0,01$), o que significa dizer que há associação entre as duas variáveis.

Como houve comprovação da associação entre as variáveis testadas anteriormente, em seguida foi conduzida uma análise de correspondência procurando relacionar as classes do SCB à conclusão dos estudos de bioequivalência, tendo-se chegado ao resultado mostrado na Figura 17:

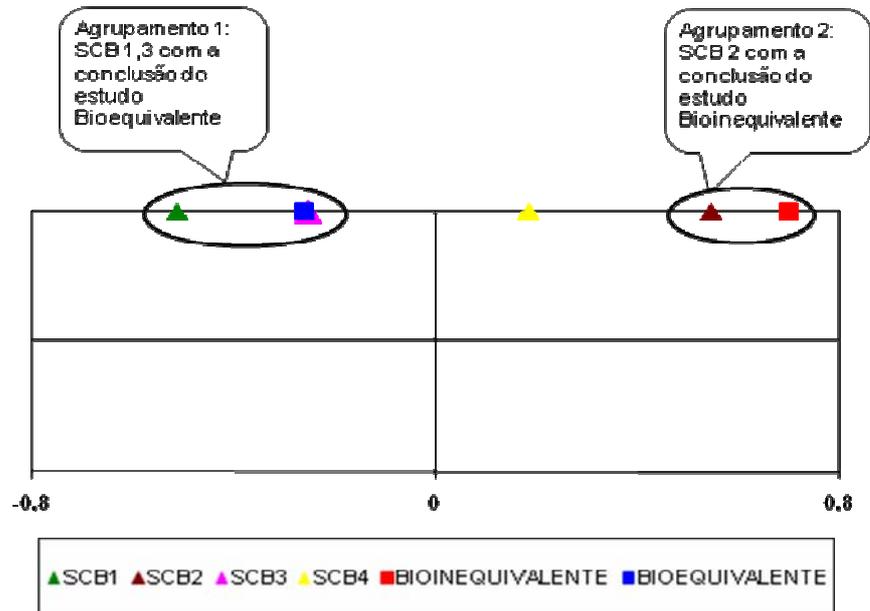


Figura 17 -Resultado da análise de correspondência para os estudos de bioequivalência obtidos no período 2002 a 2009. Dados obtidos através do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência

Analisando a Figura 17, é possível verificar que o agrupamento 1, referente aos estudos de bioequivalência contendo fármacos classificados como SCB I e SCB III, aproxima-se da conclusão que indica bioequivalência. No entanto, essa aproximação é maior nos estudos com fármacos SCB III. Por outro lado, no agrupamento 2, os estudos de bioequivalência para fármacos classificados como SCB II, aproximam-se da conclusão de bioinequivalência. Os estudos de bioequivalência cujos fármacos possuem classificação biofarmacêutica SCB IV visualmente não puderam ser enquadrados em qualquer agrupamento. Assim, é possível concluir, com base nas informações obtidas, que a classificação biofarmacêutica do fármaco presente nos medicamentos tem influência na conclusão dos estudos de bioequivalência.

Esperava-se inicialmente que os resultados para a análise de correspondência apresentassem, para as classes SCB I e SCB IV, resultados bastante próximos das conclusões que indicam bioequivalência e bioinequivalência, respectivamente. Esperava-se também que as classes SCB II e SCB III se estabelecessem em uma posição intermediária entre as duas conclusões para os estudos de bioequivalência.

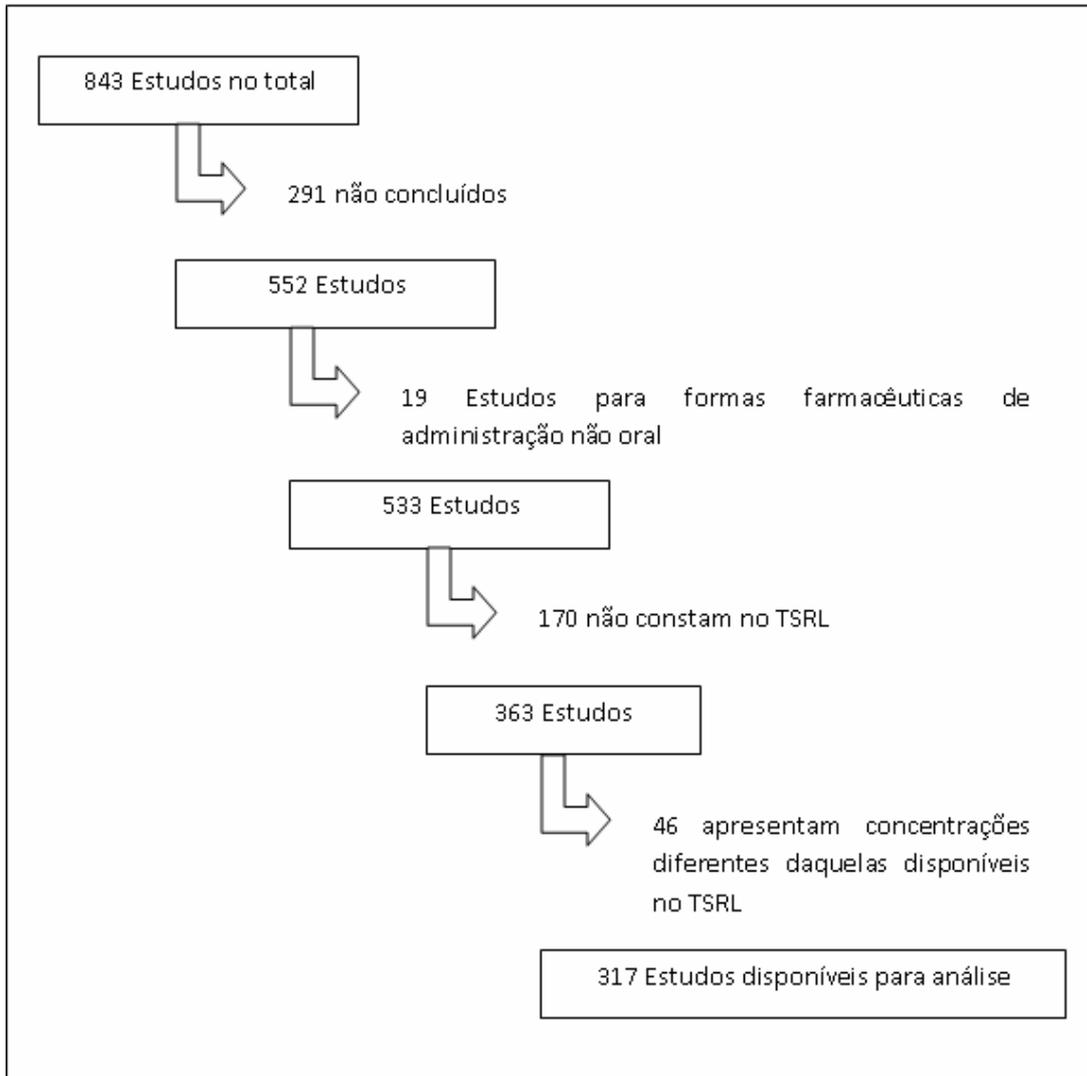
O motivo pelo qual a classe SCB IV não ficou agrupada com a conclusão que indica bioinequivalência pode ser explicado, possivelmente, pelo fato de que o número

de estudos cujos fármacos foram classificados como SCB IV foi muito inferior do que os demais (apenas 118, ou 14% do total). Embora fosse utilizada toda a população de estudos de bioequivalência contidas no banco de dados Sineb, o número de estudos de bioequivalência cujos fármacos pertencem à classe IV do SCB talvez não tenha sido suficiente para permitir a conclusão de sua afinidade por um dos agrupamentos.

Um total de 843 estudos de bioequivalência foi apresentado à Anvisa no período de set/2008 a ago/2010 via Sineb. Pelo fato do Sineb apresentar informações detalhadas a respeito do estudo de bioequivalência realizado, tais como forma farmacêutica, concentração, via de administração, número de voluntários participantes, dentre outras, os estudos foram incluídos na análise por meio do fluxograma descrito no Quadro 1.

Os estudos, cujas formas farmacêuticas não são de administração por via oral, foram excluídos dos cálculos, já que não são objeto de estudo do SCB. Além disto, os estudos cuja concentração do princípio ativo na forma farmacêutica diferia daquela descrita no TSRL também foram excluídos para evitar uma classificação errônea do fármaco.

Quadro 1 - Fluxograma de seleção de estudos submetidos à Anvisa via Sineb no período de setembro de 2008 a agosto de 2010, para análise de prevalência da conclusão em relação ao SCB



Considerando os 317 estudos de bioequivalência disponíveis conforme descrito no Quadro 1 (209 bioequivalentes e 108 bioinequivalentes), foi verificada a distribuição de suas conclusões em relação à classificação SCB. Os resultados encontrados estão descritos na Figura 18:

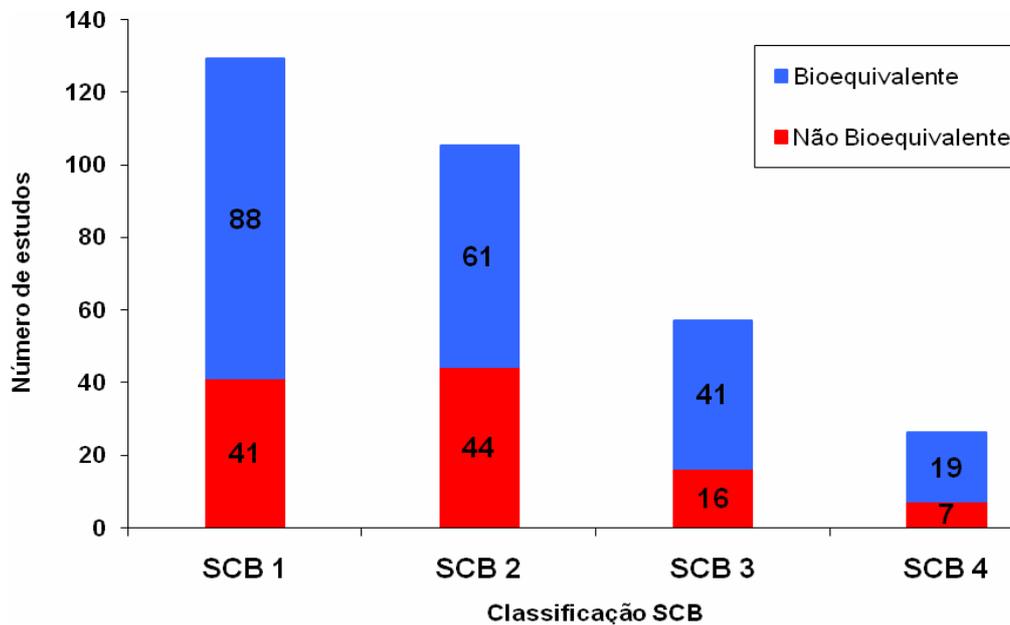


Figura 18 -Prevalência de estudos bioequivalentes e não bioequivalentes em relação à classificação biofarmacêutica do princípio ativo. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010

Partindo dos dados dispostos na Figura 18, foi calculada a porcentagem de estudos de bioequivalência reprovados, de acordo com sua classificação biofarmacêutica. Os valores de porcentagem de reprovação estão apresentados na Figura 19.

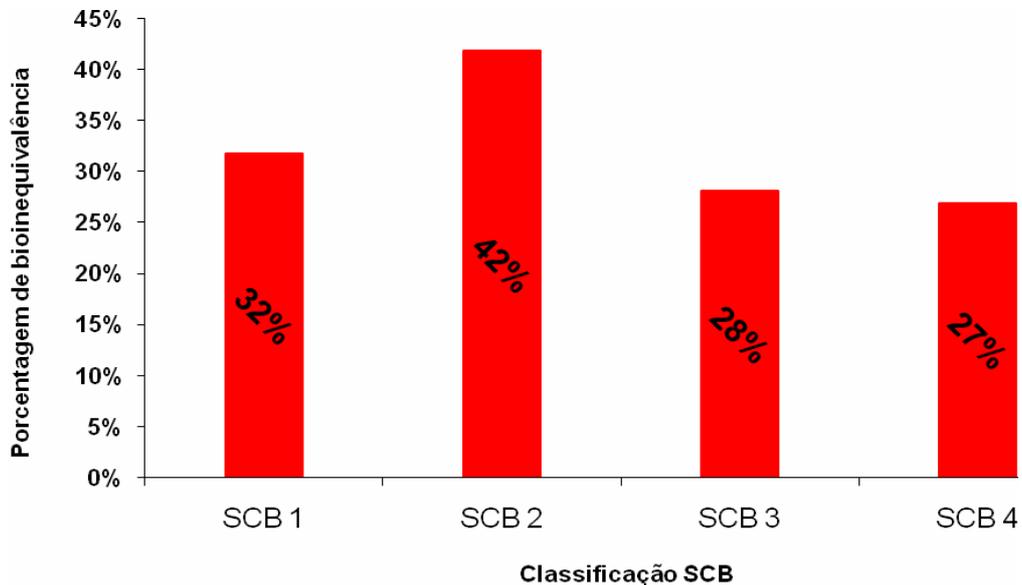


Figura 19 -Porcentagem de estudos não bioequivalentes de acordo com a classificação biofarmacêutica do princípio ativo. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.

Ao utilizar o teste estatístico de Qui-Quadrado para verificar a associação entre a bioinequivalência e a classificação biofarmacêutica dos fármacos, foi encontrado um p valor $> 0,05$ (p valor = 0,197), o que significa dizer que estatisticamente não há associação entre as duas variáveis. Possivelmente o valor p encontrado se deveu a um menor número de estudos disponíveis para a realização desta associação, quando comparados aos resultados provenientes do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência, já que um conjunto de dados menor contribui para a diminuição do poder do teste estatístico.

No entanto, mesmo com uma relação entre bioequivalência e o SCB não estabelecida para este caso, foi conduzida uma análise de correspondência procurando relacionar cada classe SCB à conclusão dos estudos de bioequivalência, tendo-se chegado ao resultado mostrado na Figura 20:

do que os demais (apenas 26, ou 8% do total), o que pode ter contribuído para uma relação falso-positiva com a conclusão bioequivalência.

Uma contribuição que os resultados encontrados podem fornecer é endossar os guias da EMA (48) e da OMS (61) no que diz respeito à bioisenção para fármacos pertencentes à classe III do SCB. Na avaliação dos dados provenientes do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência mostrou uma associação entre a classe III do SCB com a bioequivalência e na avaliação dos dados proveniente do Sineb, apesar de não haver esta associação demonstrada (p valor $> 0,05$), foi verificada esta afinidade pela análise de correspondência.

Por outro lado, destaca-se também a associação entre fármacos pertencentes à classe II do SCB e a bioinequivalência verificada tanto na análise dos dados provenientes do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência bem como na afinidade resultante da análise dados proveniente do Sineb, o que vai de encontro ao guia da OMS, que estabelece a possibilidade de bioisenção para essa classe.

Em um estudo realizado em 2010, Sousa calculou que o custo médio de um estudo de bioequivalência é de R\$ 154.793,00(90). Considerando que pelas normativas da Anvisa, EMA (48), FDA (49) e OMS (61) os fármacos da classe I do SCB são passíveis de serem isentos da apresentação do estudo de bioequivalência, com base em seus registros apenas no estudo de dissolução *in vitro*, e considerando também que dentre os 843 estudos descritos no Sineb entre concluídos e não concluídos 345 foram classificados como contendo fármacos da classe I do SCB, a bioisenção poderia ter resultado numa economia de até R\$ 54.035.585,00 para a indústria farmacêutica entre o período de setembro de 2008 a agosto de 2010.

Se considerarmos que os estudos provenientes do Relatório Mensal de Produtividade dos Centros de Bioequivalência classificados como contendo fármacos da classe I do SCB são 202, a bioisenção poderia ter resultado numa economia de até R\$ 31.268.186,00 para a indústria farmacêutica entre o período de 2002 a 2009.

Para esses casos afirmou-se que a economia seria até os valores descritos acima pelo fato de que, após os fármacos serem classificados como classe I do SCB,

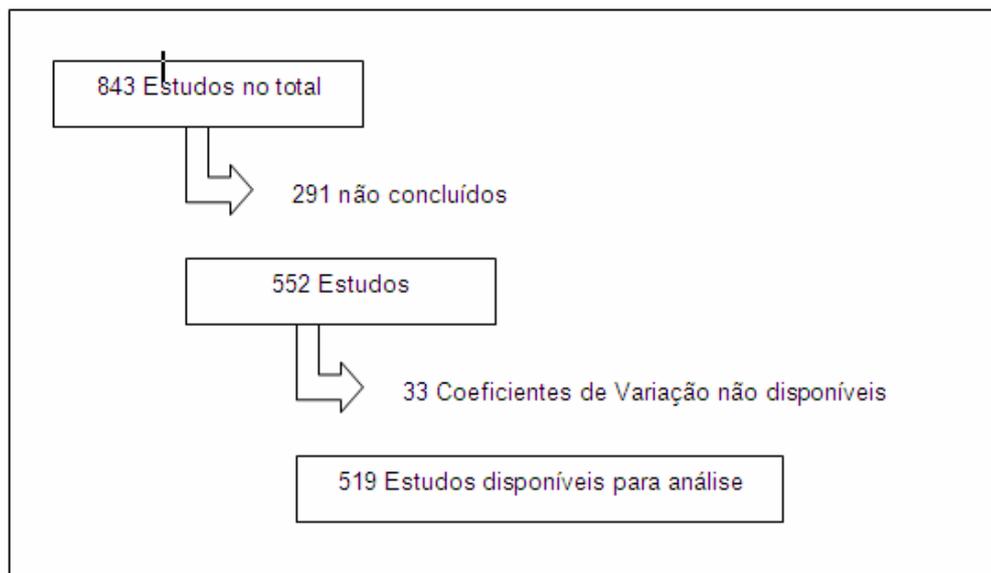
as formulações devem ainda serem testadas por ensaios *in vitro* e aprovadas de acordo com os critérios definidos na Tabela 7.

Entretanto, ressalta-se ainda que, conforme estipulado pela EMA (48) e OMS (61), que permitem a bioisenção para medicamentos contendo fármacos da classe 3 do SCB e classe II e III do SCB, respectivamente, a economia com a bioisenção poderia ser ainda maior.

4.1.2 Variabilidade

Do total de 843 estudos de bioequivalência apresentados à Anvisa no período de set/2008 a ago/2010 via Sineb, 291 não estavam concluídos. Além disso, 33 estudos não possuíam coeficiente de variação intrassujeito disponível no Sineb. Assim, a seleção dos estudos de bioequivalência para análise se deu conforme descrito no Quadro 2 apresentado a seguir:

Quadro 2 - Fluxograma de seleção de estudos submetidos à Anvisa via Sineb no período de setembro de 2008 a agosto de 2010, para análise da variabilidade.



Os estudos concluídos no Sineb foram classificados de acordo com a variabilidade do fármaco (coeficiente de variação < 30% ou coeficiente de variação > 30). Posteriormente foram relacionados o coeficiente de variação e a conclusão do estudo de bioequivalência calculando-se sua prevalência, conforme demonstrado na Figura 21:

Pode ser observado, por meio da Figura 21, que para os fármacos cujos CV foram inferiores a 30%, a taxa de reprovação foi de 26%, enquanto para fármacos que apresentaram CV maiores que 30%, a porcentagem de reprovação foi de 58%.

Apesar do aumento de 2,23 vezes na porcentagem de estudos reprovados para CV superiores a 30%, quando comparados àqueles inferiores a 30%, foi realizado o teste de estatístico Qui-Quadrado para verificar a associação entre o CV e a conclusão do estudo de bioequivalência.

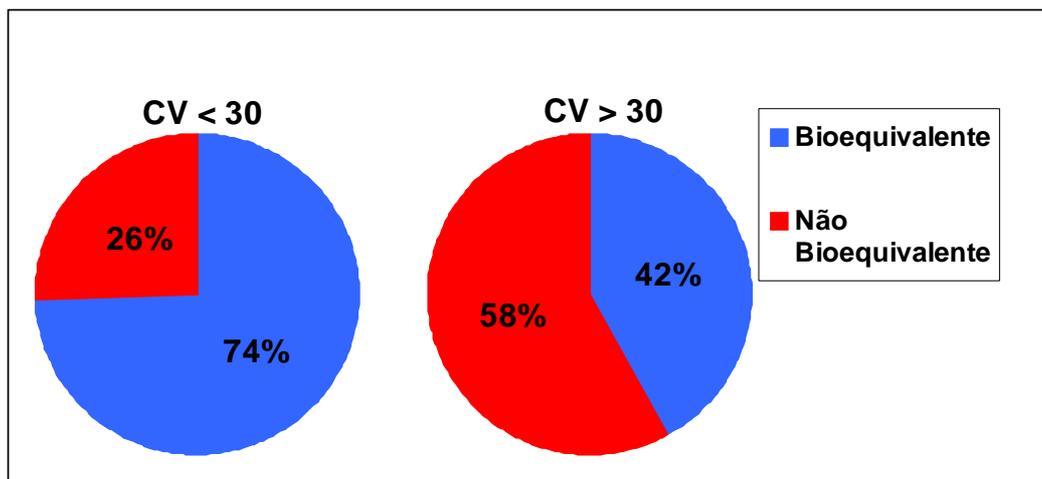


Figura 21 - Prevalência de estudos bioequivalentes e não bioequivalentes obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010, cujos princípios ativos apresentam coeficiente de variação < 30 e coeficiente de variação > 30%

Como foi obtido um valor p inferior a 0,05 (p valor < 0,01), é possível concluir que essa associação existe, ou seja, que o aumento do CV tende a conduzir os estudos realizados à bioinequivalência.

Sendo assim, pode ser considerado que a variabilidade é um dos fatores ligados ao fármaco que influencia na conclusão dos estudos de bioequivalência.

Posteriormente, foi verificado se o número de voluntários utilizados em cada estudo de bioequivalência estava adequado ou não ao estabelecido por Chow & Liu (2008)(29).

Conforme já mostrado na Tabela 2, para a realização do cálculo do número de voluntários utilizado nos estudos de bioequivalência, pode-se considerar uma diferença entre 0 e, no máximo, 5% entre os medicamentos teste e referência. Sendo assim, inicialmente foi realizada a avaliação considerando que uma diferença de 0% entre o teor de princípio ativo nos medicamentos teste e referência e posteriormente considerando esta diferença como sendo de 5%.

O resultado considerando uma diferença presumida de 0% entre T e R está demonstrado na Figura 22:

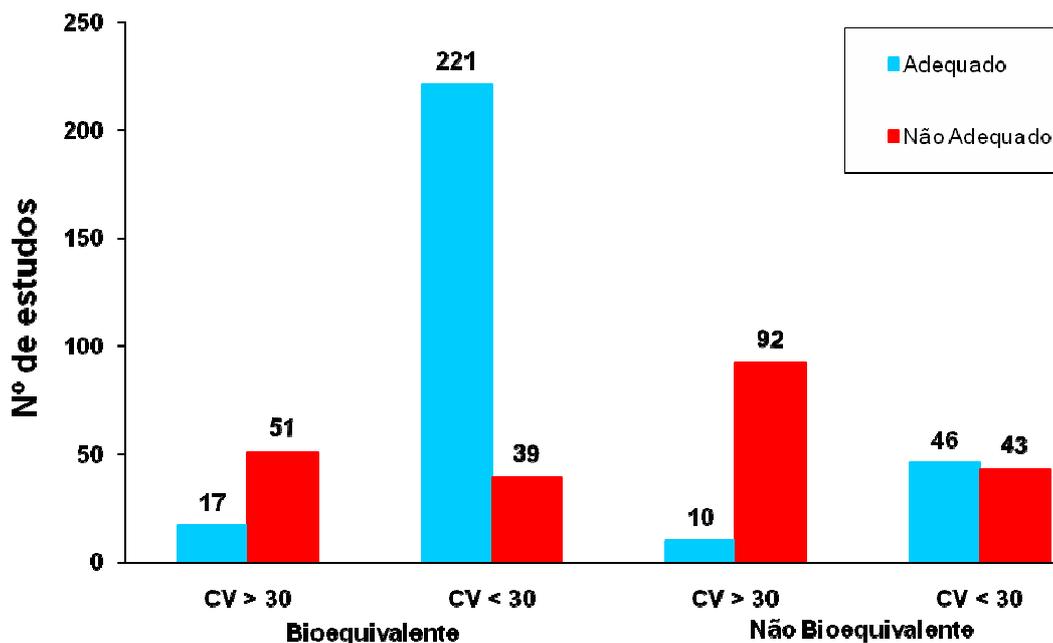


Figura 22 -Gráfico relacionando o número de estudos de bioequivalência conduzidos em relação ao CV do fármaco apresentado, a adequação do número de voluntários(29) incluídos no estudo e à conclusão do estudo, considerando uma diferença presumida entre T e R de 0%. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.

Avaliando a figura acima, é possível observar que os estudos de bioequivalência cujo número de voluntários foi considerado adequado ou não adequado para uma

diferença presumida de 0% entre o medicamento teste e referência foi relacionado com a conclusão do estudo conforme descrito na tabela 9:

Tabela 9 - Relação entre número de estudos de bioequivalência concluídos e sua adequação ao número de voluntários que concluíram o estudo, considerando uma diferença entre o medicamento teste e referência de 0%. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.

	Bioequivalente	Bioinequivalente
Adequado	238	56
Não adequado	90	135

Foi realizado o teste de estatístico Qui-Quadrado para verificar a associação entre a conclusão do estudo de bioequivalência e a sua adequação em relação ao número de voluntários utilizados.

Como foi obtido um valor p inferior a 0,05 (p valor < 0,01), é possível concluir que essa associação existe, ou seja, que a não adequação do número de voluntários em relação ao CV tende a conduzir os estudos realizados à bioinequivalência.

Posteriormente, foi verificado se o número de voluntários utilizados em cada estudo de bioequivalência foi adequado, agora considerando uma diferença presumida de 5 % entre T e R, conforme demonstrado na Figura 23 apresentada a seguir:

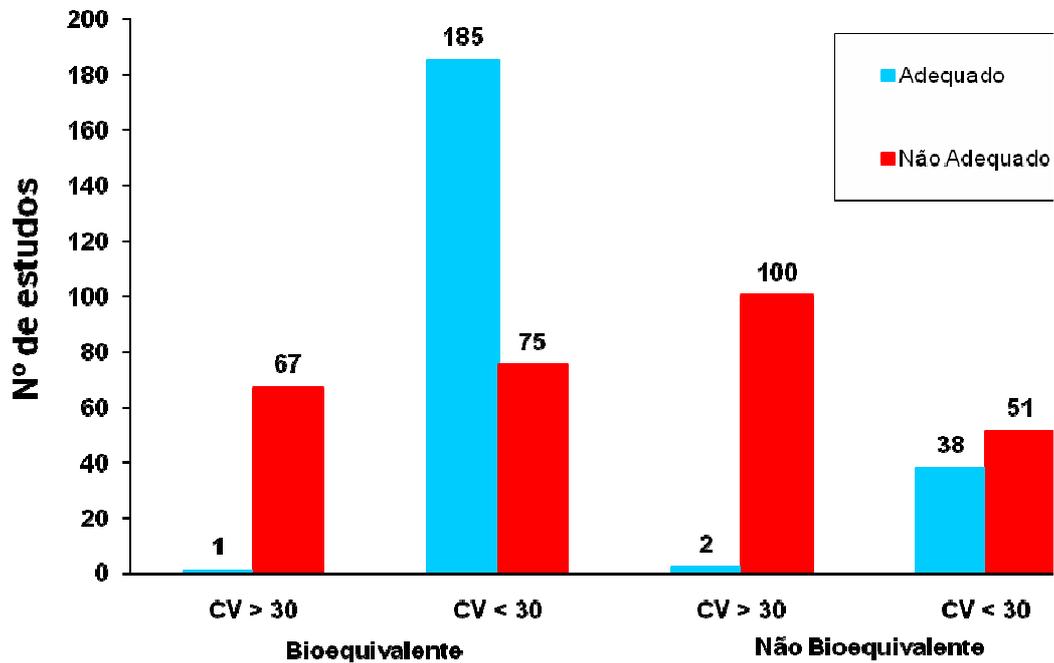


Figura 23 -Gráfico relacionando o número de estudos de bioequivalência conduzidos em relação ao CV do fármaco apresentado, a adequação do número de voluntários(29) incluídos no estudo e à conclusão do estudo, considerando uma diferença presumida entre T e R de 5%. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010

Avaliando a Figura 23, é possível observar que o os estudos de bioequivalência cujo número de voluntários foi considerado adequado ou não adequado para uma diferença presumida de 5% entre o medicamento teste e referência foi relacionado com a conclusão do estudo conforme descrito na Tabela 10:

Tabela 10 - Relação entre número de estudos de bioequivalência concluídos e sua adequação ao número de voluntários que concluíram o estudo, considerando uma diferença entre o medicamento teste e referência de 5%. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.

	<i>Bioequivalente</i>	<i>Bioinequivalente</i>
Adequado	186	40
Não adequado	142	151

Foi realizado o teste de estatístico Qui-Quadrado para verificar a associação entre a conclusão do estudo de bioequivalência e a sua adequação em relação ao número de voluntários utilizados.

Como foi obtido um valor p inferior a 0,05 (p valor < 0,01), é possível concluir que essa associação existe, ou seja, que a não adequação do número de voluntários em relação ao CV tende a conduzir os estudos realizados à bioinequivalência.

A obtenção dessa associação já era esperada considerando 5% a diferença entre T e R, pois, quando comparado à diferença de 0%, necessita-se de um número maior de voluntários nos estudos de bioequivalência para que esses sejam adequados, o que contribui para a classificação de um maior número de estudos em não adequados.

Antes do início de qualquer estudo de bioequivalência, os pesquisadores fazem uma pesquisa bibliográfica para definir o número de voluntários a serem incluídos no estudo. A informação principal extraída da literatura é o CV intrassujeito do fármaco que permite calcular o número de voluntários que serão utilizados em um estudo de bioequivalência. Há de se ressaltar que, caso os CV descritos na literatura sejam inferiores aos encontrados durante a condução dos estudos, pode-se ter uma não adequação do número de voluntários utilizado em cada estudo de bioequivalência.

Outra justificativa possível para a não adequação do tamanho de amostra é que o custo dos estudos de bioequivalência sobe à medida que os voluntários são inseridos na pesquisa, o que pode fazer com que alguns pesquisadores negligenciem as informações relacionadas ao cálculo do número de voluntários proposto por Chow e Liu (2008) (29).

Existe ainda outra possibilidade para justificar essa falta de adequação. O CV intrassujeito pode não ser somente um fator relacionado ao fármaco, já que é obtido através da variabilidade da concentração plasmática intrassujeitos nos quais foram administrados os medicamentos T e R em algum estudo descrito na literatura. Sendo assim, há possibilidade da formulação tanto de T quanto de R interferir no valor de CV para o estudo em questão, ou até mesmo no descrito na literatura pesquisada pelos pesquisadores antes de iniciar a condução do estudo de bioequivalência.

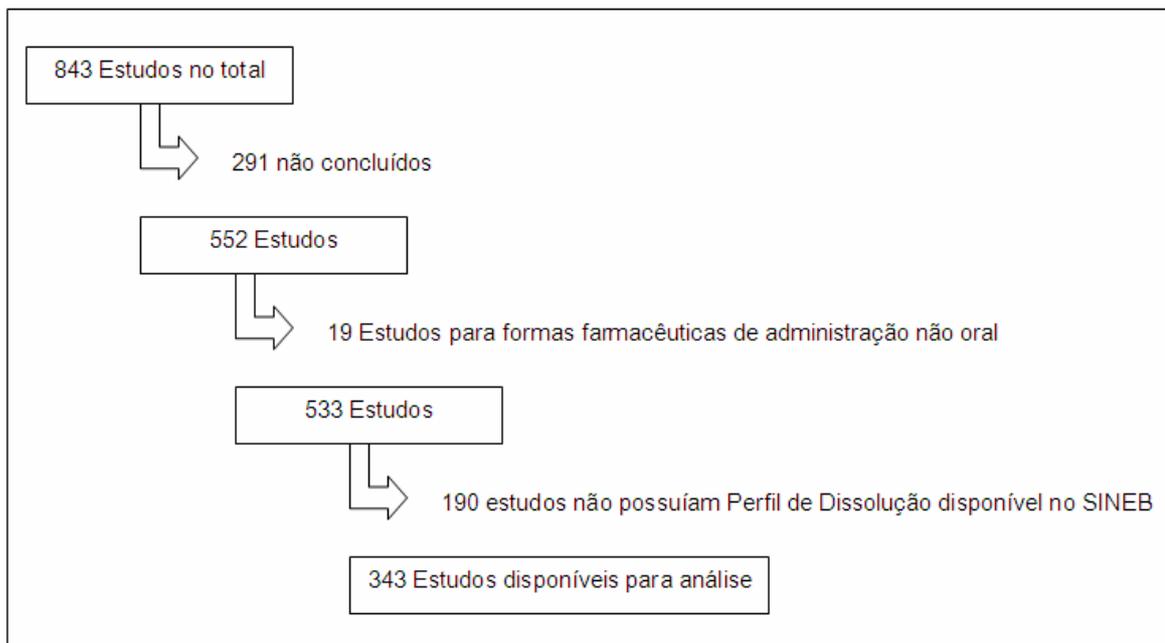
4.2 QUANTO AOS INTERFERENTES LIGADOS À FORMULAÇÃO

4.2.1 Perfil de Dissolução Comparativo

Do total de 843 estudos de bioequivalência apresentados à Anvisa no período de set/2008 a ago/2010 via Sineb, 291 não estavam concluídos. Além disto, 19 estudos apresentados não se referiam a formas farmacêuticas de administração oral e também foram descartados. Ainda, 190 estudos de bioequivalência não possuíam perfis de dissolução disponíveis no Sineb, o que impediu a análise da correlação entre conclusão do estudo de bioequivalência e o resultado dos ensaios *in vitro*.

O Quadro 3 descreve o fluxograma para a seleção dos estudos cujos perfis de dissolução foram incluídos na análise.

Quadro 3 - Fluxograma de seleção de estudos submetidos à Anvisa via Sineb no período de setembro de 2008 a agosto de 2010, para análise do perfil de dissolução.



Inicialmente, foram correlacionadas as variáveis: conclusão do estudo de bioequivalência e resultado do perfil de dissolução. A Figura 24 apresenta graficamente esta relação:

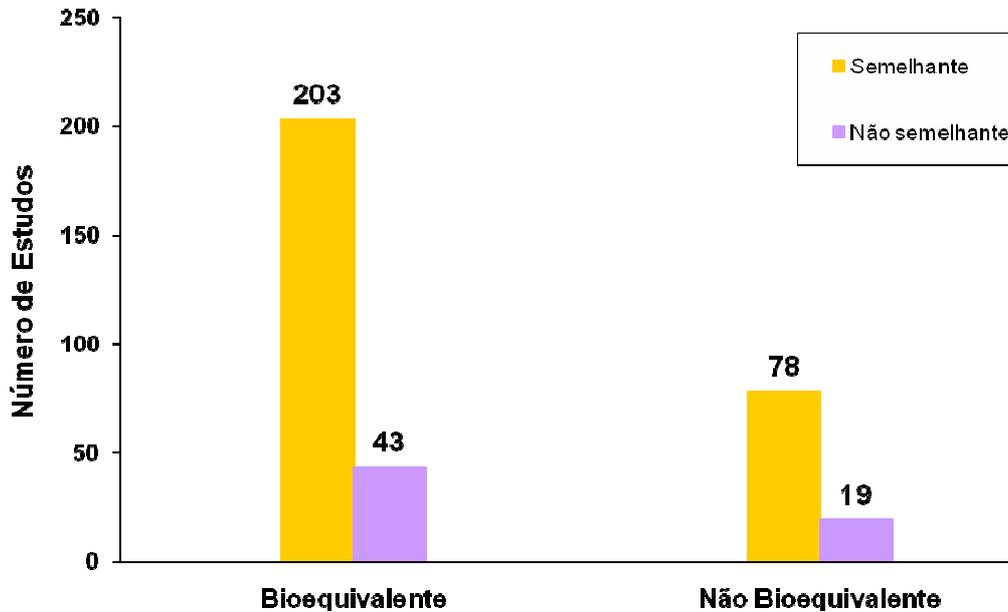


Figura 24 -Gráfico relacionando o número de estudos de bioequivalência conduzidos em relação à sua conclusão e à conclusão do perfil de dissolução. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010

Foi realizado o teste de estatístico Qui-Quadrado para verificar a associação entre a conclusão do estudo de bioequivalência e a conclusão do perfil de dissolução.

Como foi obtido um valor p superior a 0,05 (p valor = 0,648), é possível concluir que essa associação não existe, ou seja, que a similaridade obtida para o perfil de dissolução não tende a influenciar na conclusão do estudo de bioequivalência.

Em outras palavras, isso significa que a correlação *in vitro/in vivo* ao qual os medicamentos devem ser submetidos previamente aos estudos de bioequivalência, não está sendo capaz de prever o resultado do estudo *in vivo*.

A não associação entre os resultados obtidos *in vitro* (perfil de dissolução) com o resultado do ensaio *in vivo* (estudo de bioequivalência) serve de alerta para a Anvisa que, conforme descrito na seção 1.3.5, pretende regulamentar o registro de medicamentos com base na classificação biofarmacêutica do fármaco e nos resultados oriundos de ensaios *in vitro* (bioensaio). Embora as condições em que são conduzidos

os ensaios de perfil de dissolução possam diferir daquelas que devem ser seguidas para a condução dos ensaios *in vitro* para fins de bioisenção (tabela 7), o resultado serve de indício de que as condições em que são realizados os ensaios *in vitro* devem ser melhor avaliadas para que se tenha uma verdadeira correlação *in vitro/in vivo* estabelecida. Sendo assim, apesar de ter sido comprovada a associação entre os fármacos cuja classificação biofarmacêutica seja I ou III com a conclusão bioequivalência, é necessário ainda que seja verificado se as condições dos ensaios *in vitro* descritas na tabela 7 para fins de bioisenção, permitem que sejam estabelecidas uma correlação *in vitro/in vivo* eficiente.

Ainda assim, posteriormente continuou-se a avaliação de parâmetros relacionados ao perfil de dissolução, verificando se o método de dissolução utilizado (método de origem farmacopeica ou método validado pelo fabricante) teve alguma influência no resultado do perfil de dissolução. A Figura 25 a seguir demonstra graficamente a relação entre método de dissolução, conclusão do perfil de dissolução e a conclusão do estudo de bioequivalência.

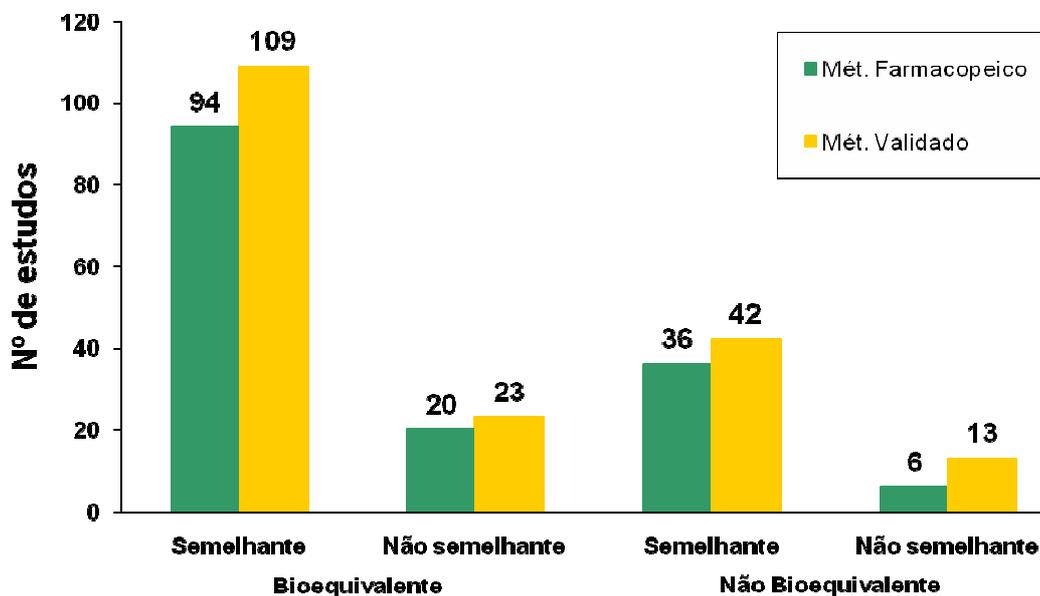


Figura 25 -Gráfico relacionando o número de estudos de perfil de dissolução conduzidos em relação à sua conclusão, ao tipo de método de dissolução utilizado e à conclusão do estudo de bioequivalência. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010

Avaliando a figura acima, é possível observar que a conclusão dos estudos de perfil de dissolução e o método de dissolução utilizado foram relacionados conforme descrito na Tabela 11:

Tabela 11 - Relação entre a conclusão do estudo de perfil de dissolução e o tipo de método de dissolução utilizado. Dados obtidos através do Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010.

	Semelhante	Não semelhante
Método dissolução farmacopéico	130	26
Método dissolução validado	151	36

Foi realizado o teste de estatístico Qui-Quadrado para verificar a associação entre conclusão dos estudos de perfil de dissolução e o método de dissolução utilizado.

Como foi obtido um valor p superior a 0,05 (p valor = 0,536), é possível concluir que essa associação não existe, ou seja, que o método de dissolução utilizado não tende a influenciar na conclusão do estudo de perfil de dissolução.

Posteriormente foi verificado se a adição de tensoativo no meio de dissolução teve alguma influência no resultado do perfil de dissolução. A Figura 26 mostra a relação entre adição de tensoativo e a conclusão do estudo de perfil de dissolução.

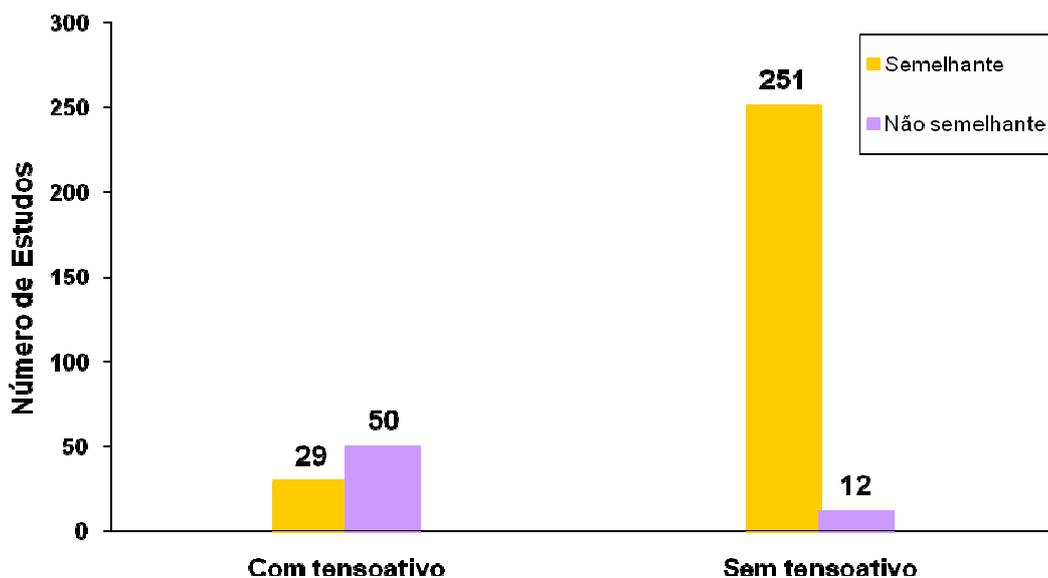


Figura 26 -Gráfico relacionando a conclusão do estudo de perfil de dissolução e a adição de tensoativo ao meio de dissolução. Dados obtidos através do Sistema de Informações

de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (Sineb) durante o período de set/2008 a ago/2010

Foi realizado o teste de estatístico Qui-Quadrado para verificar a associação entre conclusão dos estudos de perfil de dissolução e a adição junto ao meio de dissolução utilizado.

Como foi obtido um valor p inferior a 0,05 (p valor < 0,01), é possível concluir que essa associação existe, ou seja, que o uso de tensoativo no meio de dissolução tende a influenciar na conclusão do estudo de perfil de dissolução.

Diferente do discutido anteriormente na seção 1.5, que descreve o uso do tensoativo para propiciar melhor condição ao meio para solubilização de fármacos pouco solúveis, os resultados, a princípio, demonstram que o uso de tensoativo tende a conduzir o perfil de dissolução a não semelhança. Entretanto, uma hipótese para justificar os resultados encontrados, é que os tensoativos têm sido usados de forma errônea, não sendo adicionados ao meio de dissolução em concentração adequada ou mesmo utilizados tipos inadequados para a solubilização dos fármacos sob avaliação.

4.2.2 Excipientes

Os estudos de bioequivalência são apresentados à Anvisa fisicamente anexados ao processo de registro de medicamento, que contem todas as informações relativas ao produto, como por exemplo, formulação, dossiê de produção, informações sobre estabilidade, dentre outras.

Durante a análise de um processo de registro de medicamento, as informações relativas à formulação do medicamento são inseridas em um sistema interno da Anvisa, denominado DATAVISA (91).

Entretanto, o DATAVISA (91), por ser um sistema antigo, não permite haver nenhuma vinculação das informações relativas ao produto com o estudo de bioequivalência ao qual ele foi submetido, não sendo possível assim, relacionar as informações da formulação dos produtos com a conclusão do estudo de

bioequivalência, e, conseqüentemente, não permitindo avaliar uma possível interferência dos excipientes sobre a conclusão dos estudos de bioequivalência.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados foi possível verificar que dentre os fatores relacionados ao fármaco, tanto a classificação biofarmacêutica dos fármacos presentes nos medicamentos quanto suas variabilidades influenciaram na conclusão dos estudos de bioequivalência.

Ainda, foi verificado também que, a não adequação do número de voluntários necessários a condução dos estudos de bioequivalência em relação aos seus coeficientes de variação tende a conduzir os estudos à bioinequivalência.

Com relação aos fatores relacionados à formulação, foi observado que os perfis de dissolução avaliados não foram capazes de predizer os resultados dos estudos de bioequivalência, não sendo então possível fazer tal associação. Não foi possível também associar os métodos de dissolução utilizados (farmacopeico ou validado) com a conclusão do perfil de dissolução. No entanto, a adição de tensoativo ao meio de dissolução, ao contrário do esperado, não conduziu o ensaio de perfil de dissolução a similaridade.

A influência dos excipientes na conclusão dos estudos de bioequivalência não pôde ser avaliada em virtude da não vinculação do sistema Sineb que armazena as informações dos estudos de bioequivalência com o DATAVISA, sistema que armazena as informações relativas à formulação.

Com base nos dados disponíveis, que mostraram, nas condições de análise, a ausência de associação estabelecida entre os resultados dos ensaios de perfil de dissolução e os resultados dos estudos de bioequivalência, é recomendada que antes da regulamentação das consultas públicas 91 e 92, seja realizada uma melhor avaliação das condições em que serão conduzidos os estudos *in vitro* para fins de bioisenção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bueno M. Implantação, evolução, aspectos técnicos e perspectivas da regulamentação técnica de biodisponibilidade relativa e bioequivalência de medicamentos genéricos e similares no Brasil [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. (1999).
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 391. Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. (1999).
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 10. Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. (2001).
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 84. Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. (2002).
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 135. Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. (2003).
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 16. Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. (2007).
8. Pró-Genéricos. Mercado Mundial de Genéricos. São Paulo: Progenéricos; 2011 [19 mar. 2011].
9. BRASIL. Congresso Nacional. Lei 5772 de 21 de dezembro de 1971. Código de Propriedade Industrial. (1971).
10. Dias CRC. Medicamentos genéricos no Brasil de 1999 a 2002: Análise da legislação, aspectos conjunturais e políticos [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.
11. BRASIL. Congresso Nacional. Lei 6360. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. (1976).

12. BRASIL. Congresso Nacional. Medida Provisória 2190-34. Altera dispositivos das Leis no 9.782, de 26 de janeiro de 1999, que define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e no 6.437, de 20 de agosto de 1977, que configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. (2001).
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 133. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências. (2003).
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 134. Dispõe sobre a adequação dos medicamentos já registrados. (2003).
15. Quental C, Salles Filho S. Ensaio clínico: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2006; 9(4):408-24.
16. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 17. Regulamento Técnico para Registro de Medicamento Similar. (2007).
17. Consiglieri VO, Storpirtis S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação; Bioequivalence of medicines: objectives, pharmacokinetic parameters, experimental design and evaluation criteria. *RBCF, Rev bras ciênc farm(Impr)*. 2000; 36(1):13-21.
18. EUA. United States of America Government Printing Office. 21. Bioavailability and Bioequivalence Requirements. (1998).
19. BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 894. Determina a publicação do "Guia para protocolo e relatório técnico de estudo de bioequivalência". (2003).
20. BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 895. Determina a publicação do "Guia para elaboração de relatório técnico de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência". (2003).
21. BRASIL. Manual de boas práticas em biodisponibilidade / bioequivalência. Brasília: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2002.

22. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 1170. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. (2006).
23. BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 898. Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. (2003).
24. Haidar SH, Davit B, Chen ML, Conner D, Lee LM, Li QH, et al. Bioequivalence approaches for highly variable drugs and drug products. *Pharmaceutical research*. 2008; 25(1):237-41.
25. Lopes N, Ruas K, Serra CHR, Porta V. Average, Population and Individual Bioequivalence: Answering Questions on Drug Interchangeability. *SA Pharmaceutical Journal*. 2010; 77(6):46-8.
26. Davit BM, Conner DP, Fabian-Fritsch B, Haidar SH, Jiang X, Patel DT, et al. Highly variable drugs: observations from bioequivalence data submitted to the FDA for new generic drug applications. *The AAPS Journal*. 2008; 10(1):148-56.
27. Van Peer A. Variability and Impact on Design of Bioequivalence Studies. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2010; 106(3):146-53.
28. Midha K, Rawson M, Hubbard J. The bioequivalence of highly variable drugs and drug products. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2005; 43(10):485.
29. Chow SC, Liu J. Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies: Chapman & Hall/CRC; 2008.
30. BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 31. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. (2010).
31. Cook J, Davit B, Polli JE. Impact of Biopharmaceutics Classification System-based Biowaivers. *Molecular Pharmaceutics*.
32. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*. 1995; 12(3):413-20.

33. Lennernäs H, Abrahamsson B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2005; 57(3):273-85.
34. Panchagnula R, Thomas NS. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *International journal of pharmaceutics*. 2000; 201(2):131-50.
35. Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2002; 42(6):620.
36. Lobenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2000; 50(1):3-12.
37. Bonamici D. Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisencões [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
38. Avdeef A. Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state: LibreDigital; 2003.
39. Cao X, Gibbs ST, Fang L, Miller HA, Landowski CP, Shin HC, et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharmaceutical research*. 2006; 23(8):1675-86.
40. Macheras P, Argyrakis P. Gastrointestinal drug absorption: is it time to consider heterogeneity as well as homogeneity? *Pharmaceutical research*. 1997; 14(7):842-7.
41. Katsura T, Inui K. Intestinal absorption of drugs mediated by drug transporters: mechanisms and regulation. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2003; 18(1):1-15.
42. Egan WJ, Lauri G. Prediction of intestinal permeability. *Advanced drug delivery reviews*. 2002; 54(3):273-89.
43. Balimane PV, Chong S, Morrison RA. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000; 44(1):301-12.

44. Charman WN, Porter CJH, Mithani S, Dressman JB. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997; 86(3):269-82.
45. Sinko PJ, Leesman GD, Amidon GL. Predicting fraction dose absorbed in humans using a macroscopic mass balance approach. *Pharmaceutical research*. 1991; 8(8):979-88.
46. Séchaud R, Robeva A, Belleli R, Balez S. Absolute oral bioavailability and disposition of deferasirox in healthy human subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2008; 48(8):919-25.
47. Séchaud R, Robeva A, Belleli R, Balez S. Absolute oral bioavailability and disposition of deferasirox in healthy human subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2008; 48(8):919.
48. EMA. Guideline on the Investigation of Bioequivalence. 2010 [11 jan. 2011]; Available from: www.ema.europa.eu.
49. FDA. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. 2000 [11 jan. 2011]; Available from: www.fda.gov/cder/guidance/index.htm.
50. Souza J, Freitas ZMF, Storpirtis S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007; 43(4):515-27.
51. Petri N, Tannergren C, Holst B, Mellon FA, Bao Y, Plumb GW, et al. Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug metabolism and disposition*. 2003; 31(6):805.
52. Ehrhardt C, Kim KJ. *Drug absorption studies: in situ, in vitro and in silico models*: Springer Verlag; 2008.
53. Xie LH, Li Q, Zhang J, Weina PJ. Pharmacokinetics, tissue distribution and mass balance of radiolabeled dihydroartemisinin in male rats. *Malaria Journal*. 2009; 8(1):112.

54. Dunne A, Gaynor C, Davis J. Deconvolution based approach for level A in vivo-in vitro correlation modelling: statistical considerations. *Clinical Research and Regulatory Affairs*. 2005; 22(1):1-14.
55. Storpirtis S, Gonçalves JE, Chiann C, Gai MN. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2009.
56. Balimane PV, Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug discovery today*. 2005; 10(5):335-43.
57. Uhing MR, Kimura RE. The effect of surgical bowel manipulation and anesthesia on intestinal glucose absorption in rats. *Journal of Clinical Investigation*. 1995; 95(6):2790.
58. Palsson B. The challenges of in silico biology. *Nature biotechnology*. 2000; 18(11):1147-50.
59. Van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003; 2(3):192-204.
60. Leo AJ, Hoekman D. Calculating log P (oct) with no missing fragments; The problem of estimating new interaction parameters. *Perspectives in drug discovery and design*. 2000; 18(1):19-38.
61. OMS. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. 2006 [11 jan. 2011]; Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf#page=403.
62. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CP 91 de 24 ago 2010. Proposta de Resolução-RDC que dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência. (2010).
63. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CP 92 de 24 ago 2010. Proposta de Instrução Normativa que dispõe sobre a Lista de fármacos candidatos a bioisenção pautada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). (2010).
64. FIP. BCS (Biopharmaceutics Classification System) and Biowaiver. 2011 [11 jan. 2011]; Available from: <http://www.fip.org/bcs>.

65. Koeppe MO, Cristofolletti R, Fernandes EF, Storpirtis S, Junginger HE, Kopp S, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Levofloxacin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011.
66. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharmaceutical research*. 1998; 15(1):11-22.
67. Barros ACS. Aspectos científicos e regulatórios do ensaio de dissolução [Monografia]. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz; 2010.
68. Rossi RC, Dias CL, Bajerski L, Bergold AM, Fröhlich PE. Development and validation of discriminating method of dissolution for fosamprenavir tablets based on in vivo data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010.
69. Manadas R, Pina ME, Veiga F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Brazilian J Pharm Sci*. 2002; 38:375-400.
70. Serra CHR, Storpirtis S. Dissolution profile comparison of cephalexin by dissolution kinetic studies and dissolution efficiency (ED%). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007; 43(1):79-88.
71. FDA. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. 1997 [11 jan. 2011]; Available from: www.fda.gov.
72. Anderson N, Bauer M, Boussac N, Khan-Malek R, Munden P, Sardaro M. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of in vitro dissolution profiles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998; 17(4-5):811-22.
73. FDA. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. 1997 [11 jan. 2011]; Available from: www.fda.gov.
74. Shargel L, Yu ABC, Wu-Pong S. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*: Appleton & Lange Connecticut; 1999.
75. Noory C, Tran N, Ouderkirk L, Shah V. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. *American Pharmaceutical Review*. 2002; 5:16-21.
76. Aulton ME, Ortega GG. *Delineamento de formas farmacêuticas*: Artmed; 2008.

77. BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 310. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. (2004).
78. BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 37. Trata da admissibilidade das Farmacopéias estrangeiras. (2009).
79. Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, et al. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical research*. 2002; 19(7):921-5.
80. Schulze JDR, Ashiru DAI, Khela MK, Evans DF, Patel R, Parsons GE, et al. Impact of formulation excipients on human intestinal transit. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2006; 58(6):821-5.
81. Schulze JDR, Waddington WA, Ell PJ, Parsons GE, Coffin MD, Basit AW. Concentration-dependent effects of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit and drug absorption. *Pharmaceutical research*. 2003; 20(12):1984-8.
82. Chen ML, Straughn A, Sadrieh N, Meyer M, Faustino P, Ciavarella A, et al. A modern view of excipient effects on bioequivalence: Case study of sorbitol. *Pharmaceutical research*. 2007; 24(1):73-80.
83. Ren X, Mao X, Si L, Cao L, Xiong H, Qiu J, et al. Pharmaceutical excipients inhibit cytochrome P450 activity in cell free systems and after systemic administration. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2008; 70(1):279-88.
84. Bravo Gonzalez RC, Huwyler J, Boess F, Walter I, Bittner B. In vitro investigation on the impact of the surface active excipients Cremophor EL, Tween 80 and Solutol HS 15 on the metabolism of midazolam. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2004; 25(1):37-49.
85. Hyams JS. Sorbitol intolerance: an unappreciated cause of functional gastrointestinal complaints. *Gastroenterology*. 1983; 84(1):30.
86. Rege BD, Yu LX, Hussain AS, Polli JE. Effect of common excipients on Caco 2 transport of low permeability drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001; 90(11):1776-86.

87. Rege BD, Kao JPY, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2002; 16(4-5):237-46.
88. Laboratories TSR. Biopharmaceutics Classification System (BCS). Ann Arbor: Therapeutic System Research Laboratories; 2011 [11 jan. 2011]; Available from: <http://www.tsrlinc.com>.
89. Hair J, Anderson R, Tatham R, Black WC. *Análise Multivariada de Dados*. 5ª Edição ed. São Paulo: ARTMED; 2009.
90. Sousa VD. *Regulamentação Técnica e Bioética de Participação de Seres Humanos em Ensaio Clínicos [Dissertação]*. Brasília: Universidade de Brasília; 2010.
91. BRASIL. DATAVISA. Base de dados interna da Anvisa. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2011 [18 fev. 2011]; Available from: DATAVISA.