

Estudo Comparativo da Biodisponibilidade Relativa de Duas Formulações de Glimepirida em Voluntários Sadios de Ambos os Sexos Após Administração de Uma Dose Única de Um Comprimido de 4 mg

artigo original

NEY CARTER DO CARMO BORGES
YARA DEL ANTONIO TAVEIRA
JOSIMARA A. MAZUCHELI
ANDRÉ LUIZ HADDAD
RAFAEL E. B. ASTIGARRAGA
RONILSON AGNALDO MORENO

Synchrophar Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos S/S Ltda. (NCCB, YDAT, JAM & RAM), Departamento de Clínica Médica (NCCB) e Departamento de Farmacologia (RAM), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP; e MAGABI Pesquisas Clínicas e Farmacêuticas Ltda. (ALH), São Paulo, SP.

Recebido em 11/05/06
Revisado em 11/12/06
Aceito em 20/12/06

RESUMO

Objetivo: Comparar a biodisponibilidade de duas formulações de glimepirida em 26 voluntários sadios de ambos os sexos. **Material e métodos:** O estudo foi aberto, cruzado e randomizado com dois períodos e wash out de 14 dias. As amostras foram obtidas em um intervalo de 48 horas. As concentrações de glimepirida foram analisadas por HPLC MS/MS. Das curvas de concentração de glimepirida no plasma versus tempo, foram obtidos os seguintes parâmetros farmacocinéticos: $ASC_{(0-t)}$, $ASC_{(0-\infty)}$, C_{max} , K_e , T_{max} e $T_{1/2}$. **Resultados:** A razão entre as média geométricas de Glimepirida/Amaryl® 4 mg foi de 102,35% para $ASC_{(0-t)}$; 102,35% para $ASC_{(0-\infty)}$ e 99,31% para C_{max} . Os intervalos de confiança de 90% (IC 90%) foram de 92,62–109,55%; 95,62–109,55% e 88,60–111,32%, respectivamente. **Conclusão:** Como o IC 90% para C_{max} , $ASC_{(0-t)}$ e $ASC_{(0-\infty)}$ estava dentro do intervalo de 80–125%, concluiu-se que ambas as formulações foram bioequivalentes de acordo com o grau e a extensão de sua absorção. (Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51/6:950-955)

Descritores: Glimepirida; Diabetes; Bioequivalência; Cromatografia líquida

ABSTRACT

Comparison Study of Two Glimepiride Formulations Bioavailability in Healthy Volunteers of Both Sexes After a Single Dose Administration.

Objective: To compare the bioavailability of two glimepiride 4-mg tablet formulation in 26 healthy volunteers of both sexes. **Material and methods:** The study was conducted open with randomized two-period crossover design and a 14-day washout period. Samples were obtained over a 48-hour interval. Glimepiride concentrations were analyzed by LC-MS-MS. From the glimepiride plasma concentration versus time curves the following pharmacokinetic parameters were obtained: $AUC_{(0-last)}$, $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, K_e , $T_{1/2}$, C_{max} , and T_{max} . **Results:** Geometric mean of Glimepiride/Amaryl® 4 mg was 102.35% for $AUC_{(0-t)}$, 102.35% for $AUC_{(0-\infty)}$ and 99.31% for C_{max} . The 90% CI was 92.62–109.55%; 95.62–109.55% e 88.60–111.32%, respectively. **Conclusion:** Since the 90% CI for both C_{max} , $AUC_{(0-t)}$, and $AUC_{(0-\infty)}$ were within the interval of 80–125%, it was concluded that both formulations were bioequivalent, according to both the rate and extent of absorption. (Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51/6:950-955)

Keywords: Glimepiride; Diabetes; Bioequivalence; Liquid chromatography

O DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2) é, atualmente, uma das principais causas de morte no mundo, sendo considerado uma doença epidêmica. Estima-se que o DM2 seja a causa de 1 em cada 20 mortes e, em adultos com idade entre 35 e 64 anos, 1 em cada 10 mortes (1). Espera-se que até 2025 a incidência de DM2 tenha um crescimento de 35% em países em desenvolvimento (2).

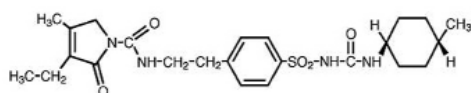
O DM2 é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (3).

O tratamento comumente utilizado para o DM2 consiste em dietas e exercícios físicos adequados. Entretanto, nos casos em que mesmo o tratamento usual não resulta em regularidade no metabolismo, faz-se necessário o uso de medicamentos hipoglicemiantes orais (4).

Dentre estes tipos de medicamentos, atualmente dispõem-se de cinco principais classes distintas: sulfoniluréias, biguanidas, inibidores da α -glicosidase, tiazolinedionas e meglitinidas (5).

GLIMEPIRIDA

A glimepirida é um fármaco que faz parte do grupo da sulfoniluréias. Sua fórmula estrutural é (6):



A glimepirida caracteriza-se por estimular a secreção de insulina, ligando-se a um receptor específico na célula β , que determina o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP, resultando em despolarização da célula. O influxo de cálcio secundário à despolarização causa liberação de insulina, que potencializa a ação insulínica no tecido muscular, adiposo e no fígado, diminuindo a produção hepática de glicose (7).

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi comparar a biodisponibilidade relativa de duas formulações do comprimido de 4 mg de glimepirida em 26 voluntários sadios de ambos os sexos, após ingestão de 1 comprimido em jejum.

MÉTODO

O estudo foi aberto, randomizado, cruzado, com dois tratamentos e dois períodos, nos quais 26 voluntários sadios (13 homens e 13 mulheres) receberam um comprimido referência ou um teste dependendo da aleatorização a que foram submetidos. As administrações foram precedidas de jejum e tiveram um intervalo de 14 dias entre elas. Os confinamentos tiveram duração de aproximadamente 24 horas cada.

Para análise farmacocinética, foram utilizadas amostras de plasma, sendo realizadas 36 coletas de amostras por voluntário, sendo 18 em cada período de internação.

Para efeito de segurança dos voluntários, foram verificados sinais vitais (pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura) e foram realizados questionamentos para certificação de bem estar geral.

FORMULAÇÕES

As seguintes formulações foram empregadas: comprimido de glimepirida 4 mg (número de lote 001/03), produzido pela Eurofarma Laboratórios Ltda., como formulação teste e comprimido de Amaryl® 4 mg (número de lote 203126), produzido pela Aventis Pharma Ltda., como formulação referência.

CONDUÇÃO CLÍNICA

Os 26 voluntários foram selecionados mediante comprovação de sua hígidez por meio de consulta clínica, submissão a eletrocardiograma e exames laboratoriais.

Após comprovação da hígidez, foi realizada uma explanação sobre o estudo e as implicações da participação no mesmo. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Unicamp e todos os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declarando estarem cientes de seus direitos e deveres em relação à pesquisa.

Na noite de confinamento de cada um dos períodos, foi oferecido um jantar de cardápio pré-definido aos voluntários. Os mesmos cumpriram um jejum alimentar de pelo menos 10 horas e um jejum para líquidos de pelo menos 6 horas anteriores à administração da medicação.

A administração da medicação teve início às 7 h da manhã seguinte ao confinamento. Cada voluntário ingeriu a medicação a que foi designado com 200 mL de água mineral sem gás e na temperatura ambiente. Após a ingestão, foi cumprido um jejum alimentar de 4 horas. Um desjejum, um almoço, um lanche da tarde e um

jantar padronizados foram consumidos depois de aproximadamente 4, 6, 8 e 11 horas da administração do medicamento, respectivamente. Não foi permitida a ingestão de nenhum outro alimento durante o período de confinamento. A ingestão de líquidos obedeceu ao seguinte horário: 200 mL de água após 2 horas de ingestão da medicação e, após almoço, ingestão *ad libitum*. Os voluntários permaneceram no confinamento por um período total de 24 horas em cada internação.

As pressões arteriais sistólica e diastólica (medida de forma não invasiva com um esfigmomanômetro), a frequência cardíaca e a temperatura foram registradas anteriormente e em intervalos pré-determinados após a administração das formulações.

As coletas de amostras de sangue ocorreram nos seguintes horários após a administração dos fármacos (hh:mm): 00:00, 00:15, 00:30, 00:45, 01:00, 01:30, 02:00, 02:30, 03:00, 04:00, 05:00, 06:00, 08:00h, 10:00, 12:00, 24:00, 48:00.

Todos os procedimentos e alimentos foram iguais para ambos os períodos.

MÉTODO ANALÍTICO

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.000 g por 10 min à temperatura ambiente e o plasma separado e armazenado a -20°C até que fosse avaliado com relação ao conteúdo de glimepirida. A glimepirida e a tolazamida, utilizada como padrão interno na quantificação da glimepirida, foram extraídas do plasma dos voluntários por extração líquido-líquido.

A 300 µL de cada amostra de plasma foram adicionados 25 µL do padrão interno tolazamida (2 µg/mL), 500 µL de solução saturada de cloreto de sódio e 1000 µL de acetato de etila. Após agitação por 5 min, os tubos foram centrifugados (5 min a 14.000 rpm) e 800 µL do sobrenadante foram transferidos para um outro tubo limpo. O solvente restante no sobrenadante transferido foi, então, evaporado usando um fluxo de ar comprimido a 37°C e os resíduos dissolvidos em 300 µL de acetonitrila. 250 µL desta solução foram, então, transferidos para *inserts* de vidro descartável e alíquotas de 8 µL foram injetadas no sistema cromatográfico.

As concentrações plasmáticas de glimepirida foram medidas através de um método sensível de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC MS/MS). O espectrômetro de massas utilizado foi o Micromass Quattro Micro equipado com um auto injetor Shimadzu SIL 10 ADVP. O *software* utilizado foi o Micromass Mass Lynx 3.5.

A glimepirida foi extraída do plasma dos voluntários por extração líquido-líquido. Os compostos foram eluídos em um pequeno volume de fase móvel, cuja alíquota foi analisada por ionização positiva e utilizando o monitoramento do íon selecionado (MRM).

O padrão interno utilizado para quantificação da glimepirida foi a tolazamida.

Os cálculos foram baseados em função da curva de calibração construída para o fármaco analisado, utilizando os padrões de calibração pré-estabelecidos. Estas razões foram calculadas através da razão entre as áreas dos picos da glimepirida e do padrão interno tolazamida. Para as quantificações foram obtidas as razões das áreas dos picos glimepirida/tolazamida. As concentrações plasmáticas das amostras foram derivadas a partir da equação linear da reta, obtida com a curva padrão (concentração de glimepirida em função das áreas).

ANÁLISE FARMACOCINÉTICA E ESTATÍSTICA

A análise farmacocinética foi realizada com apoio dos *softwares* Microsoft Excel versão 7.0 e SAS® (*Statistical Analysis System*) versão 8.2. Os parâmetros determinados foram $ASC_{(0-t)}$, $ASC_{(0-\infty)}$ (calculados pelo método trapezoidal), K_e , $T_{1/2}$, C_{max} e T_{max} .

A concentração máxima no plasma observada (C_{max}) e o tempo necessário para atingir esta concentração (T_{max}) foram obtidos diretamente das curvas. A área sob a curva (ASC) de concentração de glimepirida no plasma vs. tempo de 0 a 48 h (ASC_{0-t}) foi calculada aplicando-se a regra linear trapezoidal. A extrapolação dessa área ao infinito ($ASC_{0-\infty}$) foi feita acrescentando-se o valor C_{0-t}/K_e à ASC_{0-t} calculada. As análises estatísticas foram conduzidas após transformação logarítmica baseada em modelo aditivo para todos os valores de ASC e C_{max} . A constante da taxa de eliminação terminal de primeira ordem (K_e) foi estimada pelo coeficiente angular da reta de regressão, calculada pelo método dos mínimos quadrados, do logaritmo natural da concentração vs. tempo. O $T_{1/2}$ foi obtido empregando-se a equação ($T_{1/2} = \ln(2)/K_e$). Foi empregada análise de variância (ANOVA) para o modelo de dois períodos cruzados. O critério para equivalência baseada em biodisponibilidade relativa foi intervalo de confiança de 90% da razão entre as médias geométricas das ASCs (no que diz respeito à extensão da absorção) e dos C_{max} s (no que diz respeito à velocidade de absorção), relativos ao fármaco, dentro do intervalo de 80–125% (11). Para a constatação da bioequivalência, foi utilizada a bioequivalência média.

RESULTADOS

A tabela 1 resume os dados demográficos da população que participou do estudo.

Cada formulação de glimepirida foi bem tolerada nas doses administradas. O estudo transcorreu sem nenhum efeito adverso sério.

Tabela 1. Análise estatística descritiva dos dados demográficos (altura, peso, índice de massa corpórea e idade) dos 26 voluntários que participaram do estudo.

Variáveis	N	Dados demográficos				
		Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Altura	26	1,67	0,07	1,57	1,82	1,66
Peso	26	67,6	9,7	51,2	90,7	67,8
IMC	26	24	2,61	19,16	27,8	24
Idade	26	29	6,23	20	43	27,5

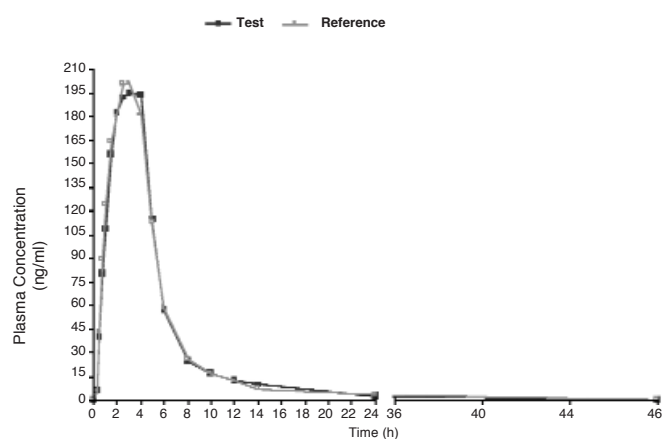


Figura 1. Perfil das concentrações médias de glimepirida no plasma versus tempo, obtido após uma única administração de cada uma das formulações do comprimido de 4 mg de glimepirida.

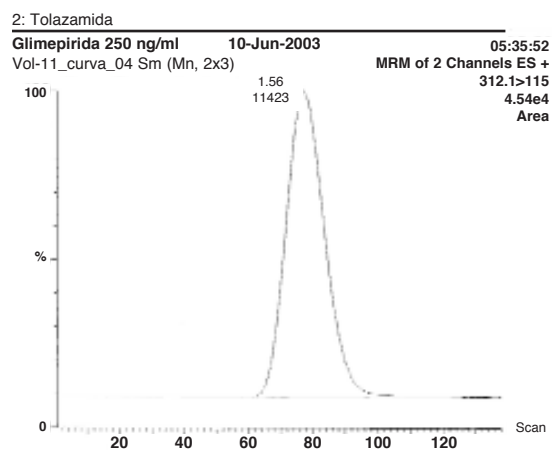
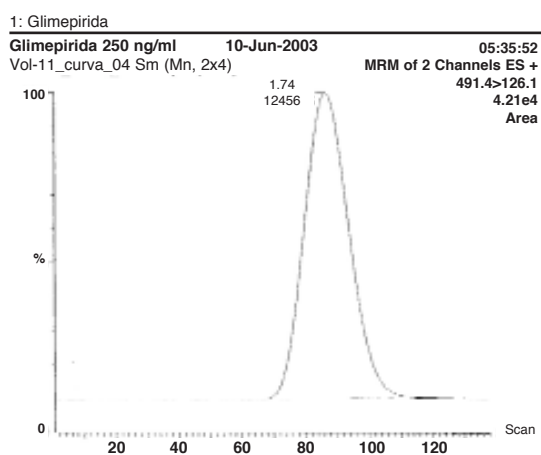


Figura 2. Cromatogramas dos íons selecionados (MRM). A: MRM de 2 canais ES+: 491,4 > 126,1 para a glimepirida. B: MRM de 2 canais ES+: 312,1 > 115,0 para a tolazamida.

Tabela 2. Médias geométricas das razões individuais da ASC_{0-t} , ASC_{0-ult} , $ASC_{0-\infty}$ e C_{max} (formulação teste/referência), os respectivos intervalos de confiança 90% (IC 90%) e poder, para a população total de voluntários, população masculina e feminina.

Médias geométricas das razões individuais da ASC_{0-t} , ASC_{0-ult} , $ASC_{0-\infty}$ e C_{max}				
Teste/Referência	Média Geométrica	Paramétrico (n = 26) IC 90%	Poder	CV Intra-sujeito (%)
n = 26				
$ASC_{(0-t)}\%$	102.47	95.74–109.68	0.9997	14.39
$ASC_{(0-ult)}\%$	102.97	95.36–111.19	0.9983	16.29
$ASC_{(0-\infty)}\%$	104.48	96.41–113.23	0.9972	17.06
$C_{max}\%$	99.31	88.55–111.32	0.9423	24.40
Teste/Referência	Média Geométrica	Paramétrico masculino (n = 13) IC 90%	Poder	CV Intra-sujeito (%)
n = 13				
$ASC_{(0-t)}\%$	108.36	99.80–117.65	0.9947	11.68
$ASC_{(0-ult)}\%$	110.97	101.17–121.72	0.9863	13.14
$ASC_{(0-ult)}\%$	108.26	99.04–118.34	0.9898	12.64
$ASC_{(0-\infty)}\%$	110.06	95.32–127.08	0.8289	20.56
Teste/Referência	Média Geométrica	Paramétrico feminino (n = 13) Women – Parametric IC 90%	Poder	CV Intra-sujeito (%)
n = 13				
$ASC_{(0-t)}\%$	97.95	88.11–108.89	0.9641	15.06
$ASC_{(0-t)}\%$	96.70	86.04–108.69	0.9350	16.64
$ASC_{(0-ult)}\%$	101.62	87.82–117.58	0.8193	20.87
$ASC_{(0-\infty)}\%$	90.95	76.15–108.95	0.6738	25.54

Tabela 3. Análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos médios obtidos dos 26 voluntários após a administração oral de cada formulação de glimepirida 4 mg.

Análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos				
	Glimepirida			
	Amaryl®		Glimepirida	
	Média	DP	Média	DP
$ASC_{(0-t)}$ ([ngh/ml])	1083	410,9	1080	331,4
$ASC_{(0-\infty)}$ ([ngh/ml])	1083	410,9	1080	331,4
C_{max} ([ngh/ml])	241,9	81,68	238,9	71,56
K_e	0,26	0,08	0,29	0,13
	Mediana	(Amplitude)	Mediana	(Amplitude)
$T_{1/2}$ (h)	2,63	3,35	2,34	5,75
T_{max} (h)	2,50	3,00	3,00	4,00

Treze voluntários apresentaram eventos adversos, sendo 11 queixas clínicas não relacionadas à droga e 2 queixas de cefaléia, que foram classificadas como possivelmente relacionadas à droga, em decorrência do horário de administração da mesma.

Todos os parâmetros clínicos e bioquímicos pós-estudo apresentaram-se sem quaisquer alterações relevantes.

O limite de quantificação (LQ) encontrado foi 5 ng/ml. Os tempos de retenção da glimepirida e da tolazamida foram de 1,74 min e 1,56 min, respectivamente.

A exatidão intracorrida foi de 96,32%, 94,23% e 98,76%, respectivamente. A exatidão intercorridas foi de 98,12%, 96,75% e 98,40%, respectivamente. A exatidão foi obtida pelo valor médio de cada amostra ou lote, em cada nível de concentração dentro de 15% do valor real (tolerância até 20% em valores de LQ). O perfil das concentrações médias da glimepirida no plasma *versus* tempo obtido após uma única administração via oral da formulação teste e da formulação referência do comprimido de 4 mg encontra-se na figura 1. Os cromatogramas dos íons selecionados para glimepirida e tolazamida são apresentados na figura 2. A tabela 2 mostra os

parâmetros farmacocinéticos médios obtidos dos 26 voluntários após a administração oral de cada formulação de glimepirida 4 mg. A tabela 3 apresenta as médias geométricas das razões individuais da ASC_{0-t} , ASC_{0-ult} , $ASC_{0-\infty}$ e C_{max} , os respectivos intervalos de confiança de 90% e poder para a análise de bioequivalência das duas formulações (teste *versus* referência).

DISCUSSÃO

A glimepirida faz parte de uma classe de fármacos considerada segura, tendo a hipoglicemia como efeito adverso mais comum (4). Neste estudo, a segurança demonstrada pela literatura no uso do fármaco foi comprovada pela ausência de eventos adversos relacionados à administração da glimepirida.

Em um estudo de bioequivalência de duas formulações de glimepirida realizado por Song e cols. (4), em 2005, o resultado encontrado para o LQ foi de 10 ng/mL, um valor mais alto do que o encontrado na presente pesquisa. Salem e cols. (10) realizaram, em 2003, um estudo de bioequivalência utilizando como metodologia analítica o HPLC MS/MS encontrando um LQ também mais alto que o encontrado neste estudo: 5.0 ng/ml.

Pérez e cols. (12) realizaram, em 2005, um estudo de validação de método analítico para determinação de glimepirida em plasma humano por meio de HPLC/UV, no qual foi encontrado um tempo de retenção de 4,5 min, ou seja, um tempo muito superior ao 1,60 min encontrado nesta pesquisa.

Pode-se inferir, desta maneira, que o método HPLC MS/MS, descrito aqui para a quantificação da droga, está de acordo com os conceitos de alta sensibilidade e especificidade, como demonstram os estudos supra citados.

O pico das concentrações de glimepirida no plasma de ambas as formulações orais e o T_{max} foram semelhantes àqueles relatados na literatura (10-13).

Existe uma literatura escassa de estudos de bioequivalência de glimepirida realizados com homens e mulheres, pois os relatos apontam a participação de voluntários do sexo masculino (9). Entretanto, a presente pesquisa demonstra que não há diferenças significativas entre os valores estatísticos encontrados na análise paramétrica de homens e mulheres (tabela 2).

Os resultados estatísticos encontrados (tabela 3) indicam que nenhum dos parâmetros usados para determinar a bioequivalência ($ASC_{(0-48h)}$, $ASC_{(0-\infty)}$ e C_{max} e T_{max}) foi significativamente diferente para os dois fármacos (teste e referência).

Como os IC 90% para as razões médias de $ASC_{(0-48h)}$, $ASC_{(0-\infty)}$ e C_{max} estão dentro do intervalo de 80-125% proposto pelo FDA e pela Anvisa, conclui-se que as duas formulações de glimepirida (comprimido de 4 mg) são bioequivalentes, tanto pela extensão quanto pela taxa de sua absorção.

REFERÊNCIAS

1. The prevention of diabetes and its complications. Announcement of a new WHO technical report on the prevention of diabetes and its complications. Available at: <<http://www.who.int/diabetes/preventionflyer/en/>>. Accessed in October 2006.
2. Passos VMA, Barreto SM, Diniz LM, Lins-Costa M. Type 2 diabetes: prevalence and associated factors in a Brazilian community – the Bambuí health and aging study. **São Paulo Med J** 2005;123(2).
3. Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso Brasileiro Sobre Diabetes 2002. **Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2**. Rio de Janeiro: Diagraphic Editora, 2003.
4. Song YK, Maeng JE, Hwang HR, Park JS, Kim BC, Kim JK, et al. Determination of glimepiride in human plasma using semi-microbore high performance liquid chromatography with column-switching. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 2004;810(1):143-9.
5. World Health Organization – WHO. Diabetes Programme – Country and regional data. Available at: <http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index.html>. Accessed in October 2006.
6. PDR Physicians Desk Reference®, 2006.
7. Young EC, Pires MLE, Lima MBC. **Cad Bras Med** 2001;XIV(1-4).
8. UpToDate. Putting clinical information into practice. Available at: <<http://www.uptodate.com>>. Accessed in October 2006.
9. Lee H-W, et al. Bioequivalence of Mepiril tablet to Amaryl tablet (Glimperide 2 mg) by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **J Korean Pharm Sci** 2005;35(4):287-93.
10. Salem II, Idrees J, Al Tamimi JI. Determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Technol Biomed Life Sci** 2004;799(1):103-9.
11. Pistos C, Astraka C, Kalovidouris M, Vassilopoulos E, Koutsopoulou M. Bioequivalence evaluation of two brands of glimepiride 4 mg tablets in healthy subjects. **Int J Clin Pharmacol Ther** 2005;43(4):203-8.
12. Pérez M, et al. Validación del método analítico para la determinación de glimepirida em plasma humano por HPLC/UV com adición de estándar empleando glibenclámda como estándar interno. **Ars Pharm** 2005;46(4):411-27.
13. Dotsikas Y, Kousoulos C, Tsatsou G, Loukas YL. Development of a rapid method for the determination of glimepiride in human plasma using liquid-liquid extraction based on 96-well format micro-tubes and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom** 2005;19(14):2055-61.

Endereço para correspondência:

Ronilson A. Moreno
Rua Dr. Cândido Gomide 38
13070-200 Campinas, SP
Fax: (19) 3236-8014
E-mail: moreno@synchrophar.com