

Jorge José Lima Oliveira

**Métodos Estatísticos Aplicados em Estudos de
Bioequivalência Média**

Trabalho apresentado ao Curso de Graduação
em Estatística da Universidade Federal da Paraíba
como requisito parcial para obtenção do título
Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. João Agnaldo do Nascimento
Área de concentração: Biodisponibilidade e
Bioequivalência Média

**João Pessoa – PB
Maio/2008**

Jorge José Lima Oliveira

**Métodos Estatísticos Aplicados em Estudos de
Bioequivalência Média**

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Agnaldo do Nascimento

Prof. Dr. José Carlos Leite

Prof. Dr. Ulisses Umbelino dos Anjos

Bel. Virna Ligiane Soares Ramos

**João Pessoa – PB
Maio/2008**

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a DEUS o criador dos céus e da terra, por me deu a capacidade de estar aqui, e que apesar das dificuldades estar sempre me guiando.

A minha família, por sempre estarem dispostos a me ajudar e me compreender nesse vasto percurso de minha vida.

Ao Excelente Professor João Agnaldo do Nascimento, por me orientar, e pela dedicação em me ensinar, durante esse tempo acadêmico, e de acreditar na minha capacidade de vencer mais um obstáculo de meu caminho.

Ao Professor José Carlos pelos ensinamentos que me passou, pela amizade que por ele tenho.

Aos meus colegas de sala que sempre se mostraram humildes e que procuraram me ajudar nessa reta de conclusão de minha graduação.

E a todos os professores do Departamento de Estatística, pelos ensinamentos e pelos momentos de aprendizando e conhecimento que me proporcionaram durante este trajeto.

Resumo

A equivalência terapêutica de dois produtos depende diretamente da biodisponibilidade, sendo definida pela quantidade e velocidade pela qual o princípio ativo é absorvido pelo organismo e se torna disponível em seu sítio de ação. Então, duas formulações de uma mesma droga ou duas drogas diferentes, serão consideradas bioequivalentes se suas quantidades e velocidade de absorção não apresentarem diferença estatisticamente significativa, quando administradas à mesma dose molar do princípio ativo, sob as mesmas condições experimentais biodisponibilidade.

Os estudos de bioequivalência são realizados mediante a administração de duas formulações: Teste (T) e Referência (R), em um número de voluntários, geralmente usando-se um planejamento experimental cruzado (*crossover*). Após a retirada de amostras sanguíneas, ao longo do tempo, examina-se as concentrações do fármaco para estudar as medidas farmacocinéticas: área sob a curva da concentração sanguínea (ASC) versus tempo, concentração máxima (C_{max}) e o tempo em que a concentração máxima ocorre (t_{max}).

Portanto, o objetivo deste trabalho é apresentar uma visão de alguns métodos paramétricos e não-paramétricos aplicados em estudos de bioequivalência média para experimentos *crossover* de duas formulações. Para os métodos paramétricos, aborda-se a análise de bioequivalência, considerando-se a medida farmacocinética nas escalas original e logarítmica. Ainda, o poder do teste de schuirmann é estudado, utilizando-se a integração numérica da distribuição t bivariada não-central e também através de um estudo de simulação paramétrica. Baseando-se neste teste, apresenta-se um estudo do tamanho de amostra aproximado para a realização de um experimento *crossover*, considerando-se a medida farmacocinética com ou sem transformação logarítmica.

Abstract

The therapeutic equivalence of two products depends directly on the bioavailability, being defined by the amount and speed by which it begins its action as it is absorbed by the organism and he/she becomes available in its action range. Then, two formulations of a same drug or two different drugs, will be bioequivalents if its amounts and absorption speed don't present difference statistics significant, when administered to the same dose molar of the active principle, under the same conditions experimental bioavailability.

The bioequivalence studies are accomplished by means of the administration of two formulations: Test (T) and Reference (R) in a number of volunteers, generally being used a planning experimental crossover. After the retreat of blood samples, along the time, it is examined the concentrations of the pharmac to study the measured pharmacokinetic: Area Under the curve of the blood concentration versus time (AUC), the maximum Concentration (C_{max}) and the time in that the maximum concentration happens (t_{max}).

Therefore this work it is to present a vision of some parametric and non-parametric methods applied in studies of medium bioavailability for experiments crossover of two formulations. For the parametric methods, the bioavailability analysis is approached, being considered the measured pharmacokinetics in the original and logarithmic scales. Still, the power of the Schirrmann test is studied, being used the numeric integration of the distribution t non-central bivariate and also through a study of parametric simulation. Basing on this test, it comes a study of the approximate sample size for the accomplishment of an experiment crossover, being considered the measured pharmacokinetics with or without logarithmic transformation.

Lista de Tabelas

1 - Alocação aleatória simples de 24 voluntários de um experimento composto Por dois tratamentos R e T.....	25
2 - Resposta do i-ésimo indivíduo em um Planejamento Experimental Crossover 2x2.....	32
3 - Planejamento experimental crossover 4x2 para duas formulações referência e R e teste T.....	36
4 - Planejamento experimental crossover 2x3 para duas formulações referência e R e teste T.....	36
5 - Planejamento experimental crossover 4x4 para duas formulações referência e R e teste T.....	37
6 - Planejamento experimental crossover 2x4 para duas formulações referência e R e teste T.....	37
7 - Planejamento experimental crossover para duas formulações referência e R e teste (T).....	37
8 - Valores das médias das sequências por período para planejamento experiemntal Cossover 2 x 2.....	37
9 - Valores das Médias das sequências por período para planejamento experimental crossover 4 x 4.....	39
10 - Valores das médias das seqüências por período para planejamento experimental 2 x 4.....	40
11 - Quadrado latino para três formulações.....	42
12 - Quadrado latino duas sequências e quatro períodos.....	44
13 - Delinemento Experimentla de Williams para Quatro formulações.....	45
14 - Delienamento experiemntal de Williams três formulações.....	45
15 - Planejamento de experimento balanceado incompleto para 4 formulações e 3 períodos.....	47
16 - Tabela de análise de variância do modelo em (3.1.1) de um delineamento experimental crossover 2 x 2.....	61
17 - ASC para as formulações teste T e referência R.....	69
18 - Médias amostrais para as formulações teste e referência nos períodos 1 e 2 de um planejamento experimental crossover.....	70
19 - Totais e as diferenças individuais dos dados da Tabela 14.....	71
20 - Inferências estatísticas dos efeitos fixos do modelo em (3.1.1).....	72
21 - Análise de variância para ASC em escala original da Tabela 14.....	73
22 - Análise de variância para ASC em escala logarítmica.....	73
23 - Experimento crossover 4x2.....	75
24 - Graus de liberde da tabela ANOVA para um experimento de Balaam.....	76
25 - Experimento crossover 2x3.....	78
26 - Graus de liberdade da tabela ANOVA para um experimento crossover.....	79
27 - Experimento crossover 2x4.....	81
28 - Graus de liberdade da tabela ANOVA para um experimento crossover 2x4.....	82
29 - Experimento crossover 4x4.....	84
30 - Graus de liberdade da tabela ANOVA um experimento crossover 4x4.....	85
31 - Médias de medianas X_{ijk} por sequência e período.....	88
32 - ANOVA para o $\log((C_{max})$	94

33 - Intervalo de Confiança Parametrico para a diferença e razão das médias não-parametrico das formulações R e T utilizando o log(Cmax).....	95
34 – Medida farmacocinética dos indivíduos no medicamento de referência (T).....	96
35 –.Estatística das medidas farmacocinéticas do medicamento T.....	96
36 – Medida farmacocinética dos indivíduos no medicamento de referência (R).....	97
37- Estatística das medidas farmacocinéticas do medicamento R	97
38 - parametros não-paramétricos	98

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE TABELAS.....	6.
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVO.....	13
3 METODOLOGIA	14
3.1 MATERIAL E FONTES DE DADOS.....	15
4 BIOEQUIVALÊNCIA E MEDIDAS FARMACOCINÉTICAS.....	16
4.1 Área Sob a Curva.....	16
4.2 Biodisponibilidade.....	16
4.3 Equivalência Terapêutica.....	16
4.4 Equivalentes Farmacêuticos.....	16
4.5 Medicamentos Bioequivalentes.....	17
4.6 Medicamento referência.....	17
4.7 Medicamento Genérico.....	17
4.8 Medicamento Inovador.....	17
4.9. Medicamento Similar.....	17
4.10 Método trapezoidal.....	18
5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA/BIO DISPONIBILIDADE	20
5.1 Princípio Básico Planejamento Experimental.....	21
5.1.1 Replicação.....	22
5.1.2 Blocagem.....	22
5.1.3 Aleatorização.....	23
5.2 Procedimento de Aleatorização.....	24
5.2.1 Razão de Alocação.....	25
5.2.2 Estratificação.....	26
5.2.3 Blocagem.....	27
5.2.4 Coleta de Dados Longitudinais do Experimento.....	27
5.3 Planejamento Experimental Crossover 2x2.....	28
5.4 Modelo Estatístico e Contrastes Lineares.....	30
5.5 Delineamento Experimental Crossover de Duas Formulações Para a Bioequivalência Média.....	31
5.5.1 Delineamento Experimental Crossover 4x4,2x3; 2x3 e 4x4.....	34
5.5.2 Planejamento Experimental Crossover com Três ou mas Formulações.....	41
5.5.3 Planejamento Experimental Balanceado em Blocos Incompletos.....	45
5.5.4 Planejamento de Experimental Paralelo.....	47
5.5.5 Tamanho da Amostra Para Um Estudo em Bioequivalência.....	48
5.6 Inferência Para os Efeitos dos Modelos dos Experimentos Crossover Para Duas Formulações R e T.....	49
5.6.1 Planejamento Experimental 2x2.....	49
5.6.2 Análise paramétrica.....	50
5.6.2.1 Efeito Residual (carry-over).....	50
5.6.2.2 Efeito Direto da Formulação.....	53
5.6.2.3 Efeito do Período	57
5.6.2.4 Análise de Variância.....	58
5.7 Análise não-paramétrica	63

5.7.1	Análise Estatística na Presença do Efeito Residual (carry-over) Significativo.....	65
5.8	Exemplo ilustrativo dos métodos paramétricos e Não-paramétrico.....	68
5.8.1	Análise paramétrica.....	70
5.8.2	Efeito Residual (carry-over).....	70
5.8.3	Efeito do Período.....	72
5.8.4	Análise de variância.....	72
5.8.5	Análise não-paramétrica.....	73
5.8.6	Efeito Residual (carry-over).....	74
5.8.7	Efeito Direto da Formulação.....	74
5.8.8	Efeito do Período.....	75
5.9	Experimento Crossover de Ordem Superior Para Duas Formulação.....	75
5.9.1	Experimento Crossover 4x2.....	75
5.9.2	Experimento Crossover 2x3.....	78
5.9.3	Experimento Crossover 2x4.....	81
5.9.4	Experimento Crossover 4x4.....	84
5.10	Medidas Farmacocinéticas na escala logarítmica.....	86
5.11	Estimativa de Máxima verossimilhança.....	88
5.12	Estimativa de Média das Formulações.....	91
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
	ANEXOS.....	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114.

1.INTRODUÇÃO

O surgimento dos medicamentos genéricos no mercado brasileiro aumentou a atenção para os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, cujo o objetivo é avaliar a bioequivalência de formulações genéricas e de formulações de medicamentos já existente no mercado.

O estudo de bioequivalência consiste em avaliar a equivalência biológica através da biodisponibilidade, que é representada pela taxa e extensão de um princípio ativo na circulação sistemática. Então duas drogas diferentes ou de duas formulação de uma determinada droga são consideradas bioequivalentes se apresentarem uma mesma ou similar disponibilidade segundo um limite clinicamente especificado, denominado de limite de bioequivalência. De um modo abrangente a bioequivalência é estudada através de medidas de concentração do fármaco presente em líquidos biológicos, como por exemplo sangue e urina, cujas as amostras são coletadas ao longo do tempo, sob as mesmas condições experimentais. Estes dados originais que são empregado nesses ensaios, são dados longitudinais; medidas univariadas, chamadas de medidas farmacocinéticas, que são calculadas apartir dos dados originais. O experimento consiste da retirada de plasma sangüíneos ao longo do tempo, em pontos previamente determinados. A partir desses plasmas, as concentrações do fármaco são processada em laboratórios. Algumas medidas farmacocinéticas são obtidas para a formulações teste (T) e referencia (R), apartir das seguintes curvas de concentrações ao longo do tempo. Basicamente , três medidas são estudadas: a área sobre a curva da concentração versus tempo (ASC), a concentração máxima observada (C_{max}) e o tempo correspondente a concentração máxima (T_{max}).

Mediante a grande variabilidade metabólica presente nos indivíduos em estudo de biodisponibilidade e bioequivalência, os experimentos crossover são geralmente recomendados. Este delineamento experimental apresentam grande vantagem, em termos de precisão estatística e custo, quando comparados com os demais, porque cada individuo serve como seu próprio controle. O planejamento experimental crossover 2 X 2 e o mais simples, sendo composto por dois tratamentos, um teste T e um referencia R, dois períodos e duas

seqüências, RT e TR, permitindo verificar os efeitos do período, seqüência e formulações utilizando hipóteses formuladas, que são avaliadas através teste F.

Nos Estados Unidos, para obtenção do registro junto ao órgão federal de controle de medicamento e Alimentos, a Food and Drug Administration (FDA), os laboratorios farmaceuticos precisam comprovar, através de metodos de laboratoriais e estatísticos, que a formulação testada T é bioequivalente a um determinado medicamento original R, previamente aprovado. O Center for Drug Evaluation and Research (CDER), em 2001, regulamentou como os novos produtos farmaceuticos já aprovados e disponíveis no mercado.

No Brasil, com inicio de pesquisa farmacêuticas com formulações genéricas, a preocupação do governo em regulamentar tais medicamentos aumentou, o que resultou na publicação do Decreto nº. 793, de abril de 1993. com esse decreto, o governo apontou algumas diretrizes para o controle e aprovação dos medicamentos genéricos de interesse no mercado brasileiro. Com a Lei nº. 9782, de 26 de janeiro de 1993, o governo brasileiro instituiu a Agencia Nacional de Vigilância sanitária, ANVISA, cuja função na área de medicamento é aprovar. Registrar, controlar e inspecionar a produção, a comercialização farmacêutica e a existência de uma lei de patente, até 1996, foram as principais causas da existência de multiplicidade de medicamentos que continham o mesmo fármaco, porem estavam sendo comercializados por laboratórios diferentes. Para tais problemas, foi instituída a Lei da política Nacional de Medicamentos Genéricos, Lei nº 9787 de 11 de fevereiro de 1999, que regulamenta a produção, comercialização e uso de medicamentos genéricos. Os laboratórios farmacêuticos interessados em obterem o registro de medicamento genérico junto á ANVISA devem seguir os procedimentos apresentados nas Resoluções de n.ºs 896 e 898, de 29 de maio de 2003 e na Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999, que estabeleceram as bases legais para a instituição do medicamento no país.

O objetivo de um estudo em bioequivalência é verificar se as biodisponibilidade da formulações teste T e referencia R são equivalentes, segundo o limite de bioequivalência aceito.

Existe três tipo de bioequivalência: a bioequivalência média, a populacional e a individual. Sendo atualmente a bioequivalência média a mais empregada em

estudo de bioequivalência para aprovação e obtenção do registro de medicamentos genéricos junto a ANVISA.

A bioequivalência média se restringe apenas em comparar as médias populacionais da medida farmacocinéticas de interesse das formulações teste T e referencia R. No entanto, devido a dificuldade em assegurar a intercambiabilidade das formulações teste T e referencia R para ca individuo, algumas métodos de bioequivalência populacional e individual estão sendo profundamente estudados. Esses métodos de bioequivalência realizam as comparações da médias e das variâncias da medida de biodisponibilidade das formulações teste T e referencia R. a bioequivalencia populacional analisa basicamente a distribuições da medidas farmacocinéticas das formulções R e T. a bioequivalência individual estuda a variabilidade intra-individual das formulações R e T e a interação entre essas formulações, que são testadas para cada individuo.

2.OBJETIVO

2.1 GERAL:

O objetivo geral deste trabalho é realizar um ensaio de bioequivalência média para comparar uma droga padrão (R) com uma droga teste (T).

2.2 ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos são:

- 1) Análise descritiva dos dados farmacocinéticos de uma substância padrão e teste.
- 2) Avaliação do efeito residual (carry-over) e do efeito fixo (período e droga).
- 3) Construção da ANOVA para o ensaio de bioequivalência média em um experimento crossover 2 x 2.
- 4) Avaliação da bioequivalência média através de intervalos ou testes de hipóteses.

3 Metodologia

Introdução: este capítulo apresenta a metodologia utilizada neste trabalho acadêmico, a unidade de análise escolhida para o estudo, a definição das variáveis, e a amostra selecionada da população e a coleta de dados.

O método de pesquisa utilizado foi o descritivo e experimental (Gil, 2000). Utilizou-se uma amostra de 24 indivíduos de uma população finita que estariam antes a participar do estudo para avaliar a Bioequivalência entre um medicamento teste e um medicamento de referência.

A coleta de dados foi obtida com os procedimentos padronizados pela ANVISA para os ensaios de Bioequivalência Média.

O delineamento utilizado foi o experimento cruzado (crossover) 2 x 2, duas drogas e dois períodos. As variáveis utilizadas foram variáveis farmacocinéticas: tempo do pico de concentração máxima (T_{max}), área sobre a curva (ASC), concentração máxima (C_{max}), meia vida ($t_{1/2}$).

Seguindo-se a resolução externa RE nº478 de 19 de Março de 2002, as medidas fundamentais para a determinação da Bioequivalência entre medicamentos é: ASC, C_{max} e T_{max} .

Os valores destas variáveis são obtidas da concentração plasmática, ao longo do tempo de cada avaliação pacientes nas drogas

A análise Estatística da Bioequivalência segundo recomendação da ANVISA sugere as seguintes etapas:

1) Apresentação

P.46 (Manual da ANVISA)

2) Análise descritiva dos dados acima;

3) Avaliação preliminar dos efeitos residuais e dos efeitos fixos;

4) Construção de ANOVA de acordo com o resultado obtido no item 3);

5) Avaliação da bioequivalência através dos intervalos de confiança e testes de hipóteses apropriados;

6) Conclusões do estudo.

3.1. Material e fontes de dado

Os dados coletados para a análise da Bioequivalência foi obtido em um laboratório credenciado pela ANVISA para a realização do ensaio entre uma droga e um medicamento teste. Foram selecionados 24 voluntários que se submeteram ao acompanhamento dos níveis séricos da substância ao longo do tempo e as medições estão apresentadas no ANEXO para a droga referência e a droga teste. A fase do trabalho que necessita de análise estatística é a parte que é abordada neste trabalho e os detalhes clínicos do experimento não serão apreciados.

Por uma questão de ética profissional, foi solicitado que o nome da droga comercial não fosse citada para que o laboratório que gentilmente cedeu os dados cumprisse uma exigência do seu cliente. Também o laboratório solicitou a não divulgação de seu nome, colaborando de forma silenciosa e prestativa com a divulgação da aplicação do estudo de Bioequivalência média.

4 Bloequivalência e Medidas Farmacocinéticas

Em estudo comparativos de biodisponibilidade, para quantificar a extensão e a taxa de absorção de uma determinada droga são utilizadas algumas medidas de interesse, chamadas de medidas farmacocinéticas, sendo representadas pela área sob a curva da concentração versus tempo (ASC), pela concentração máxima (C_{max}) e pelo seu respectivo tempo (T_{max}) correspondente a C_{max} . A estimativa desta medida pode ser obtida a partir das concentrações observada do fármaco em algum líquido biológico, como sangue e urina, cuja as amostras são coletas ao longo do tempo, após a administração do medicamento em cada voluntário.

4.1. Área Sob a Curva (ASC)

A ASC é uma das principais medidas farmacocinéticas, permite medir a quantidade de fármaco absorvido pelo corpo e sua eliminação ao longo do tempo.

4.2 Biodisponibilidade: indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma farmacêutica, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina. (Brasil, 1999)

4.3 Equivalência terapêutica: dois medicamentos são considerados terapeuticamente equivalentes se eles são farmacologicamente equivalentes e, após a administração na mesma dose molar, seus efeitos em relação à eficácia e segurança são essencialmente os mesmos, o que se avalia por meio de estudos de bioequivalência apropriados, ensaios farmacodinâmicos, ensaios clínicos ou estudos *in vitro*. (Brasil, 2003a)

4.4 Equivalentes farmacêuticos: são medicamentos que contém o mesmo fármaco, isto é, mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos. Devem cumprir com as mesmas especificações atualizadas da Farmacopéia Brasileira e, na ausência destas, com a de outros códigos autorizados pela legislação vigente, ou ainda, com outros padrões aplicáveis de qualidade, relacionados à identidade, dosagem, pureza, potência, uniformidade

de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução, quando for o caso. (Brasil, 2003a)

4.5 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 e, portanto, são semelhantes com relação a sua eficácia e inocuidade. (Brasil, 2003a)

4.6 Medicamento de referência: medicamento inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro. (Brasil, 1999)

4.7 Medicamento Genérico: é aquele equivalente terapêutico de um produto de referência (inovador), sendo com este intercambiável, ou seja, apresenta a mesma eficácia clínica e o mesmo potencial de originar efeitos adversos. É geralmente produzido após a renúncia ou expiração da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designada pela Denominação comum brasileira (DCB) ou, na sua ausência, pela Denominação comum internacional (DCI).

4.8 Medicamento inovador: medicamento comercializado no mercado nacional, composto por, pelo menos, um fármaco ativo, sendo que esse fármaco deve ter sido objeto de patente, mesmo já extinta, por parte da empresa responsável por seu desenvolvimento e introdução no mercado do país de origem. Em geral, o medicamento inovador é considerado medicamento de referência, entretanto, na sua ausência, a ANVISA indicará o medicamento referência. (Brasil, 2003a)

4.9 Medicamento similar: aquele que contém o(s) mesmo(s) princípio(s) ativo(s), apresenta a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, preventiva ou diagnóstica e que é equivalente ao medicamento registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca. (Redação dada pela MP 2.190-34, de 23 de agosto de 2001)

4.10 Método Trapezoidal(Yeh e Kwan ,1978) para estimação da ASC.

O método trapezoidal emprega a interpolação linear, entretanto a estimativa da ASC pode ser subestimada ou superestimada, dependendo da concavidade da curva e, principalmente da amplitude dos intervalos. Este método tem sido o mais divulgado para estimação da ASC em estudo de biodisponibilidade devido à sua simplicidade e está a disposição nos pacotes computacionais.

Consideremos C_0, C_1, \dots, C_k como sendo as concentrações sanguíneas obtidas nos tempo t_0, t_1, \dots, t_k respectivamente. Assim empregando o método da regra trapezoidal, para cada um dos intervalos, $[t_0, t_1], \dots, [t_{k-1}, t_k]$, emprega-se a interpolação linear para cada concentração observada, ou seja, ajusta-se uma reta para pontos (t_{i-1}, C_{i-1}) e (t_i, C_i) , como mostramos embaixo.

$$C = \frac{t_i C_{i-1} - C_{i-1} t_i}{h_i} + \frac{C_{i-1} - C_i}{h_i} t_i, \text{ onde } t \in [t_{i-1}, t_i] \text{ e } h_i = t_i - t_{i-1} \quad (1)$$

A integração da reta C em (1), de t_{i-1} a t_i , fornece a região da área sob a reta neste intervalo, o que é equivalente a área dada por um trapézio delimitados pelos pontos (t_{i-1}, C_{i-1}) e (t_i, C_i) . portanto a ASC do intervalo $[t_0, t_k]$ (ASC_{tk}) pode ser estimada através da soma das áreas dos trapézios formados pelos pontos dos intervalos, ou seja por

$$ASC_{tk} = \sum^k \left(\frac{C_i + C_{i-1}}{2} \right) (t_i - t_{i-1}), \quad (2)$$

Existe outras medidas farmacocinéticas que podem ser utilizadas no estudo de biodisponibilidade como: concentração máxima do fármaco C_{max} e tempo T_{max} correspondente a C_{max} .

A estimativa da ASC do intervalo de zero a infinito $[0 - \infty]$, denotada por (ASC_{∞}) pode ser obtida por:

$$ASC_{\infty} = ASC_{tk} + \frac{C_k}{k_{el}}, \quad (3)$$

onde C_k é a concentração da ultima amostra e k_{el} representa a taxa de eliminação da droga, cuja a estimativa pode ser obtida através do coeficiente angular do modelo de regressão linear de mínimos quadrados dos logaritmos naturais das ultimas 4 a 6 concentrações, multiplicado por -1 . observe se a

última concentração for não-quantitativa, então a estimativa (ASC_{∞}) será igual a ASC_{tk} .

O pico de concentração máxima C_{max} do fármaco e o tempo para atingir este pico T_{max} devem ser obtidos diretamente da curva da concentração sanguínea do fármaco versus tempo, sem a interpolação dos dados.

A outra medida farmacocinética importante é o tempo de meia-vida de eliminação do fármaco $t_{1/2}$, que determina o tempo em que a concentração de um determinado medicamento diminui em cerca de 50% na circulação sanguínea. Por este motivo, recomenda-se que o cronograma de coleta das amostras deve contemplar um tempo igual ou superior a 3 a 5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco. Procedendo assim, a estimativa da ASC_{tk} , pode ser igual ou superior a 80% da (ASC_{∞}). Considerando que a taxa de decaimento da concentração do fármaco ao longo do tempo passa ser obtida através de uma equação diferencial de primeira ordem, em tem-se:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{el} C \quad (4)$$

onde C é a concentração da formulação e k_{el} representa a taxa de eliminação da droga. Integrando a equação diferencial, tem-se:

$$\int_{C_0}^C \frac{dC}{C} = -k_{el} \int_0^t dt \Rightarrow \ln C / C_0 = -k_{el} t / t_0 \Rightarrow \ln C - \ln C_0 = -k_{el} t$$

Como $t = t_{1/2}$ e $C = C_0/2$, tem-se

$$\ln\left(\frac{C_0}{2}\right) - \ln C_0 = \ln C_0 = -k_{el} t_{1/2} \Rightarrow t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}} \quad (5)$$

onde k_{el} é a taxa de eliminação do fármaco.

5. Planejamento Experimental Para Estudo de Bioequivalência/biodisponibilidade

os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência são realizados através de planejamentos planejados, que tem por objetivo fornecer informações das biodisponibilidade das formulações testadas, as quais são administradas em uma amostra de voluntário. Para a realização de um estudo experimental, é necessário o uso de um protocolo experimental, onde são detalhadas todos os procedimentos e considerações utilizados durante o experimento: os objetivos do estudo, os critérios adotados na seleção e exclusão de voluntários, as características e as formas de dosagem das formulações testadas, a escolha do delineamento experimental, a metodologia empregada na coleta e na análise laboratoriais das amostras e os métodos estatísticos empregados na análise das biodisponibilidades.

O objetivo de um estudo de bioequivalência é avaliar a bioequivalência das formulações teste T e referencia R de um produto farmacêutico através de suas biodisponibilidades observadas, segundo limites clinicamente aceitáveis.

Uma característica da maior parte dos estudos de bioequivalência é o emprego de voluntários sadios em seus experimentos. Como existe uma grande variabilidade metabólica presente nos indivíduos, é importante escolher os critérios adequados para manter a homogeneidade das características do grupo de indivíduos participantes do experimento. Por exemplo, devem se considerados o sexo, idade, peso, os hábito alimentares, estado de saúde, devendo ser excluídos os voluntários que apresentarem alergia ao fármaco, que estão com tratamento em andamento ou que apresentarem qualquer tipo de dependência de droga como álcool, tabagismos e outros. Durante os experimentos, os voluntários devem se submetidos às mesmas condições experimentais durante todo o experimento, ou seja, com uma dieta semelhante, por exemplo, com uma mesma quantidade de líquidos e alimentos, e com um mesmo período de jejum.

Os critérios aprovados pela Agencia Nacional de Vigilância sanitária(ANVISA) para etapas clinicas de um estudo de bioequivalência de medicamentos genéricos estão presentes na Resolução nº 896 de maio de 2003. essas etapas clinica compreende desde a seleção dos voluntários até a alta

hospitalar e o último retorno para o acompanhamento, sendo caracterizadas pela administração dos medicamentos teste e referência em um grupo de voluntários sadios, previamente selecionados, de acordo com a lista de randomização estabelecida, seguindo a coleta das amostras de líquidos biológicos (sangue, na maioria dos casos) (Jatene et al, 2002) que são os seguintes:

i) os voluntários participantes do experimento devem ser sadios, ter idade entre 18 a 50 anos e consciente do objeto de estudo;

ii) os experimentos clínicos devem ser conduzidos com voluntários do sexo masculino, feminino ou ambos os sexos, sendo que no último caso, o número de mulheres e homens deverá ser igual.

iii) Os pesos dos indivíduos deverão estar em um limite $\pm 15\%$ do peso normal para homens e mulheres, considerando a altura e a estrutura física de cada um;

iv) Deve-se evitar indivíduos fumantes, em tratamento com outro medicamento ou com histórico de abuso de álcool ou droga. Caso sejam incluídos, estes voluntários deverão estar devidamente identificados.

v) Os voluntários participantes do estudo experimental que necessitam de confinamento devem permanecer em lugar apropriado, sob a supervisão de um médico.

vi) Nos estudos em que são necessários voluntários com características diferentes das citadas acima, a inclusão deverá ser justificada cientificamente.

5.1 Princípios Básicos de um Planejamento Experimental

A metodologia no delineamento experimental e na análise de experimento é usualmente creditada a Fisher (1935), pois quem primeiro introduziu o princípio da aleatorização e da análise de variância, sendo inicialmente aplicadas em planejamentos de experimentos agrícolas, desde então, vem tendo grande sucesso na análise de experimentos, embora a metodologia continue é essencialmente a mesma. E contém três princípios básicos que são: replicação, blocagem e aleatorização.

5.1.1 Replicação

para obter uma precisão adequada na análise do experimento, é necessário que o experimento possua um certo número de unidade experimental, isto é, algumas unidades amostrais alocadas ao tratamento testado. Em estudo de bioequivalência, cada unidade experimental é representado por um voluntário. O uso da replicação no planejamento de um experimento de bioequivalência consiste em administrar as formulações testadas mais de uma vez, em períodos diferentes de tratamento, ou seja, existe repetições de uma ou mais formulações para cada um dos voluntários. Portanto, a realização de um experimento de bioequivalência com um número adequado de replicações dos tratamentos administrados possibilita estimar a variabilidade metabólica presente nos indivíduos. Com o aumento do número de indivíduos no experimento, aumenta-se a precisão no teste de bioequivalência. Na comparação das médias de dois grupos de tratamentos independentes, por exemplo, quando maior for o tamanho de ambas as amostras, maior serão os graus de liberdade no teste t, o que aumenta a eficiência e sensibilidade deste testes.

5.1.2 Blocagem

Para controlar alguma fontes de variação conhecidas ou suspeitas de um experimento, pode-se empregar a blocagem, que consiste em dividir cada experimento, segundo alguns fatores de blocagem, em subgrupos relativamente homogêneos, denominados de bloco. Como os voluntários participantes dos experimentos de bioequivalência apresentam uma grande variabilidade metabólica, os blocos podem ser representados por cada individuo. O interesse não está em estudar o efeito desta fonte de variação já conhecida, mas sim em controlá-la, devido ao metabolismo dos voluntários. Se alguma fonte de variação existirem, então uma metodologia de blocagem bem planejada, combina a uma análise de estatística apropriada, permite que as variações causadas por essas fontes possam ser identificadas e removidas do erro experimental, aumentando a precisão dos testes estatísticos. Frequentemente, utiliza-se sexo, idade ou peso dos voluntários como fatores de blocagem para realização de um experimento.

5.1.3 Aleatorização

A aleatorização dos voluntários aos grupos de tratamento desempenha um importante papel na validade os resultados obtidos através da realização de um estudo experimental.

O termo aleatorização significa que cada um dos indivíduos participante do experimento são designados a um ou mas tratamentos de forma aleatória, isto é, casualmente. Por exemplo, cada um dos voluntários tem a mesma chance de ser escolhido e alocado a um dos grupos de tratamentos disponíveis. Este método alocação, não intencional, não promove o benefício de determinado tratamento.

Existe, basicamente três razões para aplicar a aleatorização em um estudo experimental. Primeiramente, a aplicação da aleatorização proporciona uma certa homogeneidade nos grupos em que são administrados os tratamentos, pois a aleatorização remove algumas fontes de variação relacionada e algumas características dos voluntários. Durante a realização de um experimento, estas características, denominadas também por covariáveis, podem ser, por exemplo, peso, idade, sexo ou condição física dos indivíduos.

A segunda razão para o uso da aleatorização em experimento está relacionado a validação dos resultados obtidos pelo experimento para que uma inferência estatísticas possa ser aplicada aos resultados do experimento e as conclusões expandidas para uma população. É importante lenbra que experimentos são realizados apenas com uma amostra de indivíduos proveniente de uma determinada população de interesse.

O terceiro ponto, refere-se a aleatorização como um método eficiente no mascaramento das identidades dos tratamentos administrados aos voluntários, pois isto evita possíveis vícios na alocação dos indivíduos e na condução do experimento. Por exemplo, em ensaios clínicos aleatorizados duplamente cegos, os voluntários não tem conhecimento das formulações que recebem e os profissionais de saúde envolvidos também desconhecem as formulações que administraram durante o experimento, pois as formulações são devidamente codificadas. No entanto, existem também os ensaios clínicos aleatorizados cegos simples, este experimento consiste na administração das formulações aos voluntários, porem estes desconhecem o tratamento oferecido. A possibilidade

de distinguir os tratamentos administrados aos voluntários evita que alguns aspectos psicológicos possam interferir e mascarar os efeitos das formulações testadas.

Uma vantagem adicional no emprego da aleatorização está relacionada a credibilidade dos resultados obtidos por estudo experimental que incorpora algum método de aleatorização em seu planejamento para alocação dos voluntários aos tratamentos disponíveis. Por isso, a ausência da aleatorização diminui a credibilidade e levanta suspeita acerca de alguma conclusão. Kunz e Oxman (1998) apostaram que o resultado obtido por ensaios clínicos não-aleatorizados podem não ser reproduzidos através de ensaios clínicos aleatorizados. Portanto, a presença de vícios de seleção pode superestimar ou subestimar alguns resultados do experimento.

5.2 Procedimento de Aleatorização

Quando o interessado está em alocar, com a mesma probabilidade de alocação, os n voluntários aos t tratamentos, utiliza-se aleatorização fixa. Estas probabilidades de alocação permanecem inalteradas durante todo o procedimento de aleatorização dos voluntários aos grupos de tratamentos.

Em sua versão mais simples, a aleatorização fixa em um estudo experimental consiste, por exemplo, em alocar uma amostra de n voluntários aos dois tratamentos teste T e referência R , com as mesmas possibilidades de alocação ($P_T = P_R$). Este procedimento de aleatorização pode ser facilmente realizado através de uma tabela de números aleatórios, disponíveis em vários livros, ou com o uso de algum programa estatístico. Por exemplo, utiliza-se a tabela de números aleatórios, pode-se alocar os n voluntários aos grupos de tratamento R e T levando em conta os seguintes critérios:

i) se o número aleatório é par, aloca-se o i -ésimo indivíduo ao tratamento R , se for ímpar aloca-se o i -ésimo indivíduo ao tratamento T .

Existem outros métodos de alocação de n voluntários aos t tratamentos de um estudo experimental. A aleatorização pode ser realizada utilizando uma razão de alocação e a estratificação ou a blocagem.

5.2.1 Razão de alocação

O uso da razão de alocação nos procedimentos aleatorizados é freqüentemente aplicada, por exemplo, nos casos em que a diferença nos custos da realização do experimento com grupos de tratamento de mesmo número é grande ou quando os tratamentos estudados possuem níveis de toxicidade

Tabela 1: Alocação aleatória simples de 24 voluntários de um experimento composto por dois tratamentos R e T.

indivíduo	Número Aleatório	Tratamento Alocado	indivíduo	Número Aleatório	Tratamento Alocado
1	5	T	13	0	R
2	3	T	14	2	R
3	4	R	15	3	T
4	7	T	16	9	T
5	9	T	17	9	T
6	9	T	18	7	T
7	7	T	19	7	T
8	3	T	20	6	R
9	4	R	21	3	T
10	4	R	22	0	R
11	6	R	23	1	T
12	6	R	24	7	T

tratamento alocado	número de voluntários
R	9
T	15

O procedimento mais comum de alocação utilizada é a proporcional ou uniforme, onde as probabilidades de alocação são iguais durante todo o processo de alocação dos n voluntários aos t tratamentos do experimento, isto é, $p_1=p_2=\dots=p_t$ e $\sum_{i=1}^t p_i = 1$. Porém, se existir no mínimo uma probabilidade diferente das demais e $\sum_{i=1}^t p_i = 1$, então alocação deste planejamento experimental é desproporcional ou não-uniforme.

A alocação de n indivíduos aos t tratamentos de um estudo experimental pode ser expressa através da razão r_i de voluntários alocados ao tratamento i . portanto, as probabilidades p_i de alocação aos tratamentos são escolhidas afim de fornecer um número esperado de dados próximo da razão desejada. Geralmente, utiliza-se a alocação uniforme, pois fornece um experimento balanceado, onde cada grupo de tratamento possui o mesmo número de indivíduos alocados.

Por exemplo, considere um estudo experimental realizados com n voluntários e dois tratamentos R e T. portanto, considerando a razão de alocação 1:2 para os tratamentos R e T, tem-se uma proporção dos dois voluntários alocados ao tratamento T para cada voluntário alocado ao tratamento

5.2.2 Estratificação

Quando o interesse está em estudar as influências de algumas covariáveis, por exemplo, sexo ou idade dos voluntários, nos resultados do experimento, pode-se utilizar a estratificação. Esta metodologia consiste em dividir, segundo as covariáveis de interesse, o número de voluntários do estudo experimental em grupos menores, denominados de estratos. Além de possibilitar o estudo das influências das covariáveis nas respostas dos indivíduos, a estratificação também pode aumentar a precisão do experimento com redução da variabilidade devido às covariáveis estratificadoras.

Considere, por exemplo, o sexo e a idade dos voluntários como covariáveis estratificadas. Desta forma, os n voluntários podem ser classificados segundo a covariáveis sexo em dois estratos: homem e mulheres. Cada um desses estratos também pode ser estratificado de acordo com os três níveis da covariáveis idade (menores de 45 anos, de 45 a 55 anos e maior de 55 anos). Portanto os n indivíduos formam 6 estratos, cada um com uma categoria da covariável sexo (M e F) e um nível de covariáveis idade (menores de 45, de 45 a 55 anos e maiores de 55 anos). Nesse caso, a alocação dos voluntários aos tratamentos é realizada dentro de cada um dos estratos utilizando-se algum método de aleatorização, por exemplo a aleatorização simples. Note que a estratificação pode se tornar complexa se existir um número grande de covariáveis estratificadas com vários níveis ou categorias. Em termos gerais, um estudo experimental com c covariáveis estratificada e cada uma delas com l_i níveis, formam l_1, l_2, \dots, l_c estratos. Nestes casos, pode haver formação de estratos com número reduzidos de representantes e, conseqüentemente, formar estudos experimentais não-balanceados.

5.2.3 Blocagem

Os estudos experimentais realizados para análise de bioequivalência geralmente utilizam a blocagem para remoção da variabilidade metabólica inter-indivíduos da análise estatística, pois a precisão das comparações entre os tratamentos é determinada pela variabilidade dentro os blocos. Portanto, a blocagem também pode ser associada a alguma metodologia de aleatorização. Nestes experimentos, aplica-se uma aleatorização restrita, ou seja, aleatoriza-se apenas dentro de cada um dos blocos formados.

A aleatorização também pode ser apresentar alguns entraves quando é aplicada em alguns estudos experimentais, pois um dilema fundamental pode surgir do conflito existente entre a alocação aleatória dos voluntários e os princípios da ética médica. Isto ocorre, principalmente, nos casos em que um determinado tratamento é reconhecidamente melhor e pode ser decisivo na saúde dos voluntários. Outro exemplo está relacionado ao desenvolvimento de novas drogas, cujos os efeitos colaterais são desconhecidos e podem levar à morte dos voluntários. Diante destas limitações, Meinert e Tonascia (1986) aconselhou que ensaios clínicos não devem ser conduzidos, a menos que seja eticamente comprovado.

5.2.4 Coleta dos Dados Longitudinais do Experimento

Após a administração do fármaco aos voluntários, as amostras de algum líquido biológico, por exemplo, sangue ou urina, são coletadas ao longo do tempo, sob as mesmas condições experimentais paratodos os voluntários do estudo experimental. A partir dessa amostra, as concentrações do fármaco, para cada um dos voluntários, são processadas em laboratório.

Alguns estudos experimentais pilotos podem ser realizados com alguns voluntários para determinar previamente os tempos experimentais que devem ser utilizados durante a execução do experimento. Outra forma de determinar os tempos experimentais é através de referências sobre a formulação R. Pontonto, apartir dos tempos observados da concentração máxima dos estudos pilotos, pode-se determinar o cronograma dos tempos experimentais em que as amostras dos indivíduos devem se coletadas durante a realização do estudo

experimental. O planejamento dos tempos experimentais possibilita uma melhor estimativa das medidas farmacocinéticas: C_{max} e T_{max} . Através da Resolução nº 896, a ANVISA determinou que o cronograma de coleta das amostras devem ser iguais, ou superior a 3 – 5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco ou do metabólico.

É conveniente ressaltar que os tempos amostrais, utilizados em um estudo experimental de bioequivalência, não precisam ser necessariamente os mesmos, porém é importante manter os mesmos tempos experimentais, para os tempos próximos ao pico da concentração máxima das formulações testadas.

5.3 Planejamento Experimental Crossover

Os planejamentos experimentais crossover são geralmente recomendados aos estudos de bioequivalência, pois existe uma grande variabilidade metabólica presentes nos voluntários participantes deste experimentos. Os estudos experimentais crossover possuem grande vantagem, em termos de precisão estatística e custos, quando comparados com experimentos completamente aleatorizados.

Um planejamento experimental crossover é uma modificação do planejamento de experimentos aleatorizados em blocos, onde cada bloco recebe mais de uma formulação da droga em diferentes períodos de tratamento. Nestes experimentos, o bloco pode ser um indivíduo ou um grupo de indivíduos homogêneos. Estes experimentos clínicos consiste em alocar, segundo uma técnica de aleatorização, os voluntários e as sequências das formulações. Um planejamento experimental é denominado decrossover completo se cada uma das sequências contém todas as formulações testadas. Não é necessário que o número de formulações em cada sequência seja maior ou igual ao número de formulações testadas em um experimento crossover. O delineamento experimental crossover composto por g sequências administradas em p períodos de tratamento e denominada de experimento crossover $g \times p$.

Como os voluntários de um experimento crossover são utilizados como seus próprios controles, estes experimentos são capazes de identificar e remover a variabilidade inter-indivíduos, e conseqüentemente, aumenta a precisão da análise estatística das biodisponibilidades das formulações. Com a redução da

variabilidade proporcionada pelo uso de um experimento crossover, é necessário um tamanho de amostra inferior ao planejamento paralelo para obtenção de uma mesma precisão, o que pode reduzir o custo para a realização do estudo experimental.

Os períodos de administração das formulações de um experimento crossover são usualmente separados por períodos de washout, ou seja, um período para eliminação da formulação administrada no período de tratamento anterior. Durante o período de washout deve ser de no mínimo, sete meias-vidas de eliminação do fármaco ou do metabólico, segundo a Resolução nº 896 da ANVISA. Estes períodos de washout deve ser de longo e suficiente para que os efeitos de carry-over ou residuais da droga administrada no período anterior sejam completamente eliminados.

Se a droga possui um tempo de meia-vida muito longo ou se o período de washout entre os tratamentos foi insuficiente, o efeito da droga pode persistir mesmo depois do final do período de tratamento. Neste caso, é necessário distinguir a diferença existente entre o efeito direto da droga e o efeito de carry-over, ou seja residual. O efeito direto da droga é o efeito apresentado durante o período que a mesma é administrada. O efeito de carry-over é o efeito da droga que persiste mesmo após o término do seu período de tratamento. Se o efeito carry-over permanecer por apenas um período de tratamento é chamado de efeito carry-over de primeira ordem.

Então, se o efeito de carry-over de uma determinada droga persistir por até c períodos de tratamento, é dito que esta droga possui um efeito carry-over de c -ésima ordem. No entanto, em estudo de bioequivalência e biodisponibilidade, é improvável que o efeito de carry-over de uma determinada droga exista por mais de um período de tratamento desde que seja considerado um período de washout suficiente para eliminação da droga. A presença dos efeitos carry-over nas medidas farmacocinéticas é a principal desvantagem dos experimentos crossover em estudo de bioequivalência.

5.4 Modelo Estatístico e Contrastes Lineares

Considerando o seguinte modelo estatístico para um experimento crossover realizado para testar f formulações, que formam g sequências administrada em p períodos de tratamentos:

$$y_{ijk} = \mu + s_{ik} + p_j + f_{(j,k)} + c_{(j-1,k)} + e_{ijk} \quad (2.2.1)$$

onde y_{ijk} representa a variável resposta de alguma medida farmacocinética, por exemplo a ASC ou C_{\max} do i -ésimo indivíduo no j -ésimo período e na k -ésima sequência, para $i = 1, 2, \dots, n_k$, $j = 1, 2, \dots, p$ e $k = 1, 1, \dots, g$;

μ representa a média geral;

s_{ik} é o efeito aleatório do i -ésimo indivíduo na k -ésima sequência, para $i = 1, 2, \dots, n_k$, e $k = 1, 1, \dots, g$;

p_j representa o efeito do j -ésimo período, para $j = 1, 2, \dots, p$ e

$$\sum_{j=1}^p p_j = 0;$$

$f_{(j,k)}$ é o efeito direto da formulação administrada no j -ésimo período, na k -ésima sequência tal que $\sum f_{(j,k)} = 0$.

$c_{(j-1,k)}$ representa o efeito residual do $(j - 1)$ -ésimo período para o j -ésimo período na k -ésima sequência, sendo que $c_{(0,k)} = 0$ e $\sum c_{(j-1,k)} = 0$.

e_{ijk} é o erro aleatório do i -ésimo indivíduo, no j -ésimo período e na k -ésima sequência;

assume-se que s_{ik} e e_{ijk} são variáveis aleatórias independentes com média iguais a zero e variância iguais a e_s^2 e e_t^2 , onde $t = 1, 2, \dots, f$. a estimativa de e_s^2 é utilizada para qualificar a variabilidade inter-indivíduos, enquanto que a estimativa de e_t^2 é usada para avaliar a variabilidade intra-indivíduos para a t -ésima formulação.

A análise de um modelo estatístico pode ser realizado através de contrastes lineares, ou seja, de combinações lineares. Por exemplo, a combinação linear, $c_1F_1+c_2F_2+\dots+c_fF_f$, onde $c_1+c_2+\dots+c_f = 0$, é um contraste. Um contraste linear, $c_1F_1+c_2F_2+\dots+c_fF_f$, é ortogonal a outro $d_1F_1+d_2F_2+\dots+d_fF_f$, se a soma do produto de seus coeficiente é nula, isto é, $c_1d_1+c_2d_2+\dots+c_fd_f = 0$. Portanto, para três formulações, tem-se que o conjunto de contrastes $F_2 - F_1$ e $2F_3 - F_1$ são ortogonais entre si. Em geral, pode-se escrever $f - 1$ contrastes ortogonais para cada um experimento de f formulações.

Um contraste linear dentro dos indivíduos, para k -ésima seqüência pode ser escrito como combinação linear das médias dos períodos, $\bar{y}_{.1k}, \bar{y}_{.2k}, \dots, \bar{y}_{.pk}$, como mostrado abaixo:

$$c = c_1\bar{Y}_{.1k} + c_2\bar{Y}_{.2k} + \dots + c_p\bar{Y}_{.pk},$$

onde $\bar{Y}_{.jk} = \frac{\sum_{i=1}^{nk} Y_{ijk}}{nk}$, $k = 1, 2, \dots, g$; $j = 1, 2, \dots, p$ e $\sum_{j=1}^p c_j = 0$.

Note que a variância de c envolve apenas a variabilidade intra-indivíduos usando-se os contrastes lineares das médias.

5.5 Delineamento Experimental Crossover de Duas Formulações para Bioequivalência Média.

A versão mais simples de experimentos crossover para duas formulações, uma teste T e outra referência R, é o experimento crossover 2 x 2. este experimento é composto por duas seqüências (RT e TR) e dois períodos de tratamentos (I e II). Em estudo de bioequivalência, os experimentos crossover são realizados com amostra de $n_1 + n_2$ voluntários, geralmente sadios, que são alocados aleatoriamente a uma das seqüências de tratamento (n_1 para seqüência RT e n_2 para TR). Por exemplo, metade dos indivíduos alocados à seqüência RT recebem primeiramente a formulação R durante o primeiro período e a segunda recebe a formulação T, no segundo período de tratamento, enquanto que as demais seguem o mesmo procedimento para a segunda

sequência, TR. Os períodos são, usualmente, separados por períodos de washout que corresponde, no mínimo de 3 a 7 meia-vidas do princípio ativo da droga testada. Este período deve ser longo e suficiente para que os efeitos residuais da droga administrada no primeiro período sejam completamente eliminados.

A partir do modelo estatístico em (2.2.1), obtem-se as respostas apresentadas na tabela abaixo para o i -ésimo indivíduo nas sequências 1 e 2 de um experimento crossover 2x2.

Tabela 2: Resposta do i -ésimo indivíduo em um planejamento Experimental Crossover 2x2.

Seqência	período I	período II
1(RT)	$Y_{i11} = \mu + S_{i1} + P_1 + F_R + e_{i11}$	$Y_{i21} = \mu + S_{i1} + P_2 + F_T + C_R + e_{i11}$
2(TR)	$Y_{i12} = \mu + S_{i2} + P_1 + F_T + e_{i12}$	$Y_{i22} = \mu + S_{i2} + P_2 + F_R + C_T + e_{i22}$

Onde $P_1 + P_2 = 0$; $F_R + F_T = 0$ e $C_R + C_T = 0$.

Cada voluntário do planejamento de experimento crossover 2 x 2 possui um par de observações que corresponde alguma medida farmacocinética, por exemplo a ASC ou C_{max} , as quais são observadas nos períodos 1 e 2. Este par de observações (período 1, período 2) pode ser representado pelo vetor aleatório bivariado.

$$Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k \quad \text{e} \quad k = 1, 2. \quad (2.2.2)$$

Como os vetores aleatório bivariados são independentes, tem-se que vetor de médias e a matriz de covariância para sequência 1 são

$$\mu_{RT} = \begin{pmatrix} \mu + P_1 + F_R \\ \mu + P_2 + F_T + C_R \end{pmatrix} \quad \text{e} \quad \Sigma_{RT} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

Com relação a sequência 2, obtém-se o vetor de médias de covariância, que apresentamos abaixo.

$$\mu_{TR} = \begin{pmatrix} \mu + P_1 + F_T \\ \mu + P_2 + F_R + C_T \end{pmatrix} \text{ e } \Sigma_{TR} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

Como a variabilidade intraíndivíduos das formulações T e R, denotadas respectivamente por σ_T^2 e σ_R^2 , não podem ser estimadas neste planejamento experimental, é necessário utilizar a pressuposição de que $\sigma_T^2 = \sigma_R^2 = \sigma_e^2$.

Assim, obtém-se que $\Sigma_{TR} = \Sigma_{RT} = \Sigma$, onde

$$\Sigma_{TR} = \begin{pmatrix} \sigma_e^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_e^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

Em um experimento crossover 2 x 2, existe três grau de liberdade, que estão associados às quatro médias de sequência por período, sendo um grau de liberdade para o efeito de sequência, um para o efeito do período e um para a interação entre sequência e período, que é o efeito direto da formulação quando o efeito carry-over não é significativo no modelo. No entanto, na presença de efeito carry-over, este experimento possui as seguintes desvantagens:

- i) o efeito da sequência não pode ser estimado separadamente, devido ao confundimento com o efeito de carry-over;
- ii) não existe estimativa não-viciada para o efeito direto da formulação;
- iii) não é possível determinar as estimativas das variabilidade intra-indivíduos para as duas formulações σ_T^2 e σ_R^2 (pois não há replicações de cada formulação para cada um dos indivíduos)

Devido a estas limitações do planejamento de experimento crossover 2 x 2 em estudo de bioequivalência, alguns outros delineamentos experimentais

podem ser considerados, por exemplo, os planejamentos experimentais crossover de ordem superior. Estes delineamentos são assim determinados porque possui um número de períodos ou de sequências, superior ao número de formulações testadas.

Mostraremos a seguir alguns planejamentos de experimento crossover de ordem superior, que poder ser utilizados em estudos de bioequivalência e biodisponibilidade.

5.5.1 Delineamento Experimental Crossover 4 x 2; 2 x 3; 2 x 4 e 4 x 4.

Estes planejamentos de experimentos também são chamados de planejamento de experimento crossover replicado, pois pelo menos uma das formulações é replicada em cada um dos voluntários participante do estudo. Conforme a Resolução nº 896, de 29 de maio de 2003, a ANVISA recomenda o emprego desse estudo experimentais quando as variabilidade dos fármacos for alta, ou seja, quando o coeficiente de variação (CV), dado por $CV = \sigma_e / \mu_R$, for maior ou igual a 30%, incluindo aqueles que são de liberação imediata, liberação modificada e outros produtos de administração oral.

Considere o seguinte modelo para um planejamento de experimento crossover de ordem superior:

$$Y_{ijk} = \mu + G_{ik} + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk} \quad (2.2.3)$$

onde $Y_{ijk}, \mu, P_j, F_{(j,k)}, S_{ik}$ e e_{ijk} para $i = 1, 2, \dots, n_k$, $k = 1, 2, \dots, g$ e $j = 1, 2, \dots, p$ são definidos como no modelo em (2.2.1) da seção 2.2.1, com acrescimo de G_k , que é o efeito fixo da k-ésima sequência, em que $k = 1, 2, \dots, g$ e $G_1 + G_2 + \dots + G_g = 0$.

A diferença do modelo em (2.2.1) para um planejamento crossover 2 x 2, do modelo em (2.2.3), para delineamento experimental crossover de ordem superior, possui o efeito de sequência G_k . Portanto, estes experimentos permitem testar o efeito da sequência, que também pode ser utilizado para

avaliar o sucesso no processo de aleatorização dos voluntários às k sequências de formulações.

Basicamente, existem quatro delineamentos experimentais crossover de ordem superior que são frequentemente aplicados em estudos de bioequivalência com duas formulações: T e R. Estes planejamentos experimentais estão apresentados na tabela (2.2.3). Como as estimativas do efeito direto da formulação e do efeito carry-over são obtidas através dos contrastes lineares intra-indivíduos, as inferências estatísticas para análise destes experimentos são realizadas através da variabilidade intra-indivíduo σ_e^2 .

O delineamento experimental A, também conhecido como planejamento de experimento de Balaam (1968), é um dos mais eficiente na classe dos delineamentos experimentais crossover com dois períodos e duas formulações. Estes planejamentos consiste em adicionar mais duas sequências RR e TT às sequências de um delineamento experimental crossover 2×2 . desta forma, obtém-se um experimento composto por quatro sequências: RT, TR, RR e TT. As replicações das formulações, devido as novas sequências RR e TT, permite a estimação das variabilidades intra-indivíduos para as formulações R e T. além disso, o efeito carry-over também pode ser estimado utilizando os contrastes lineares intra-indivíduos.

Cada voluntário do planejamento de experimento crossover 2×2 fornece um par de alguma medida farmacocinética, por exemplo, de ASC para os períodos 1 e 2. Portanto, considere o vetor aleatório bivariado da medida observada.

$$Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k})' \quad i = 1, 2, \dots, n_k \text{ e } k = 1, 2, 3 \text{ e } 4. \quad (2.2.4)$$

os valores esperados das médias das sequências por período $\bar{Y}_{.jk} = \frac{1}{nk} \sum_{i=1}^{n_k}$, $j =$

1, 2; $k = 1, 2, 3$ e 4 do modelo em (2.2.3) do experimento A, estão apresentados na tabela (falta o n^o da tab). As matrizes de variância-covariância do vetor aleatório bivariado Y_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2, 3$ e 4, para as sequências 1, 2, 3 e 4, são respectivamente iguais a

$$\Sigma_{TT} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 \\ \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}; \quad \Sigma_{RT} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}..$$

$$\Sigma_{RR} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 \\ \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}; \quad \Sigma_{TR} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

O planejamento de experimento B é um planejamento de experimento crossover com duas sequências, três períodos e duas formulações. Este delineamento experimental é constituído pela adição de um período no experimento crossover 2 x 2. desta forma, os tratamentos administrados no terceiro período são os mesmos administrados no período anterior. Estes experimentos são realizados com duas sequências: RTT e TRR.

Tabela 3: Planejamento experimental crossover
4x2 para duas formulações R e T

Seqüência	Delineamento A	
	Período	
	I	II
1	T	T
2	R	R
3	R	T
4	T	R

Tabela 4: Planejamento experimental crossover
2x3 para duas formulações R e T

Seqüência	Delineamento B		
	Período		
	I	II	III
1	T	R	R
2	R	T	T

Tabela 5: Planejamento experimental crossover
4x4 para duas formulações R e T

Seqüência	Delineamento C			
	Período			
	I	II	III	IV
1	T	T	R	R
2	R	R	T	T
3	T	R	R	T
4	R	T	T	R

Tabela 6: Planejamento experimental crossover
2x4 para duas formulações R e T

Seqüência	Delineamento D			
	Período			
	I	II	III	IV
1	T	T	R	R
2	R	R	T	T

Tabela 7: Planejamento experimental crossover para duas formulações R e T

Seqüência	Período I	Período II
1(TT)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_T + C_T$
2(RR)	$\mu + G_2 + P_1 + F_R$	$\mu + G_2 + P_2 + F_R + C_R$
3(RT)	$\mu + G_3 + P_1 + F_R$	$\mu + G_3 + P_2 + F_T + C_R$
4(TR)	$\mu + G_4 + P_1 + F_T$	$\mu + G_4 + P_2 + F_R + C_T$

Tabela 8: Valores das médias das seqüências por período para planejamento experiemnatal Cossover 2 x 2.

Seqüência	Período I	Período II	Período III
1(TRR)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_1 + P_3 + F_R + C_R$
2(RTT)	$\mu + G_2 + P_1 + F_r$	$\mu + G_1 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_2 + P_3 + F_T + C_T$

Baseado no modelo em (2.2.3) de um planejamento de experimento crossover 2 x 3 obtem-se valores esperados das médias das sequências por período, que estão apresentados na tabela 2.2.5. Considere o vetor aleatório $Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k}, Y_{i3k})'$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ e 3 , como sendo o vetor da medida farmacocinética observada do i -ésimo indivíduo na k -ésima sequência. Portanto, a estrutura das matrizes de Variância-Covariância para as duas sequências de um experimento crossover 2 x 3 são, respectivamente, iguais a

$$\sum_{RTT} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

$$\sum_{RTT} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

O delineamento experimental C é um constituído por quatro sequências: TTRR, RRTT, TRRT e RTTR, onde os dois primeiros períodos são os mesmos do experimento de Balaam e os dois últimos correspondem às imagens espelhadas das sequências dos períodos I e II.

A tabela 2.2.6 apresenta os valores esperados das médias da sequência por período para o modelo em (2.2.3) de um planejamento de experimento crossover 4 x 4. As respostas da medida farmacocinética observada do i -ésimo indivíduo da k -ésima sequência nos quatro períodos podem ser representadas pelo vetor aleatório

$$Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k}, Y_{i3k}, Y_{i4k})', \quad i = 1, 2, \dots, n_k; \quad k = 1, 2, 3 \text{ e } 4.$$

Tabela 9: Valores das Médias das seqüências por período para planejamento experimental crossover 4 x 4.

Seqüência	Período I	Período II	Período III	Período IV
1(TTRR)	$\mu + G_2 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_1 + P_3 + F_R + C_T$	$\mu + G_1 + P_4 + F_T + C_T$
2(RRTT)	$\mu + G_2 + P_1 + F_T$	$\mu + G_2 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_2 + P_3 + F_T + C_R$	$\mu + G_2 + P_4 + F_R + C_R$
3(TRRT)	$\mu + G_3 + P_1 + F_T$	$\mu + G_3 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_3 + P_3 + F_R + C_T$	$\mu + G_3 + P_4 + F_T + C_T$
4(RTTR)	$\mu + G_4 + P_1 + F_T$	$\mu + G_4 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_4 + P_3 + F_T + C_R$	$\mu + G_4 + P_4 + F_R + C_R$

A estrutura das matrizes de Variância-Covariância para as quatro seqüências de um experimento clínico crossover 4 x 4 são dadas, respectivamente, por

$$\sum_{TTRR} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & a_{32} & a_{33} & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

$$\sum_{RRTT} = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & a_{32} & a_{33} & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

$$\sum_{TRRT} = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & a_{32} & a_{33} & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

$$\sum RTTR = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & a_{32} & a_{33} & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

O planejamento de experimento crossover D é composto por duas seqüências e quatro períodos. Este planejamento é realizado com duas seqüências: TRRT e RTTR, onde os tratamentos.

Tabela 10: Valores das médias das seqüências por período para o planejamento experimental 2 x 4.

Seqüência	Período I	Período II	Período III
1(TRR)	$\mu + G_1 + P_1 + F_T$	$\mu + G_1 + P_2 + F_R + C_T$	$\mu + G_1 + P_3 + F_R + C_R$
2(RTT)	$\mu + G_2 + P_1 + F_r$	$\mu + G_1 + P_2 + F_T + C_R$	$\mu + G_2 + P_3 + F_T + C_T$

Nos três primeiros períodos são os mesmos do experimento B com duas seqüências e três períodos. O tempo para realização deste experimento é um pouco longo, quando comparado ao delineamento B.

Por este motivo, os planejamentos com mais de três períodos são geralmente evitados, pois pode existir um aumento nas chances de desistência dos voluntários, durante a realização do estudo.

A tabela 2.2.7 apresenta os valores esperados das médias das seqüências por período para o modelo em (2.2.3) de um planejamento de experimento de crossover 4x4.

As respostas da medida farmacocinética observada do i-ésimo indivíduo da k-ésima seqüência nos quatro períodos podem ser representadas pelo vetor aleatório

$$Y_{ik} = (Y_{i1k}, Y_{i2k}, Y_{i3k}, Y_{i4k})', \quad i = 1, 2, \dots, n_k; \quad k = 1, 2, 3 \text{ e } 4.$$

Portanto, a estrutura das matrizes de Variância-Covariância para as duas seqüências de um experimento crossover 2 x 4 são dadas, respectivamente, por

$$\sum TRRT = \begin{pmatrix} \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & a_{32} & a_{33} & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

$$\sum RTTR = \begin{pmatrix} \sigma_R^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & \sigma_S^2 & \sigma_T^2 + \sigma_S^2 & \sigma_S^2 \\ \sigma_S^2 & a_{32} & a_{33} & \sigma_R^2 + \sigma_S^2 \end{pmatrix}$$

Em resumo, os planejamentos de experimentos crossover replicado oferecem algumas vantagens, quando comparadas ao não-replicados 2 x 2, que são as seguintes:

- i) permitir comparações das variabilidades intra-indivíduos para formulação T e R, σ_T^2 e σ_R^2 ;
- ii) indica se a formulação T apresenta maior ou menor variabilidade intra-indivíduos nas medidas farmacocinéticas, quando comparada à formulação R;
- iii) reduz o número de voluntários necessários para a realização do estudo de bioequivalência.

Portanto, os delineamentos crossover replicado possuem a desvantagem de aumentar o tempo para o término do experimento, devido aos tempos necessários de washout entre os períodos. Isto pode aumentar o número de desistência dos voluntários em particular ou em continuar o experimento.

5.5.2 Planejamento Experimental Crossover com Três ou Mais Formulações

Os planejamentos de experimentos utilizados em estudos de bioequivalência de três ou mais formulações são mais complicados em relação aos planejamentos de apenas duas formulações.

Considerando a realização de um experimento crossover para um estudo de bioequivalência de três formulações diferente de um determinado medicamento. Neste caso, existem três possíveis comparações pareadas entre

formulações: a formulação 1 versus a formulação 2, a formulação 1 versus a formulação 3, a formulação 2 versus a formulação 3. Essas diferenças pareadas são estimada com a mesma precisão, ou seja, utiliza-se $V = (\hat{Y}_i - \hat{Y}_j) = v\sigma_e^2$, onde v é uma constante e σ_e^2 representa a variabilidade intra-indivíduos. Os planejamentos experimentais que possuem esta propriedade são conhecidos como experimento com variância balanceada. Como o valor de “ v ” pode variar de acordo com o planejamento adotado, o planejamento ideal será aquele que apresentar o menor valor de “ v ”. Jones e Kenward (1989) apontaram que o planejamentos experimentais balanceados satisfazem as seguintes condições:

- i) cada indivíduo recebe apenas uma vez cada formulação testada;
- ii) cada formulação ocorre o mesmo número de vezes em cada período;
- iii) o número de indivíduos que recebem a formulação i , em algum período seguido da administração da formulação j , no próximo período é a mesma para todo $i \neq j$.

Quando o número de período p é igual ao número de formulações f , então o balanceamento pode ser obtido através de um Quadrado Latino, exceto quando $f = 6$. Um exemplo de quadrado latino com $f = 3$ está apresentado na tabela 2.2.8. Observa-se quanto maior o número de formulações testadas, maior é o número de seqüências e, conseqüentemente, um maior número de indivíduos é necessário para realização do experimento.

Tabela 11: Quadrado latino para três formulações.

Seqüência	período		
	I	II	III
1	R	T ₁	T ₂
2	T ₁	T ₂	R
3	T ₂	R	T ₁
4	R	T ₂	T ₁
5	T ₁	R	T ₂
6	T ₂	T ₁	R

* R é a Referência e T₁ e T₂ são formulações Teste 1 e 2, respectivamente

Para resolver este problema, Williams (1949) propôs um delineamento experimental balanceado que requer um número pequeno de sequências e de período para ser realizado. Um experimento de Williams é composto por f formulações e p períodos e pode ser construído através dos seguintes passos:

- i) codifique as formulações testadas de 1, 2, ..., f ;
- ii) inicie com um quadrado latino padrão $f \times f$, onde as formulações na i -ésima são dadas por $i, i + 1, \dots, f - 1, 2, \dots, i - 1$;
- iii) entrelace cada linha do quadrado latino padrão com a imagem espelhada, isto é, em ordem inversa. Após este passo, obtém-se um retângulo de $f \times 2f$;
- iv) divida o retângulo de $f \times 2f$ ao meio e obtenha dois quadrados de $f \times f$. A coluna de cada quadrado $f \times f$ corresponde ao período de tratamento e as linhas são as sequências. Lembre-se que as representações numéricas dos quadrados são as codificações das formulações,
- v) se f for par, escolha qualquer um dos dois quadrados $f \times f$. No entanto, se for ímpar, deve-se usar ambos os quadrados $f \times f$.

utilizando os passos do procedimento acima, pode-se construir um experimento de Williams para 4 formulações uma Referência R e três Testes T_1 , T_2 e T_3 :

- i) codifique a formulação Referência R por 1, e as formulações Teste T_1 , T_2 e T_3 por 2, 3 e 4 respectivamente;
- ii) um quadrado latino padrão 4×4 pode ser escrito como:

1	2	3	4
2	3	4	1
3	4	1	2
4	1	2	3

iii) permutando as colunas do quadrado latino padrão 4 x 4 e escrevendo sua imagem, obtem-se um retângulo de 4 x 8:

1	4	2	3	3	2	4	1
2	1	3	4	4	3	1	2
3	2	4	1	1	4	2	3
4	3	1	2	2	1	3	4

iv) dois quadrados latinos 4 x 4 são obtidos através da divisão do retângulo 4 x 8:

Tabela 12: Quadrado latino duas sequências e quatro períodos

Sequência	Período			
	I	II	III	IV
1	1	1	2	3
	2	2	3	4
	3	3	4	1
	4	4	1	2
2	1	3	2	1
	2	4	3	2
	3	1	4	3
	4	2	1	4

v) como o número de formulações é par, pode-se escolher qualquer um dos dois quadrados latinos para realizar o experimento. Após a descodificação (1, 2, 3 e 4 por R, T₁, T₂) para o quadrado 1, obtem-se o planejamento de experimento de williams, apresentado na tabela 2.2.9.

Tabela 13: Delinemento Experimentla de Williams para Quatro formulações

Sequência	Período			
	I	II	III	IV
1	R	T ₃	T ₁	T ₂
2	T ₁	R	T ₂	T ₃
3	T ₂	T ₁	T ₃	R
4	T ₃	T ₂	R	T ₁

Baseando –se no exemplo para 4 formulações, observa-se que o experimento de Williams necessita de 4 seqüências, enquanto que um experimento quadrado latino 4 x 4 completo necessita de 12 seqüências para ser realizado. Efetuando-se os mesmos passos do procedimento descrito anteriormente, pode-se obter também o delineamento experimental de Williams com três formulações da tabela 2.2.10.

Tabela 14: Delienamento experiemntal de Williams três formulações.

Sequência	Período		
	I	II	III
1	R	T ₂	T ₁
2	T ₁	R	T ₂
3	T ₂	T ₁	R
4	T ₁	T ₂	R
5	T ₂	R	T ₁
6	R	T ₁	T ₂

5.5.3 Planejamento Experimental Balanceado em blocos Incompleto.

Em estudo de bioequivalência de três ou mais formulações de um determinada droga, alguns delienamentos experimentais crossover podem não ser apropriado devido às seguintes razões:

- i) o tempo para realização do experimento crossover pode ser demoradp quando o número de formulações f é grande, pois são necessários $f - 1$ períodos de washout;

- ii) podem não ser permitidas muitas retiradas de amostra sanguíneas de cada indivíduo ao longo do tempo, devido as recomendações médicas, por exemplo pacientes debilitados;
- iii) em virtude de um longo tempo para execução do estudo clínico, os voluntários podem desistir do experimento.

Westlake (1974) sugeriu o emprego de um delineamento experimental balanceado em blocos incompleto para estudos de bioequivalência de três ou mais formulações. Estes experimentos consiste em administrar um número mínimo de formulações aos voluntários. A denominação bloco incompleto é utilizada porque o número de formulações administradas em cada bloco é maior em relação ao número de formulações testadas. Quando este planejamento experimental é empregado em estudo de bioequivalência, os blocos e as formulações não são ortogonais entre si, portanto os efeitos dos blocos e os efeitos de formulações não podem ser estimados separadamente.

Devido ao confundimento de algum efeito do planejamento em blocos incompletos, recomenda-se que as formulações administradas em cada um dos blocos deste experimento sejam alocadas aleatoriamente. De forma balanceada, isto é, quaisquer duas formulações aparecem juntas o mesmo número de vezes. O planejamento experimental balanceado em blocos incompleto possui as seguintes vantagens em relação ao planejamento experimental incompleto:

- i) as diferenças entre os efeitos de qualquer duas formulações sempre podem ser estimadas com a mesma precisão;
- ii) a análise é mais simples, apesar da existência de não-ortogonalidade, quando existe o balanceado no planejamento do experimento;
- iii) podem-se obter estimativas não-viciadas para os efeitos das formulações.

Considere a realização de um experimento para avaliar a bioequivalência de f formulações, em cada indivíduo pode apenas receber h formulações ($f > h$). Portanto, as sequências do planejamento experimental balanceado em blocos incompletos podem ser construídos através das combinações de f formulações em h . Após a aplicação de um método de aleatorização, as sequências as formulações são alocadas a cada um dos voluntários. No entanto, é preferível que as alocações das formulações sejam realizadas de tal forma que o

planejamento seja balanceado em cada período, ou seja, cada formulação de aparecer o mesmo número de vezes nos períodos do experimento. Por exemplo, para um número par de formulações $f = 2n$ e $h = 2$. É necessário que o número de sejam iguais a $g = 2n(2n - 1)$. Entretanto, para um número ímpar de formulações $f = 2n + 1$ e $h = 2$, são necessárias $g = (2n + 1)n$ sequências. As tabelas 2.2.11 e 2.2.12 apresentam alguns exemplos destes planejamentos do experiemnto.

Tabela 15: Planejamento de experimento balanceado incompleto para 4 formulações e 3 períodos

Sequência	Período		
	I	II	III
1	T ₁	T ₂	T ₃
2	T ₂	T ₃	R
3	T ₃	R	T ₁
4	R	T ₁	T ₂

5.5.4 Planejamento de Experimento Paralelo

Um delineamento experimental em paraleleo,ou completamente aleatorizado, consiste num delineamento em que cada indivíduo recebe apenas uma das formulações testadas, após um método de aleatorização. A versão mais simples deste experiemnto consiste na ralização do experimento para duas formulações (uma referência R e outra teste T) com uma amostra de $n_1 + n_2$ voluntários. Portanto, aloca-se aleatoriamente n_1 voluntários à formulação R e n_2 voluntários, à formulação T.

Como os indivíduos recebem apenas uma das formulações, este experimento pode não ser apropriado para estudo de bioequivalência/biodisponibilidade, pois a variabilidade das observações, constituída pela variabilidade inter e intra-indivíduos, não pode ser identificada e decomposta nesta duas fontes de variação.

Embora este experiemnto possua desvantagem de ser incapaz de remover variabilidade inter-indivíduos na comparação das biodisponibilidades

das formulações testadas, há algumas raras ocasiões em que este delineamento é mais recomendado. Por exemplo, para estudo de bioequivalência de um genérico de um fungicida local, é necessário a realização de três grupos de tratamentos completamente aleatorizado: um correspondente ao teste T, outro correspondente ao de referência R e o terceiro de controle. Os planejamentos experimentais paralelos também são recomendados nos casos em que o fármaco apresenta um tempo de meia-vida muito longo, pois o experimento pode ser realizado em um tempo menor do que o experimento crossover. Quando os voluntários debilitados são usados para um estudo de bioequivalência, emprega-se geralmente o planejamento de experimento em paralelo, pois o experimento pode ser concluído rapidamente, evitando agravar o estado de saúde dos pacientes. Portanto, o delineamento experimental em paralelo é o mais indicado nos casos em que:

- i) a variabilidade inter-indivíduos é relativamente pequena, se comparada a variabilidade intra-indivíduos,
- ii) a droga é potencialmente tóxica e o seu tempo de meia-vida é muito longo;
- iii) a população de interesse é formada por pacientes debilitados;
- iv) o custo no aumento do número de voluntário é reduzida, quando comparado ao custo da introdução de um novo período de tratamento.

A escolha de um planejamento experimental adequado para um estudo de biodisponibilidade/bioequivalência é muito importante para um desenvolvimento de um protocolo de estudo. O delineamento experimental selecionado pode afetar a análise, a interpretação dos resultados e a determinação da bioequivalência entre as formulações. Então, é necessário conhecer todas as possíveis circunstâncias em que o experimento está envolvido antes de realizar uma criteriosa seleção entre os possíveis planejamentos de experimentos.

5.5.5 Tamanho da Amostra para um Estudo de Bioequivalência

Conforme a Resolução nº 896 e 898, de 29 de maio de 2003, a ANVISA regulamentou que não é permitido a utilização de um tamanho da amostra inferior a 12 indivíduos. No entanto, é importante lembrar que o protocolo deverá

também conter um número suficiente de voluntários, prevendo a existência de possíveis desistências durante a realização do experimento. O tamanho da amostra para planejamento experimental mais apropriado pode ser calculado a partir do coeficiente de variação (CV), previamente conhecido através de um estudo piloto ou devido a especificação do medicamento referência R, afim de que possa garantir a confiabilidade necessária para análise dos resultados do experimento de bioequivalência/biodisponibilidade.

5.6 Inferência Para os Efeitos dos Modelos dos Experimento Crossover para Duas Formulações Referência (R) e Teste (T)

Em estudo de bioequivalência, a análise dos efeitos fixos do experimento crossover utilizado deve ser realizada antes da aplicação dos testes de bioequivalência, pois esta análise preliminar dos dados pode indicar quais serão as próximas etapas no estudo de bioequivalência para a referência R e teste T. Por exemplo, se existe efeito residual (carry-over) nas medidas farmacocinéticas de interesse de um delineamento crossover 2 x 2, então a análise de bioequivalência deverá utilizar apenas os dados do primeiro período do experimento.

5.6.1 Planejamento Experimental Crossover 2 x 2

Um planejamento é composto por duas formulações, uma referência R e uma teste T, dois períodos de tratamento e duas sequências (RT e TR). Baseando-se o modelo 2.2.1, tem-se o seguinte modelo estatístico, para este experimento 2 x 2.

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk} \quad (3.1.1)$$

Onde Y_{ijk} representa a variável resposta de alguma medida farmacocinética, por exemplo, a ASC ou C_{max} do i -ésimo indivíduo, no j -ésimo período e na k -ésima sequência, onde $i = 1, 2, \dots, n_k$, $j = 1, 2$ e $k = 1, 2$;

μ representa a média geral;

S_{ij} é o efeito aleatório do i -ésimo indivíduo, na k -ésima sequência, $i = 1, 2, \dots, n_k$, $j = 1, 2$ e $k = 1, 2$;

P_j representa o efeito do j -ésimo período, $j = 1, 2$ e $P_1 + P_2 = 0$; $F_{(j,k)}$ é o efeito direto da formulação administrada no j -ésimo período, na k -ésima sequência, onde $F_{(j,k)} = F_R$ se $j = k$ e $F_{(j,k)} = F_T$ se $j \neq k$, para $j = 1, 2$ e $k = 1, 2$ e $F_R + F_T = 0$;

$C_{(j-1,k)}$ representa o efeito residual do $(j - 1)$ -ésimo período para o j -ésimo período, na k -ésima sequência, sendo que $C_{(j-1,k)} = C_R$, se $j = 2$ e $k = 1$, $C_{(j-1,k)} = C_T$, se $j = 2$ e $k = 2$ e $C_R + C_T = 0$;

e_{ijk} é o erro aleatório do i -ésimo indivíduo no j -ésimo período, na k -ésima sequência.

5.6.2 Análise Paramétrica

Os métodos paramétricos utilizados para a inferência estatística dos efeitos de um experimento crossover 2 x 2 como em (3.1.1) assumem que S_{ih} e e_{ijk} são variáveis normais independentes com média iguais a zero e variância a σ_S^2 e σ_e^2 , respectivamente.

Sob a pressuposição de normalidade para S_{ih} e e_{ijk} , podem ser realizadas através da estatística t , como apresentada a seguir.

5.6.2.1 Efeito residual (Carry-over)

A análise dos efeitos de carry-over deve ser a primeira a ser efetuada para os efeitos fixos do modelo em (3.1.1) de um experimento crossover 2 x 2, pois diferentes procedimentos podem ser utilizados no estudo de bioequivalência das formulações R e T, dependendo das conclusões do teste do efeito carry-over.

Considerando os totais individuais para cada sequência, isto é,

$$U_{ik} = Y_{ilk} + Y_{i2k}, \quad i = 1, 2, \dots, n_k, \quad k = 1, 2. \quad (3.1.2)$$

O valor esperado e a variância de U_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2$ são iguais a

$$E(U_{ilk}) = \begin{cases} 2\mu + P_1 + P_2 + F_R + F_T + C_R, & \text{para os indivíduos da seqüência 1} \\ 2\mu + P_1 + P_2 + F_R + F_T + C_T & \text{para os indivíduos da seqüência 2} \end{cases}$$

Sendo $\sigma_X^2 = V(U_{ik}) = 2(2\sigma_S^2 + \sigma_e^2)$.

Para avaliar o efeito residual (carry-over), considerando $C = C_T - C_R$. Logo, sob a restrição de que $C_T + C_R = 0$, tem-se os efeitos de carry-over são iguais para duas formulações R e T, ou seja $C = 0$ se, e somente se, $C_R = C_T = 0$. Portanto, os efeitos de carry-over podem ser testados através das seguintes hipóteses estatísticas.

$$H_0 = C = C_R - C_T = 0 \quad \text{versus} \quad H_1: C = C_R - C_T \neq 0 \quad (3.1.3)$$

As inferências estatísticas de $C = C_T - C_R$ utilizam as seguintes medidas amostrais dos totais individuais das seqüências 1 e 2 :

$$\bar{U}_{.K} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} U_{ik}, \quad K = 1, 2.$$

Sob a pressuposição de normalidade e independência de S_{ik} e e_{ijk} , tem-se que $\bar{U}_{.1}$ e $\bar{U}_{.2}$ são as médias amostrais de duas populações normais independentes com variâncias iguais. Portanto, as inferências estatísticas de C podem ser realizadas através da estatística t.

Pode-se obter uma estimativa de C através da diferença entre as médias amostrais dos totais individuais das seqüências 1 e 2, ou seja,

$$\hat{C} = \bar{U}_{.2} - \bar{U}_{.1} = (\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22}) - (\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.21}),$$

Onde $\bar{Y}_{.jk} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{nk} Y_{ijk}$, para $k = 1, 2$. Portanto, sob a pressuposição de normalidade e independência de $\bar{U}_{.1}$ e $\bar{U}_{.2}$, tem-se que \hat{C} tem distribuição Normal média C e variância $V(\hat{C})$ igual a

$$V(\hat{C}) = 2(\sigma_s^2 + \sigma_e^2) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) = \sigma_u^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$$

Onde σ_u^2 representa a variância amostral ponderada das somas individuais das duas seqüências.

$$\hat{V}(\hat{C}) = \hat{\sigma}_u^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right), \quad \sigma_u^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (U_{ik} - \bar{U}_{.k})^2.$$

Os estimadores \hat{C} e $\hat{\sigma}_u^2$ são não-viciados para C e σ_u^2 , respectivamente.

Como

$(n_1 + n_2 - 2) \hat{\sigma}_u^2$ é independente de \hat{C} e tem distribuição $\sigma_u^2 X^2(n_1 + n_2 - 2)$, então sob hipótese $H_0: C_R = C_T$, obtém-se a seguinte estatística para o teste:

$$T_c = \frac{\hat{C}}{\hat{\sigma}_u \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (3.1.4).$$

Que tem distribuição t com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade. Portanto, rejeita-se a hipótese nula $H_0: C_R = C_T$, com nível de significância α , quando

$$|T_c| > t(\alpha/2, n_1 + n_2 - 2).$$

A estatística do teste T_c depende da estimativa de $\sigma_u^2 = 2(\sigma_s^2 + \sigma_e^2)$, que inclui as variabilidades intra σ_e^2 e inter-indivíduos σ_s^2 . Em estudos de biodisponibilidade/ bioequivalência, a variabilidade inter-indivíduos σ_s^2 é frequentemente superior a variabilidade intra-indivíduos σ_e^2 . Por isso, a

estatística T_c pode apresentar baixo poder para o teste do efeito de carry-over. Para aumentar o o poder deste teste, Grizzle(1965) sugeriu testar a hipótese nula ao nível de 10% de significância, ao invésdo tradicional 5%.

Pode-se construir um intervalo de confiança de $(1-\alpha) \times 100\%$ para C através de

$$\hat{C} \pm t(\sigma/2, n_1+n_2-2) \hat{\sigma}_u \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)} \quad (3.1.5)$$

5.6.2.2 Efeito Direto da Formulação

Se os efeitos residual (carry-over) não apresentam diferenças significativas, então o efeito direto da formulação pode ser analisado através da diferença dos períodos para cada indivíduo:

$$d_{ik} = \frac{1}{2}(Y_{i2k} - Y_{i1k}), i = 1, 2, \dots, n_k \quad k=1, 2. \quad (3.1.6)$$

O valor esperado e a variância das diferenças dos períodos são

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

e $V(d_{ik}) = \sigma_d^2 = \sigma_e^2 / 2$. A variância das diferenças dos períodos

$$V(d_{ik})$$

depende apenas da variabilidade intra-indivíduos, pois a variabilidade inter-indivíduos é removida da análise das formulações.

Por este motivo, os experimentos crossover são empregados em estudos de bioequivalência.

Denote o efeito direto da droga por $F = F_T - F_R$ e o efeito de período por

$$P = P_2 - P_1$$

Se os efeitos residual (carry-over) não apresentam diferenças significativas $C_R = C_T$, pode-se obter uma estimativa para F através das médias amostrais das diferenças dos períodos para cada sequência, $\hat{F} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}$.

Logo,

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

$$E(\hat{F}) = E(\bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}) = \left[(F_T - F_R) + \frac{(C_R - C_T)}{2} \right] = F - \frac{C}{2} = F$$

Onde $\bar{d}_{.k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} d_{ik}$, para $k = 1, 2$ e $C = C_R - C_T = 0$.

Um estimador não-viciado para F pode ser escrito como

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

Onde:

$$\bar{Y}_R = \frac{1}{2} (\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.22}), \quad \bar{Y}_T = \frac{1}{2} (\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.12}).$$

As médias amostrais das formulações \bar{Y}_R e \bar{Y}_T são denominadas médias de mínimos quadrados das formulações R e T, respectivamente.

Portanto, $\hat{F} = \bar{Y}_T - \bar{Y}_R$ é um contraste linear das médias amostrais das sequências por períodos.

Em um experimente crossover balanceado 2 x 2, isto é, em um experimento em que o número de indivíduos alocados às sequências RT e TR é o mesmo ($n_1 = n_2$), pode-se obter uma estimativa para F através da diferença das médias amostrais das formulações T e R, ou seja, por:

$$\hat{F}^* = \bar{Y}_T^* - \bar{Y}_R^* \quad (3.1.7)$$

Onde:

$$\bar{Y}_R^* = \frac{1}{n_1 + n_2} \left\{ \sum_{i=1}^{n_1} Y_{i11} + \sum_{i=1}^{n_2} Y_{i22} \right\}; \quad \bar{Y}_T^* = \frac{1}{n_1 + n_2} \left\{ \sum_{i=1}^{n_1} Y_{i21} + \sum_{i=1}^{n_2} Y_{i12} \right\}$$

Quando $C_R = C_T$, tem-se que:

$$E(\bar{Y}_R^*) = \frac{1}{n_1 + n_2} \left[(n_1 + n_2)\mu + (n_1 + n_2)F_R + n_1P_1 + n_2P_2 \right]$$

$$E(\bar{Y}_T^*) = \frac{1}{n_1 + n_2} \left[(n_1 + n_2)\mu + (n_1 + n_2)F_T + n_1P_2 + n_2P_1 \right]$$

Logo,

$$E(\hat{F}^*) = E(\bar{Y}_T^* - \bar{Y}_R^*) = (F_T - F_R) + \frac{1}{n_1 + n_2} \left[(n_2 - n_1)P_1 + (n_1 - n_2)P_2 \right] \quad (3.1.8)$$

O estimador \hat{F}^* é não viciada para F se, e somente se, o experimento crossover 2 x 2 for balanceado, isto é, experimentos em que $n_1 = n_2$.

Sob a pressuposição de normalidades de S_{ik} e e_{ijk} , a diferença entre as médias das formulações \hat{F} apresenta distribuição Normal com média F e variância igual a

$$V(\hat{F}) = \sigma_d^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right). \quad (3.1.9).$$

Como d_{i1} , $i = 1, 2, \dots, n_1$ e d_{i2} , $i = 1, 2, \dots, n_2$ são duas amostras independentes de uma população Normal com variâncias iguais, quando $C_R = C_T$, então as hipóteses do efeito direto da formulação

$$H_0: F = F_R - F_T = 0 \text{ versus } H_1: F = F_R - F_T \neq 0, \quad (3.1.10)$$

Podem ser testadas através da seguinte estatística:

$$T_d = \frac{\hat{F}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}, \quad (3.1.11)$$

Onde $\hat{\sigma}_d^2$ é a estatística da variância amostral ponderada das diferenças dos períodos das duas sequências, dada por

$$\hat{\sigma}_d^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (d_{ik} - \bar{d}_{.k})^2, \quad \bar{d}_{.k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} d_{ik}, \quad k = 1, 2. \quad (3.1.12)$$

Sob a hipótese nula $H_0: F_R = F_T$, a estatística T_d tem distribuição t, com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

Adotado um nível de significância α , a hipótese nula $H_0: F_R - F_T = 0$ é rejeitada quando $|T_d| > t(\alpha/2, n_1 + n_2 - 2)$.

Um intervalo de confiança de $(1 - \alpha) \times 100\%$ para F pode ser obtido por

$$\hat{F} \neq t(\alpha/2, n_1 + n_2 - 2) \hat{\sigma}_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)} \quad (3.1.13)$$

É conveniente ressaltar que o teste das hipóteses em (3.1.10) é realizado apenas para testar a igualdade dos efeitos diretos das formulações do modelo crossover 2 x 2 como em (3.1.1) e não para testar a bioequivalência das formulações T e R.

No próximo capítulo, serão apresentados alguns métodos estatísticos que são utilizados em estudos de bioequivalência média das formulações R e T.

5.6.2.3 Efeito de Período

Quando os efeitos residual (carry-over) não apresentam diferenças significativas, o efeito de período pode ser analisado através das diferenças cruzadas $O_{ik}, i=1,2,\dots,n_k; k=1,2$, dada por:

$$O_{ik} = \begin{cases} d_{ik}, & \text{para os indivíduos da sequência 1} \\ -d_{ik} & \text{para os indivíduos da sequência 2} \end{cases}$$

O valor esperado e a variância das diferenças cruzadas são:

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

$$e \quad V(O_{ik}) = \sigma_d^2 = \sigma_e^2/2.$$

Considere $\bar{O}_{.1}$ e $\bar{O}_{.2}$ como sendo as médias amostrais das diferenças cruzadas das sequências 1 e 2, respectivamente. Logo,

$$\bar{O}_{.K} = \begin{cases} d_{.1}, & \text{para } K = 1 \\ -d_{.2}, & \text{para } K = 2 \end{cases}$$

Logo, se $C_R + C_T = 0$, um estimador não-viciado para o efeito do período P pode ser obtido como:

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

As hipóteses utilizadas para testar o efeito de período do modelo em (3.1.1) são:

$$H_0: P_1 = P_2 \text{ versus } H_1: P_1 \neq P_2 \quad (3.1.14)$$

e podem ser testadas através da estatística:

$$T_P = \frac{\hat{P}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad (3.1.15)$$

Portanto, utilizando-se um nível de significância α , rejeita-se a hipótese nula H_0 quando $|T_P| > t(\alpha/2, n_1+n_2-2)$.

Por sua vez, um intervalo de confiança de $(1-\alpha) \times 100\%$ para P pode ser construído como:

$$\hat{P} \pm t(\alpha/2, n_1+n_2-2) \hat{\sigma}_d \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)} \quad (3.1.16)$$

5.6.2.4 Análise de Variância

Os efeitos fixos do modelo em (3.1.1) de um delineamento experimental crossover 2 x 2 podem ser testados utilizando-se os testes t. No entanto, estes efeitos fixos também podem ser analisados através do uso dos testes F, que são obtidos através da análise de variância.

A análise de variância consiste em estudar a variabilidade das medidas farmacocinéticas de interesse do particionamento da soma total de quadrados (SQ) das observações nas componentes de efeitos fixos e de erros aleatórios.

Por exemplo, para um planejamento experimental crossover 2 x 2, particiona-se a soma total de quadrados das $2(n_1+n_2)$ observações nas componentes: efeitos de carry-over, efeito de período, efeito direto da formulação e erro aleatório.

Considerando-se $\bar{Y}_{...}$ como sendo a média geral de todas as observações, a soma total de quadrados corrigidos pela média geral pode ser escrita como:

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

Onde $\bar{Y}_{i.k} = \frac{1}{2} \sum_j Y_{ijk}$, SQ_{entre} é a soma de quadrados entre os indivíduos e SQ_{dentro} é a soma de quadrados dentro dos indivíduos.

Como temos $2(n_1+n_2)$ observações, a SQ_{total} possui $2(n_1+n_2)-1$ graus de liberdade. Como existe um total de n_1+n_2 indivíduos nas sequências, então SQ_{entre} e SQ_{dentro} têm graus de liberdade, respectivamente, iguais a n_1+n_2-1 e n_1+n_2 .

A SQ_{entre} pode ser particionada em duas componentes: uma para aos efeitos de carry-over e outra para o erro inter-indivíduos. Portanto, tem-se

$$SQ_{entre} = SQ_{carry-over} + SQ_{inter},$$

Onde :

$$SQ_{carry-over} = \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} [(\bar{Y}_{.12} + \bar{Y}_{.22}) - (\bar{Y}_{.11} + \bar{Y}_{.21})]^2,$$

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

Onde

$$Y_{i.k} = 1/2 \sum_j^2 Y_{ijk} \text{ para } i = 1, 2, \dots, n_k, k = 1, 2 \text{ e } Y_{..k} = 1/2 n_k \sum_i^{n_k} Y_{i.k} = 1 \sum_j^2 Y_{ijk},$$

para

$$k = 1, 2.$$

As somas de quadrados $SQ_{carry-over}$ e SQ_{inter} têm 1 e n_1+n_2-2 graus de liberdade, respectivamente. Logo, cada soma de quadrados dividida por seus

respectivos graus de liberdade é um quadrado médio QM. Os valores esperados dos quadrados médios destas somas são:

$$E(QM_{carry-over}) = \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2}(C_T - C_R)^2 + 2\sigma_s^2 + \sigma_e^2,$$

$$E(QM_{inter}) = 2\sigma_s^2 + \sigma_e^2,$$

O teste das hipóteses $H_0: C_R - C_T = 0$, em (3.1.3), pode ser realizado através da seguinte estatística F:

$$F_c = \frac{QM_{carry-over}}{QM_{inter}}, \quad (3.1.17)$$

Que, sob a hipótese nula, possui distribuição F com 1 e $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade. Rejeita-se H_0 , ao nível de significância α , quando

$$F_c > F(\alpha, 1, n_1 + n_2 - 2).$$

É importante lembrar que a distribuição F com 1 e V graus de liberdade é igual ao quadrado de uma distribuição t-Student com V graus de liberdade, ou seja,

$$F_c = T_c^2.$$

Portanto, a estatística F_c do teste acima é equivalente a estatística do teste T_c em (3.1.4).

Similarmente, a SQ_{dentro} também pode ser decomposta em três componentes: uma soma de quadrados para o efeito direto da droga, outra para o efeito de período e uma outra para o resíduo intra-indivíduos. Logo,

$$SQ_{dentro} = SQ_{droga} + SQ_{período} + SQ_{intra} \quad (3.1.18)$$

Onde:

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

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

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

As somas SQ_{droga} e $SQ_{\text{período}}$ possuem cada uma um grau de liberdade e SQ_{intra} tem $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade. Os valores para os quadrados médios destas somas são:

$$SQ_{\text{droga}} = \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} \left[(F_T - F_R) + \frac{(C_R - C_T)}{2} \right]^2 + \sigma_e^2$$

$$SQ_{\text{período}} = \frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} [P_2 - P_1]^2 + \sigma_e^2$$

$$E(QM_{\text{intra}}) = \sigma_e^2 = 2\sigma_d^2,$$

Tabela 16: Tabela de análise de variância do modelo em (3.1.1) de um delineamento experimental crossover 2 x 2.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	E(quadrado médio)	Estatística F
Inter-indivíduos				
Carry-over	1	$SQ_{\text{carry-over}}$	$\frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} (C_T - C_R)^2 + 2\sigma_s^2 + \sigma_e^2$	F_c
Resíduo	$n_1 + n_2 - 2$	SQ_{intra}	$2\sigma_s^2 + \sigma_e^2$	F_v
Intra-indivíduos				
Droga	1	SQ_{droga}	$\frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} \left[(F_T - F_R) + \frac{C_R - C_T}{2} \right]^2 + \sigma$	F_d^*
Período	1	$SQ_{\text{período}}$	$\frac{2n_1n_2}{n_1+n_2} [(P_2 - P_1)]^2 + \sigma_e^2$	F_p
Resíduo	$n_1 + n_2 - 2$	SQ_{intra}	σ_e^2	
Total	$2(n_1 + n_2) - 2$	SQ_{total}		

* F_d é válido somente se $C_R = C_T$.

Onde σ_d^2 é a variância amostral ponderada das diferenças dos períodos. Quando os efeitos de carry-over não apresentam diferenças significativas $C_R = C_T$, a hipótese nula em (3.1.10) pode ser testada através da seguinte estatística:

$$F_d = \frac{QM_{droga}}{QM_{int ra}} \quad (3.1.20)$$

A qual tem distribuição F com 1 e $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade sob a hipótese nula.

Adotando-se um nível de significância α , a hipótese nula é rejeitada quando $F_d > F(\alpha, 1, n_1 + n_2 - 2)$. Portanto, ambos os testes apresentam a mesma conclusão.

A hipótese nula $H_0 : P_1 = P_2$ em (3.1.14) pode ser testada utilizando-se a estatística:

$$F_p = \frac{QM_{periodo}}{QM_{int ra}} \quad (3.1.20).$$

Que, sob a hipótese nula, apresenta uma distribuição F com 1 e $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

Rejeita-se a hipótese nula, ao nível de significância α , quando

$$F_p > F(\alpha, 1, n_1 + n_2 - 2).$$

A análise dos efeitos fixos do modelo em (3.1.1) de um planejamento experimental crossover 2 x 2 pode ser realizado através da análise de variância representada pela tabela 13.

Note que um planejamento experimental crossover 2 x 2 pode fornecer estimativas e testes para os efeitos residual (carry-over), efeito direto da droga e efeito de período. No entanto, este planejamento não possibilita o estudo de algumas interações, pois não há replicação das formulações para os voluntários.

Portanto, para obter as estimativas de algumas interações, por exemplo, das interações de indivíduos por formulação, deve-se empregar um planejamento experimental crossover de ordem superior.

5.7 Análise Não-paramétrica

Quando as medidas farmacocinéticas na escala original ou transformadas de um experimento crossover 2 x 2 não satisfazem as pressuposições de normalidade e homogeneidade de variância, então as análises estatísticas dos efeitos fixos do experimento crossover 2 x 2 como em (3.1.1) devem ser realizadas através do teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Este teste emprega as somas ou diferenças das observações dos indivíduos nos períodos 1 e 2. Jones e Kenward (1989) apresentaram a metodologia não-paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney para a análise dos efeitos fixos de um ensaio crossover 2x2.

O teste não-paramétrico para as hipóteses em (3.1.3) dos efeitos residual (carry-over) é baseado nos postos dos totais individuais $U_{ik} = Y_{i1k} + Y_{i2k}$, $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2$ e pode ser realizado através do seguinte procedimento:

- (i) Calcule U_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$; $k = 1, 2$;
- (ii) Ordene as medidas encontradas U_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$, em ordem crescente, atribuindo-lhes postos R_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$. No caso de observações com mesmo valor, são atribuídos postos médios;
- (iii) Obtenha W através da soma dos postos R_{ik} das medidas dos indivíduos da sequência 1RT, isto é, $W = \sum_{i=1}^{n_1} R_{i1}$.

Sob a hipótese nula H_0 , tem-se que:

$$E(W) = \frac{n_1(n_1 + n_2 + 1)}{2} \quad \text{e} \quad V(W) = \frac{1}{12} n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1 - Q) \quad (3.1.21)$$

Onde:

$$Q = \frac{1}{(n_1 n_2)(n_1 + n_2 - 1)} \sum_1^q (r_v^3 - r_v),$$

q é o número de grupos com empates e r_v representa o tamanho do v -ésimo grupo.

Note que se não existem observações com empates, então $q = n_1 + n_2$, $r_v = 1$ para $v = 1, 2, \dots, n_1 + n_2$ e, portanto, $Q = 0$.

Para amostras pequenas, é aconselhável o uso do teste exato de Wilcoxon-Mann-Whitney, que é realizado baseando-se na hipótese nula da estatística W da soma dos postos. É importante lembrar que a distribuição da estatística das somas dos postos W é discreta, portanto alguns níveis de significância exatos da distribuição sob a hipótese nula. Desta forma, considera-se o valor mais próximo do valor de significância desejado.

Portanto, não se rejeita a hipótese nula, ao nível de significância α , quando:

$$w(\alpha/2, n_1, n_2) < W < w(1-\alpha/2, n_1, n_2)$$

Onde:

$$w(1-\alpha/2, n_1, n_2) = n_1(n_1 + n_2 + 1) - w(\alpha/2, n_1, n_2).$$

Quando o tamanho da amostra é grande, pode-se utilizar a distribuição normal como uma aproximação para a distribuição da estatística W da soma dos postos. Neste caso, as hipóteses podem ser testadas através

$$Z = \frac{W - E(W)}{\sqrt{V(W)}} = \frac{W - \frac{n_1(n_1 + n_2 + 1)}{2}}{\sqrt{\frac{1}{12} n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1 - Q)}} \quad (3.1.22)$$

Onde:

$$Q = \frac{1}{(n_1 n_2)(n_1 + n_2 - 1)} \sum_1^q (r_v^3 - r_v),$$

q é o número de grupos com empates e r_v representa o tamanho do v -ésimo grupo.

Logo, a hipótese nula é rejeitada, ao nível de significância α , quando $|Z| > z_{\alpha/2}$ é o $\alpha/2$ -ésimo percentil da distribuição normal padrão.

Se a hipótese $H_0 = C_R = C_T$ não é rejeitada, pode-se testar as hipóteses em (3.1.10) do efeito direto da formulação, utilizando-se o posto das diferenças dos períodos $d_{ik} = 1/2(Y_{i2k} - Y_{i1k})$, $i = 1, 2, \dots, n_k$, $k = 1, 2$ e aplicando-se o procedimento descrito para a medida U_{ik} , para a obtenção da soma dos postos R_{ik} de d_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$. Após calcular a soma dos postos dos indivíduos da sequência 1, $W = \sum_i^n 1 = 1$, pode-se aplicar novamente o teste não-paramétrico de Wilcoxon para as diferenças d_{ik} , $i = 1, 2, \dots, n_k$.

O teste não-paramétrico do efeito de período para as hipóteses em (3.1.14) pode ser aplicado na soma dos postos das diferenças cruzadas $O_{ik} = d_{ik}$ se o indivíduo for da sequência 1 (RT) e $O_{ik} = -d_{ik}$, se o indivíduo for da sequência 2 (TR), $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$. Após calcular as medidas de O_{ik} , pode-se aplicar o procedimento do teste não-paramétrico para obter a soma dos postos W das diferenças cruzadas para os indivíduos da sequência 1. A partir do valor observado da estatística W , o teste não-paramétrico pode ser aplicado para testar as hipóteses dos efeitos de período.

57.1 Análise Estatística na Presença do Efeito Residual (carry-over) significativo

Quando o efeito de carry-over é significativo $C_R \neq C_T$, então o planejamento experimental crossover 2 x 2 não é adequado, pois não é possível obter estimativas não-viciadas para os efeitos fixos do experimento. Por exemplo, o efeito da sequência não pode ser estimado separadamente na presença do efeito de carry-over, pois existe o confundimento do efeito da sequência com o de carry-over. Isto ocorre porque, em um planejamento experimental crossover 2 x 2, existem apenas 3 graus de liberdade para as 4 médias das formulações por período, onde um grau de liberdade é para o efeito de período, outro para o efeito de carry-over e o terceiro para a interação de

formulação e período, que é o efeito direto da formulação quando não existe efeito residual (carry-over).

Portanto, $\hat{F} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}$ é um estimador viciado para F na presença do efeito de carry-over, pois há o confundimento dos efeitos de carry-over com os efeitos direto das formulações R e T. Desta forma, um estimador não-viciado para o efeito direto da formulação F pode ser obtido utilizando-se apenas os dados do Período 1 do experimento crossover 2 x 2. Neste caso, é importante lembrar que a perda das informações referentes aos dados do Período 2 do experimento crossover 2 x 2 diminui a precisão estatística para o teste da comparação das formulações R e T. Isto ocorre porque a variabilidade inter-indivíduos σ_e^2 não é removida da variabilidade total dos dados, dada por $\sigma_e^2 + \sigma_s^2$. Além disso, devido ao experimento ter sido planejado para um experimento crossover, existe um número reduzido de indivíduos, o que também contribui para a diminuição do poder do teste. Portanto, para obter as vantagens de um experimento crossover e evitar os problemas devido á presença dos efeitos de carry-over, é importante a realização de um experimento crossover bem conduzido e com um período de washout suficiente para a completa eliminação do efeito da droga administrada no período anterior.

Jones e Kenward (1989) apontaram algumas razões que podem contribuir para a presença dos efeitos de carry-over:

- i) o verdadeiro efeito de carry-over pode aparecer quando o período de washout entre dois períodos de tratamento não foi o suficiente para os voluntários eliminarem os efeitos das formulações administradas no período anterior;
- ii) o efeito de carry-over psicológico pode aparecer quando as atitudes dos voluntários no Período 2 dependem das suas experiências no Período 1 de tratamento. Isto pode ocorrer, por exemplo, quando os voluntários conhecem as formulações administradas;
- iii) a interação entre formulação e período pode surgir quando o efeito da formulação depende do período em que foi administrada;
- iv) os grupos de voluntários das sequências 1(RT) e (TR) podem apresentar características, idade ou sexo, as quais os tornam

significativamente diferentes. Isto pode ocorrer na ausência de um processo adequado de aleatorização para a alocação dos voluntários às duas seqüências de tratamentos.

Se o efeito de carry-over é significativo mesmo tomando todas as devidas precauções, então deve-se utilizar apenas os dados do Período 1 do experimento crossover 2 x 2 para obter um estimador não viciado para o efeito direto das formulações. Este estimador pode ser obtido através da diferença das amostrais $\bar{Y}_{.12}$ e $\bar{Y}_{.11}$, ou seja,

$$E \{ \bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.11} \} = (\mu + P_1 + F_T) - (\mu + P_1 + F_R) = F_T - F_R = F.$$

denote este estimador por $\hat{F}/C = \bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.11}$. Neste caso, \hat{F}/C é um estimador não- viciado de F quando os efeitos de carry-over apresentam diferenças significativas.

A variância de \hat{F}/C é dada por:

$$V \left(\hat{F} / C \right) = (\sigma_s^2 + \sigma_e^2) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right).$$

baseando-se na variância $V(\hat{F})$ em (3.1.9), pode-se observar o aumento da variabilidade ocasionada pela perda do Período 2 do experimento de crossover 2 x 2 na diferença das variâncias abaixo:

$$V \left(\hat{F} / C \right) - V \left(\hat{F} \right) = \left(\sigma_s^2 + \frac{\sigma_e^2}{2} \right) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right).$$

As hipóteses em (3.1.10) podem ser testadas através da estatística:

$$T_{F/C} = \frac{\hat{F}/C}{\hat{S}_1 \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}},$$

onde:

$$S_1^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{i1k} - \bar{Y}_{.1k})^2.$$

Sob a hipótese nula $H_0 : F_R = F_T$, a estatística $T_{F/C}$ tem distribuição t com $n_1+n_2 - 2$ graus de liberdade. Portanto, rejeita-se a hipótese nula, ao nível de significância α , quando: $|T_{F/C}| > t(\alpha/2, n_1+n_2-2)$.

Quando os efeitos de carry-over apresentam diferenças significativas, um intervalo de confiança de $(1-\alpha) \times 100\%$ para F, utilizando-se apenas os dados do Período 1, pode ser obtidos como:

$$\hat{F} / C \pm t(\alpha/2, n_1+n_2-2) S_t \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)} \quad (3.1.23).$$

É importante frisar que, embora S_1^2 seja um estimador não-viciado de $\sigma_s^2 + \sigma_e^2$, as estimativas para σ_s^2 e σ_e^2 não podem ser encontradas separadamente quando são usados apenas os dados do Período 1 do experimento crossover 2 x 2.

Em estudos de bioequivalência, quando os efeitos de carry-over apresentam diferenças significativas, apenas os dados do Período 1 são utilizados para avaliar a bioequivalência das formulações R e T.

5.8 Exemplo Ilustrativo dos Métodos Paramétricos e Não-paramétricos

Com o intuito de ilustrar as inferências estatísticas mencionadas no decorrer deste capítulo, considere os dados de bioequivalência de n°27 de um planejamento experimental crossover 2 x 2, que estão disponíveis na página da internet <http://www.fda.gov/cder/bioequivdata>.

Neste experimento, foi realizado com uma amostra aleatória de 14 voluntários sadios para um estudo de bioequivalência das formulações R e T de um medicamento anti-arritmia. A partir da coleta e processamento das amostras sanguíneas ao longo do tempo, as estimativas da medida farmacocinética ASC foram obtidas para cada um dos voluntários e estão apresentadas na tabela 3.1.2.

Para uma análise preliminar dos dados, são apresentadas as figuras 3.1.4 e 3.1.5 das ASC observadas para os indivíduos nos Períodos 1 e 2 em cada uma das seqüências 1(RT) e 2(TR) e a figura 3.1.6 das médias amostrais das

formulações T e R por período da tabela 3.1.3. Observe através das figuras 3.1.4 e 3.1.5 que a maioria dos indivíduos não apresentam grandes diferenças nas medidas observadas da ASC nos dois períodos. A figura 3.1.6 das médias amostrais das formulações por período sugere que a interação entre formulação e período pode não ser significativa, o que indica que o efeito residual (carry-over) pode não ser significativo no modelo do experimento crossover 2x2. No entanto, isto será verificado através de testes estatísticos apropriados.

Os efeitos fixos do modelo em (2.2.1) podem ser analisados utilizando-se os métodos paramétricos e não-paramétricos, utilizando os dados da tabela 17 a seguir:

Tabela 17: ASC para as formulações teste T e referência R.

Seqüência	Voluntário	Período 1	Período 2
1 (RT)	1	24,2	35
	3	25,8	25,3
	6	20,8	18,5
	7	19	20,6
	9	19,3	17,4
	12	15,1	17,5
	14	14,3	12,4
2(TR)	2	25,7	29,1
	4	29,8	21,1
	5	25,9	28,6
	8	24	18,6
	10	13,9	9,3
	11	16,2	14,3
	13	13,5	14,6

5.8.1 Análise Paramétrica

A tabela 14 apresenta as estimativas das medidas empregadas na análise paramétrica dos efeitos fixos do modelo crossover 2 x 2.

5.8.2 Efeito Residuais (carry-over)

Para testar as hipóteses em (3.1.3) dos efeitos de carry-over, são necessárias as estimativas de $\bar{U}_{.1}, \bar{U}_{.2}$ e σ_u^2 da tabela 3.1.4 e a estatística T_c em (3.1.4). Logo, aplicando-se o teste, tem-se que :

$$T_c = \frac{\bar{U}_{.2} - \bar{U}_{.1}}{\sigma_u \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} = \frac{40,657 - 40,742}{15,918 \sqrt{\frac{1}{7} + \frac{1}{7}}} = -0,001 \quad (3.1.24)$$

Portanto, a hipótese nula $H_0: C_R = C_T$ não é rejeitada ao nível de 5% de significância, pois $|T_c| < t_{(0,025;12)} = 2,1788$. Desta forma, pode-se prosseguir a análise dos demais efeitos fixos do experimento crossover 2 x 2 utilizando-se os dados dos dois períodos do experimento crossover 2 x 2.

Tabela 18: Médias amostrais para as formulações teste e referência nos períodos 1 e 2 de um planejamento experimental crossover

Seqüência	Período 1	Período 2	Média da Seqüência
1(RT)	$\bar{Y}_{.11} = 19,785$	$\bar{Y}_{.21} = 20,957$	$\bar{Y}_{..1} = 20,371$
2(TR)	$\bar{Y}_{.12} = 21,285$	$\bar{Y}_{.22} = 19,372$	$\bar{Y}_{..2} = 20,328$
Média do Período	$\bar{Y}_{.1.} = 20,536$	$\bar{Y}_{.2.} = 20,164$	$\bar{Y}_{...} = 20,349$

Tabela 19: Totais e as diferenças individuais dos dados da Tabela 14

Seqüência	Indivíduo	U_{ik}	R_{ik}	d_{ik}	R_{ik}	O_{ik}	R_{ik}
1 (RT)	1	59,20	14	5,40	14	5,40	14
	3	51,10	11	-0,25	8	-0,25	7
	6	39,30	7	-1,15	4	-1,15	3
	7	39,60	8	0,80	10	0,80	8
	9	36,70	6	-0,95	6	-0,95	4,5
	12	32,60	5	1,20	11	1,20	10
	14	26,70	2	-0,95	6	-0,95	4,5
Soma dos	Postos da	Seqüência 1	53		59		51

Seqüência	Indivíduo	U_{ik}	R_{ik}	d_{ik}	R_{ik}	O_{ik}	R_{ik}
2 (TR)	2	54,80	13	1,70	13	-1,70	1
	4	50,90	10	-4,35	1	4,35	13
	5	54,50	12	1,35	12	-1,35	2
	8	42,60	9	-2,70	2	2,70	12
	10	23,20	1	-2,30	3	2,30	11
	11	30,50	4	-0,95	6	0,95	9
	13	28,10	3	0,55	9	-0,55	6
		$\bar{U}_{.1} = 40,743$	$\bar{d}_{.1} = 0,586$	$\bar{O}_{.1} = 0,586$			
		$\bar{U}_{.2} = 40,657$	$\bar{d}_{.2} = -0,957$	$\bar{O}_{.2} = 0,957$			
		$\sigma_u^2 = 253,35$	$\sigma_d^2 = 5,252$	$\sigma_d^2 = 5,252$			

A partir da tabela 3.1.4, tem-se que as estimativas $\bar{d}_{.1}, \bar{d}_{.2}$ e σ_d^2 são, respectivamente, iguais a 0,586, 0,957 e 5,252. Logo, a estimativa de F é dada por $\hat{F} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2} = 1,543$. As hipóteses em (3.1.10), do efeito direto da formulação, podem ser testadas através da seguinte estatística:

$$T_d = \frac{\bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}}{\sigma_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = \frac{1,543}{2,291 \sqrt{\frac{1}{7} + \frac{1}{7}}} = 1,261 \quad (3.1.25)$$

5.8.3 Efeito de Período

$$\hat{O}_{.1} = 0,586; \hat{O}_{.2} = 0,957 \text{ e } \hat{\sigma}_d^2 = 5,252.$$

Baseando-se na tabela 3.1.4, obtem-se $\hat{O}_{.1} = 0,586; \hat{O}_{.2} = 0,957 \hat{\sigma}_d^2 = 5,252$. Então, utilizando-se a estatística em (3.1.15), para testar as hipóteses em (3.1.14), tem-se que

$$T_p = \frac{0,371}{2,291 \sqrt{\frac{1}{7} + \frac{1}{7}}} = -0,303 \quad (3.1.23)$$

Como $|T_p| < t_{(0,025;12)} = 2,1788$ não se rejeita a hipótese $H_0 : P_1 = P_2$ ao nível de 5% de significância.

As inferências para os efeitos fixos do modelo dado em (3.1.1) de um planejamento experimental crossover 2 x 2 são apresentadas na Tabela 3.1.5.

Tabela 20: Inferências estatísticas dos efeitos fixos do modelo em (3.1.1).

Efeito	Estimativa do Efeito	Variância da Estimativa	Intervalo de Confiança de 95%	T	Valor p
<i>Carry-over</i>	-0,085	15,916	(-34,762;34,593)	-0.001	0.9898
Direto Droga	1,5431	2,292	(-3,451;6,537)	1,261	0.2318
Período	-0,371	2,292	(-5,365;4,622)	-0,303	0.7669

5.8.4 Análise de Variância

Os resultados obtidos através da análise de variância dos dados da ASC em escala original e logarítmica estão apresentados respectivamente nas Tabelas 18 e Tabela 19. o método da análise de variância é equivalente ao uso dos testes t, portanto as mesmas conclusões são obtidas em ambas as análises.

Tabela 21: Análise de variância para ASC em escala original da Tabela 14

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	valor p
Inter-indivíduos					
<i>Carry-over</i>	1	0,0128	0,0128	0,00	0,9727
Resíduos	12	898,557	74,879	7,13	0,0009
Intra-indivíduos					
Formulação	1	16,662	16,662	1,59	0,2318
Período	1	0,966	0,966	0,09	0,7669
Resíduos	12	126,071	10,5059		
Total	27	1042,27			

Tabela 22: Análise de variância para ASC em escala a logarítmica

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	valor p
Inter-indivíduos					
<i>Carry-over</i>	1	0,004526	0,004526	0,22	0,6490
Resíduos	12	2,338421	0,194868	9,38	0,0002
Intra-indivíduos					
Formulação	1	0,038585	0,038585	1,86	0,1979
Período	1	0,013316	0,013316	0,64	0,4389
Resíduos	12	0,24923	0,020769		
Total	27	2,644078			

5.8.5 Análise Não-paramétrica

Utilizando-se as somas dos postos da Tabelas 3.1.4, pode-se testar os efeitos fixos do modelo dado em (3.1.1) de um crossover 2 x 2 através do teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney.

5.8.6 Efeito Residual (carry-over)

O teste não-paramétrico das hipóteses em (3.1.3) dos efeitos de carry-over é realizado através da soma dos postos R_{ik} das medidas de U_{ik} , para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ dos indivíduos da sequência 1 (RT). O valor da estatística da soma dos postos W para o teste do efeito carry-over é igual a 53. Como o tamanho da amostra é pequeno $n_1 + n_2 = 14$, deve-se empregar a versão exata do teste não-paramétrico de Wilcoxon. Os valores críticos $W_{(\alpha/2, n_1, n_2)}$ e $W_{(1-\alpha/2, n_1, n_2)}$, sob a hipótese nula, da estatística W podem ser obtidas através de tabelas (Hollander e Wolfe, 1973). Como a distribuição da estatística das somas dos postos W é discreta, alguns níveis de significância desejados podem não ser iguais aos níveis de significância exatos. Por exemplo, considere o nível de 5% de significância para o teste bilateral e os tamanhos amostrais $n_1 = 7$ e $n_2 = 7$, então o nível de significância exato mais próximo de $\alpha/2 = 0,025$ e $0,027$. Neste caso, os valores de $w_{(0,027;7;7)}$ e $w_{(0,973;7;7)}$ são iguais a 37 e 68, respectivamente. Portanto, se o valor observado da estatística W da soma dos postos é menor que 37, ou é maior que 68, a hipótese nula é rejeitada ao nível de 5,4% de significância. Então, como o valor observado da estatística W é 53 para o teste não-paramétrico do efeito carry-over, a hipótese nula $H_0 : C_R = C_T$ não é rejeitada ao nível de 5,4% de significância.

5.8.7 Efeito Direta da Formulação

Para o teste não-paramétrica das hipótese em (3.1.10) do efeito direto da droga, pode-se obter através da tabela 3.1.4 a estimativa igual a 59 para a estatística da soma dos postos W de d_{ik} , para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ para os indivíduos da sequência 1. Neste caso, comparando-se os valores críticos da estatística W , sob hipótese nula, $w_{(0,027;7;7)} = 37$ e $w_{(0,973;7;7)} = 68$, não rejeita a hipótese nula $H_0 : F_R = F_T$ ao nível de 5,4% de significância.

5.8.8 Efeito de Período

Baseando-se na tabela 3.1.4, tem-se que o valor esperado da estatística da soma dos postos W de O_{ik} , para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$ para o teste não-paramétrico de Wilcoxon das hipóteses em (3.1.14) é igual a 25. A partir dos valores $w_{(0,027;7;7)}=37$ e $w_{(0,973;7;7)} = 68$, sob a hipótese nula, da estatística de Wilcoxon. Portanto, a hipótese $H_0 : P_1 = P_2$ não é rejeitada ao nível de 5,4% de significância.

5.9 Experimento Crossover de Ordem Superior para Duas Formulações

Devido à existência de pelo menos uma replicação de uma das formulações testadas para cada um dos indivíduos, permite estimar a variabilidade intra-indivíduos para as formulações R e T e os efeitos, a partir de contrastes, dentro dos indivíduos.

5.9.1 Experimento Crossover 4 x 2

Como este experimento crossover possui 8 médias de sequência por período, então existe 7 graus de liberdade, que podem ser decomposto como apresentado a seguir.

Tabela 23: Experimento crossover 4x2

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Efeito de Sequência	3
Efeito de Formulação	1
Efeito de Período	1
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Interação Formulação x <i>Carry-over</i>	1
Total	7

Assumindo-se que não existe interação entre formulações e carry-over no modelo em (2.2.3) de um experimento crossover de 4 x 2, obtem-se mais um grau de liberdade para os resíduos intra-indivíduos. Conseqüentemente, os graus

de liberdade da tabela de análise de variância para um experimento de Balaam estão distribuído como na tabela 3.2.8. baseando-se nos graus de liberdade dessa tabela, pede-se observar que este planejamento permite estimar o efeito direto da formulação na presença do efeito de carry-over.

Tabela 24: Graus de liberdade da tabela ANOVA para um experimento de Balaam.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Inter-indivíduos	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 1$
Efeito de Sequência	3
Resíduos	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 4$
Intra-indivíduos	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4$
Efeito de Período	1
Efeito de Formulação	1
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Resíduos	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 3$
Total	$2(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) - 1$

Para a análise deste experimento, considera-se

$$d_{ik} = \frac{1}{2}(Y_{i2k} - Y_{i1k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k; \quad k = 1, 2, 3, 4.$$

Sob as pressuposições de normalidade e que $\sigma_T^2 = \sigma_R^2 = \sigma_e^2$, os valores esperados e as variância das médias de d_{ik} são

$$E(\bar{d}_{ik}) = \begin{cases} \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + C_T] & , \text{ para os indivíduos da sequência 1} \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + C_R] & , \text{ para os indivíduos da sequência 2} \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + C_R] & , \text{ para os indivíduos da sequência 3} \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + C_T] & \text{ para os indivíduos, da sequência 4} \end{cases}$$

$$e \quad V(\bar{d}_{ik}) = \frac{1}{2n_k} \sigma_e^2 \text{ com}$$

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

então tem-se $E\left[(\bar{d}_{.3}-\bar{d}_{.4})-(\bar{d}_{.2}-\bar{d}_{.1})\right] = (F_T - F_R) = F$. Logo,

tem-se que o melhor estimador não-viciado para F/C para o experimento A é

dado por:

$$\hat{F}/C = \left[(\bar{d}_{.3}-\bar{d}_{.4})-(\bar{d}_{.2}-\bar{d}_{.1})\right]$$

Como $d_{.k}$, $k = 1, 2, 3$ e 4 , são independentes entre si, a variância da estimativa

de F/C pode ser calculada com:

$$V\left(\frac{\hat{F}}{C}\right) = \frac{1}{2}\sigma_e^2\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4}\right).$$

Como $F = F_T - F_R$ e $F_T - F_R = 0$, tem-se que $F_T = \frac{1}{2}F$ e $F_R = -\frac{1}{2}F$.

Portanto, os estimadores de μ_T e μ_R são, respectivamente, iguais

$$\text{a } \bar{Y}_T = \bar{Y}_{...} + \frac{1}{2}\left(\frac{\hat{F}}{C}\right) \text{ e } \bar{Y}_R = \bar{Y}_{...} - \frac{1}{2}\left(\frac{\hat{F}}{C}\right), \text{ onde } \hat{Y}_{...} = \frac{1}{8}\sum_{k=1}^2\sum_{j=1}^2\bar{Y}_{.jk}$$

é o

estimador não-viciado para a média geral μ .

A análise do efeito carry-over pode ser realizada através do seguinte estimador:

$\hat{F}/C = 2(d_{.1}-d_{.2}) = [(\bar{Y}_{.21}-\bar{Y}_{.11})-(\bar{Y}_{.22}-\bar{Y}_{.12})]$, que possui variância igual a

$$V\left(\frac{\hat{F}}{C}\right) = 2\sigma_e^2\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4}\right).$$

Portanto, a hipótese nula $H_0 : C_T = C_R$ é rejeitada, ao nível de significância α , quando

$$|T_c| = \left| \frac{\hat{C}/F}{s\sqrt{2\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \right| > t(\alpha/2, n_1+n_2+n_3+n_4-3), \text{ onde } S^2 \text{ é o erro quadrático médio}$$

Intra-indivíduos da tabela de análise de variância do modelo do experimento de Balaam.

Se a hipótese nula não for rejeitada, então o estimador não viciado para F pode ser obtido através das médias das sequências por períodos das duas últimas sequências do experimento.

Portanto, $\hat{F} = \bar{d}_{.3} - \bar{d}_{.4}$, cuja a variância pode ser calculada por

$$V(\hat{F}) = \frac{1}{2} \sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4} \right).$$

Através deste experimento, pode-se calcular as variâncias intra-indivíduos para formulações R e T, utilizando-se das somas das diferenças 1 e 2, como apresentado abaixo:

$$\hat{\sigma}_T^2 = \frac{2 \sum_{i=1}^{n_1} (d_{i1} - \bar{d}_{.1})^2}{n_1 - 1},$$

$$\hat{\sigma}_R^2 = \frac{2 \sum_{i=1}^{n_2} (d_{i2} - \bar{d}_{.2})^2}{n_2 - 2}$$

5.9.2 Experimento Crossover 2 x 3

Um planejamento crossover 2 x 3 possui 6 médias de sequência por período portanto existe 5 graus de liberdade, que podem ser decomposto em:

Tabela 25: Experimento crossover 2x3

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Efeito de Sequência	1
Efeito de Formulação	1
Efeito de Período	2
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Total	5

A tabela 23 apresenta distribuição dos graus de liberdade na tabela de análise de variância para um delienamento crossover 2 x 3. Devido aos graus de liberdade que existem para esse experimento, é possível estimar o efeito direto da formulação mesmo na presença do efeito de carry-over.

Para analisar este experimento crossover, é importante definir as diferenças dos períodos como:

$$d_{ik} = \frac{1}{4} (2Y_{i1k} - Y_{i2k} - Y_{i3k})$$

Tabela 26: Graus de liberdade da tabela ANOVA para um experimento crossover.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Inter-indivíduos	$n_1 + n_2 - 1$
Efeito de Sequência	1
Resíduos	$n_1 + n_2 - 2$
Intra-indivíduos	$2(n_1 + n_2)$
Efeito de Período	2
Efeito de Formulação	1
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Resíduos	$2(n_1 + n_2 - 2)$
Total	$3(n_1 + n_2) - 1$

Sob as pressuposições de normalidade e de $\sigma_T^2 + \sigma_R^2 + \sigma_e^2$, os valores esperados e as variâncias de d_{ik} são:

$$E(d_{ik}) = \begin{cases} \frac{1}{2}(F_T - F_R) + \frac{3}{4}P_1, & \text{para os indivíduos da sequência 1} \\ \frac{1}{2}(F_R - F_T) + \frac{3}{4}P_1 & \text{para os indivíduos, da sequência 2} \end{cases}$$

e $V(d_{ik}) = \sigma_d^2$.

Portanto, tem-se que o melhor estimador não-viciado para o efeito direto da formulação F para um experimento crossover 2 x 3 é dado por,

$$\hat{F} = \frac{1}{4}[(2\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31}) - (2\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32})].$$

A esperança e a variância

de \hat{F} são, respectivamente, iguais a $E(\hat{F}) = F_T - F_R = F$ e

$$V(\hat{F}) = \left(\frac{3}{8}\right)\sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right).$$

As estimativas não-viciadas para a média μ e para σ_d^2 podem ser obtidas através de,

$$\bar{Y}_{...} = \frac{1}{6} \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^3 \bar{Y}_{.jk},$$

$$\hat{\sigma}_d^2 = \frac{\sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{nk} (d_{ik} - \bar{d}_{.k})^2}{n_1 + n_2 - 2}.$$

Como $F = F_T - F_R$ e $F_T + F_R = 0$, tem-se que $F_T = \frac{1}{2}F$ e $F_R = -\frac{1}{2}F$.

Portanto, os estimadores para as médias de μ_T e μ_R são, respectivamente, iguais a

$$\bar{Y}_T = \bar{Y}_{...} + \frac{1}{2}(\hat{F}) \text{ e } \bar{Y}_R = \bar{Y}_{...} + \frac{1}{2}(\hat{F}).$$

Sob a pressuposição de normalidade de S_{ik} e e_{ijk} , o melhor estimador não-viciado para o efeito de carry-over $C = C_T - C_R$ pode ser obtido utilizando-se contrastes lineares das médias das sequências por período, ou seja,

$$\hat{C} = \frac{1}{2} [(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32})].$$

É importante lembrar que o produto dos coeficientes dos contrastes de \hat{F} e \hat{C} nulo, indica que \hat{C} é independente de \hat{F} . A variância de \hat{C} pode ser calculada através de,

$$V(\hat{C}) = \left(\frac{1}{2}\right) \sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right).$$

Então, o efeito residuais (carry-over) pode ser testado através da seguinte estatística:

$$T_C = \frac{\hat{C}}{S \sqrt{\frac{1}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

Onde S^2 é o erro quadrático médio intra-indivíduos da tabela de análise de variância do modelo do experimento crossover 2 x 3. Logo, rejeita-se a hipótese nula $H_0 : C_T = C_R$, ao nível de significância σ , quando

$$|T_c| > t\left(\frac{\sigma}{2}, 2(n_1 + n_2 - 2)\right).$$

As variâncias intra-indivíduos para as formulações R e T para estes experimento são calculadas através dos seguintes contrastes intra-indivíduos:

$$q_{ik} = (Y_{i2k} - Y_{i3k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k \quad \text{e} \quad k = 1, 2.$$

desta maneira, estimativas não viciadas para σ_T^2 e σ_R^2 podem ser

calculadas a partir de

$$\sigma_T^2 = \frac{1}{2(n_1 - n_2)} \sum_{i=1}^{n_1} (q_{i1} - \bar{q}_{.1})^2,$$

$$\sigma_R^2 = \frac{1}{2(n_1 - n_2)} \sum_{i=1}^{n_1} (q_{i2} - \bar{q}_{.2})^2.$$

5.9.3 Experimento Crossover 2 x 4

Existem 6 graus de liberdade que estão associados à análise de um experimento crossover 2 x 4.

A tabela abaixo mostra como estes graus de liberdade podem ser decomposto:

Tabela 27: Experimento crossover 2x4

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Efeito de Sequência	1
Efeito de Formulação	1
Efeito de Período	3
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Total	6

A tabela 25 apresenta a distribuição dos graus de liberdade na tabela de análise de variância para um experimento crossover 2 x 4. Este experimento permite que o efeito direto da formulação seja estimado mesmo na presença do efeito de residual(carry-over).

Tabela 28: Graus de liberdade da tabela ANOVA para um experimento crossover 2x4.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Inter-indivíduos	$n_1 + n_2 - 1$
Efeito de Sequência	1
Resíduos	$n_1 + n_2 - 2$
Intra-indivíduos	$3(n_1 + n_2)$
Efeito de Período	3
Efeito de Formulação	1
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Resíduos	$3(n_1 + n_2) - 5$
Total	$4(n_1 + n_2) - 1$

sob a pressuposição de normalidade e independência de e_{jk} e S_{ik} . O melhor estimador não-viciado para F/C é dado por

$$\frac{\hat{F}}{C} = \frac{1}{20} \left[\left(6\bar{Y}_{.11} - 3\bar{Y}_{.21} - 7\bar{Y}_{.31} + 4Y_{.41} \right) - \left(6\bar{Y}_{.12} - 3\bar{Y}_{.22} - 7\bar{Y}_{.32} + 4Y_{.42} \right) \right]$$

cuja a variância é igual a
$$V \left(\frac{\hat{F}}{C} \right) = \left(\frac{11}{40} \right) \sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right).$$

Como $F = F_T - F_R$ e $F_T + F_R = 0$ tem-se que $F_T = \frac{1}{2}F$ e $F_R = -\frac{1}{2}F$.

Portanto, os estimadores para as médias μ_T e μ_R , são respectivamente, iguais a

$$\bar{Y}_T = \bar{Y}_{...} + \frac{1}{2}(\hat{F}) \quad \text{e} \quad \bar{Y}_R = \bar{Y}_{...} + \frac{1}{2}(\hat{F}).$$

As diferenças dos períodos são definidas como:

$$d_{ik} = \frac{1}{20} \left[\left(6Y_{i1k} - 3Y_{i2k} - 7Y_{i3k} + 4Y_{i4k} \right) \right], \quad i = 1, 2, \dots, n_k, \quad k = 1, 2.$$

Logo, os estimadores não-viciados para para F e σ_d^2 podem ser, respectivamente, iguais a $\bar{d} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}$, e

$$\sigma_d^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (\bar{d}_{ik} - \bar{d}_{.k})^2.$$

Utilizando-se contrastes lineares das médias das sequências por período de um experimento crossover 2 x 4, pode-se obter o seguinte estimador não-viciado para o efeito de residuo (carry-over).

$$\frac{\hat{C}}{F} = \frac{1}{5} \left[\left(\bar{Y}_{.11} - 2\bar{Y}_{.21} - 2\bar{Y}_{.31} - \bar{Y}_{.41} \right) - \left(\bar{Y}_{.12} - 2\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32} \right) - \bar{Y}_{.41} \right], \text{qu}$$

e possui variância igual a $V \left(\frac{\hat{C}}{F} \right) = \left(\frac{2}{5} \right) \sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$.

Portanto, a hipótese nula $H_0 : C_T = C_R$ pode ser testada através da seguinte estatística:

$$T_C = \frac{\hat{C}/F}{S \sqrt{\frac{2}{5} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}.$$

Onde S^2 é o erro quadrático médio intra-indivíduos da tabela de análise de variância do modelo experimental crossover 2 x 4. Logo, rejeita-se a hipótese nula, ao nível de significância α , quando

$$|T_C| > t \left(\frac{\sigma}{2}, 3(n_1 + n_2 - 2) - 5 \right).$$

Quando os efeitos de carry-over não são significativos, então um estimador não-viciado para F pode ser o dado por

$$\hat{F} = \frac{1}{4} \left[\left(\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31} + \bar{Y}_{.41} \right) - \left(\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32} + \bar{Y}_{.42} \right) \right],$$

que tem variância $V \left(\hat{F} \right) = \left(\frac{1}{4} \right) \sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$.

Chwou e Liu mostra que as estimativas das variâncias intra-indivíduos para as formulações T e R podem ser calculadas a partir dos seguintes contrastes intra-indivíduos, que são definidos como:

$$D_{1ik} = (Y_{i1k} - Y_{i4k}), \quad D_{2ik} = (Y_{i2k} - Y_{i3k}), \quad i = 1, 2, \dots, n_k, \quad k = 1, 2.$$

Como D_{1ik} e D_{2ik} são independentes, então os estimadores de σ_T^2 e σ_R^2 são, respectivamente, iguais a

$$\hat{\sigma}_T^2 = \frac{1}{2(n_1 - n_2 - 2)} \left(\sum_{i=1}^{n_1} (D_{1i1} - \bar{D}_{2.2})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (D_{2i2} - \bar{D}_{2.2})^2 \right)$$

$$\hat{\sigma}_R^2 = \frac{1}{2(n_1 - n_2 - 2)} \left(\sum_{i=1}^{n_1} (D_{2i1} - \bar{D}_{2.1})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (D_{1i2} - \bar{D}_{1.2})^2 \right),$$

onde

$$\bar{D}_{h.k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} D_{hik}, \quad h = 1, 2; \quad k = 1, 2.$$

5.9.4 Experimento Crossover 4 x 4

Um experimento crossover 4 x 4 possui 12 graus de liberdade, que pode ser decomposto da seguinte forma:

Tabela 29: Experimento crossover 4x4

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Efeito de Sequência	1
Efeito de Formulação	1
Efeito de Período	3
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Interação Formulação x <i>Carry-over</i>	1
Interação Formulação x Período	3
Contraste Sequência x Período	2
Total	12

A tabela 27 mostra como os graus de liberdade são decompostos na tabela de análise de variância para um delineamento crossover 4 x 4. O uso deste experimento permite que o efeito direto da formulação possa ser estimado até mesmo na presença do efeito residual (carry-over).

Este experimento possibilita a análise do efeito direto da formulação na presença do efeito residual (carry-over). Utilizando-se o contraste lineares das médias de seqüência por período, obtem-se o melhor estimador não-viciado para efeito direto da formulação F, dado por

$$\hat{F} = \frac{1}{8} \left[(\bar{Y}_{.11} - \bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.31} + Y_{.41}) - (\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.32} + Y_{.42}) + \right. \\ \left. + (\bar{Y}_{.13} - \bar{Y}_{.23} - \bar{Y}_{.33} + Y_{.43}) - (\bar{Y}_{.14} - \bar{Y}_{.24} - \bar{Y}_{.34} + Y_{.44}) \right],$$

que tem variância dada por $V(\hat{F}) = \left(\frac{1}{16}\right) \sigma_e^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{1}{n_3} + \frac{1}{n_4}\right)$.

Tabela 30: Graus de liberdade da tabela ANOVA um experimento crossover 4x4

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Inter-indivíduos	$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 1$
Efeito de Seqüência	3
Resíduos	$n_1 + n_2 n_3 + n_4 - 4$
Intra-indivíduos	$3(n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$
Efeito de Período	3
Efeito de Formulação	1
Efeito de <i>Carry-over</i>	1
Resíduos	$3(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) - 5$
Total	$4(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) - 1$

Para fazer a estimativa das variâncias intra-indivíduo para formulações T e R, é necessário definir os seguintes contrastes intra-indivíduos:

$$D_{ik} = (Y_{ik} - Y_{i2k}), \quad k = 1, 2;$$

$$D_{2ik} = (Y_{i3k} - Y_{i4k}), \quad k = 1,2;$$

$$D_{3ik} = (Y_{i1k} - Y_{i4k}), \quad k = 3,4;$$

$$D_{4ik} = (Y_{i2k} - Y_{i3k}), \quad k = 3,4.$$

Desta forma, Chow e Liu (2000) apresentam que os estimadores não-viciados para σ_T^2 e σ_R^2 são iguais a:

$$\hat{\sigma}_T^2 = \frac{1}{2(N-4)} \left(\sum_{i=1}^{n_1} (D_{1i1} - \bar{D}_{1.1})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (D_{2i2} - \bar{D}_{2.2})^2 + \sum_{i=1}^{n_3} (D_{3i3} - \bar{D}_{3.3})^2 + \sum_{i=1}^{n_4} (D_{4i4} - \bar{D}_{4.4})^2 \right)$$

$$\hat{\sigma}_R^2 = \frac{1}{2(N-4)} \left(\sum_{i=1}^{n_1} (D_{2i1} - \bar{D}_{2.1})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (D_{1i2} - \bar{D}_{1.2})^2 + \sum_{i=1}^{n_3} (D_{4i3} - \bar{D}_{4.3})^2 + \sum_{i=1}^{n_4} (D_{3i4} - \bar{D}_{3.4})^2 \right)$$

,

onde

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

$$\bar{D}_{h.k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} D_{hik}, \quad h = 1,2,3 \text{ e } 4; \quad k = 1,2,3 \text{ e } 4$$

5.10 MEDIDAS FARMACOCINÉTICA NA ESCALA LOGARÍTMICA

Na resolução nº. 898, de 29 de maio de 2003, a ANVISA recomenda que a análise de bioequivalência das medidas farmacocinética ASC e C_{\max} seja realizada com dados em escala logarítmica. Devido à limitação do tamanho da amostra em estudo de bioequivalência, não é possível realizar uma determinação confiável para a distribuição dos dados. A ANVISA apresenta duas justificativa para a utilização da transformação logarítmica:

i) como uma comparação preliminar geralmente é a análise da razão das médias de ASC ou C_{\max} , ao invés da diferença, então a análise da diferença das médias em escala logarítmica pode ser retransformada para a razão de médias em escala original;

ii) Westlake (1973, 1988) observou que o modelo multiplicativo para o experimento crossover pode ser mais adequado para medidas farmacocinéticas

ASC e C_{\max} de um estudo de bioequivalência, devido a velocidade de absorção e eliminação da formulação.

Considere, por simplicidade, o modelo multiplicativo de um experimento crossover 2x2.

$$X_{ijk} = \tilde{\mu} \tilde{S}_{ik} \tilde{P}_j \tilde{F}_{(j,k)} \tilde{C}_{(j-1,k)} \tilde{e}_{ijk} \quad (3.3.27)$$

ou o seguinte modelo com transformação logarítmica:

$$Y_{ijk} = \ln(X_{ijk}) = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk} \quad (3.3.28)$$

onde Y_{ijk} , μ , S_{ik} , P_j , $F_{(j,k)}$, $C_{(j-1,k)}$ e e_{ijk} são os mesmos apresentados na Seção 3.1.

Pode-se notar as seguintes relações entre os dois modelos:

$\tilde{\mu} = \exp(\mu)$, $\tilde{S}_{ik} = \exp(S_{ik})$, $\tilde{P}_j = \exp(P_j)$, $\tilde{F}_{(j,k)} = \exp(F_{(j,k)})$, $\tilde{C}_{(j-1,k)} = \exp(C_{(j-1,k)})$ e $\tilde{e}_{ijk} = \exp(e_{ijk})$ para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $j = k = 1, 2$. Sob as pressuposições que S_{ik} e e_{ijk} são independentes e normalmente distribuídos com média iguais a zero e variância, respectivamente, iguais a σ_s^2 e σ_e^2 , então a medida farmacocinética X_{ijk} na escala original apresenta um modelo linear lognormal, que pode ser escrito como:

$$X_{ijk} = \exp(\mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk}) \quad (3.3.29)$$

O vetor bivariado de observações do i -ésimo indivíduo, na k -ésima sequência, que é representado por $(X_{i1k}, X_{i2k})'$, apresenta distribuição lognormal bivariada, pois $(X_{i1k}, X_{i2k})' = (\ln X_{i1k}, \ln X_{i2k})'$ tem distribuição normal com vetor de médias μ_k e matriz de variância-covariância Σ_k para $k = 1, 2$ como apresentado na seção 2.2.2 (Crow e Shimizu, 1988).

A tabela 28 apresenta as médias e as medianas de X_{ijk} por sequência e período, considerando-se que não existe efeito residual (carry-over). Note que as médias de X_{ijk} não contêm apenas os efeitos fixos, mas também a variabilidade

inter e intra-indivíduos na escala logarítmica. No entanto, as medianas de X_{ijk} possuem apenas os efeitos fixos.

Tabela 31: Médias de medianas X_{ijk} por sequência e período.

Seqüência		Período I	Período II
1(RT)	Média	$\exp(\alpha_{11} + (1/2)(\sigma_T^2 + \sigma_s^2))$	$\exp(\alpha_{12} + (1/2)(\sigma_R^2 + \sigma_s^2))$
	Mediana	$\exp(\alpha_{11})$	$\exp(\alpha_{12})$
2(TR)	Média	$\exp(\alpha_{21} + (1/2)(\sigma_R^2 + \sigma_s^2))$	$\exp(\alpha_{22} + (1/2)(\sigma_T^2 + \sigma_s^2))$
	Mediana	$\exp(\alpha_{21})$	$\exp(\alpha_{22})$

5.11 Estimador de Máxima Verossimilhança

Em estudo de bioequivalência, a razão de biodisponibilidade média na escala original pode ser utilizada, pois apresenta o efeito da diferença entre formulações. Logo,

$$\delta = \tilde{F} = \exp(F) = \exp(\mu + F_T - \mu - F_R) = \frac{\mu + \exp(F_T)}{\mu + \exp(F_R)} = \frac{\tilde{\mu}_{F_T}}{\mu_{F_R}} = \frac{\tilde{\mu}_T}{\mu_R}$$

onde $\tilde{F} = \exp(F)$, $F = F_T - F_R$ e $\tilde{\mu}_T$ e μ_R são médias geométricas de T

e R. A estimativa $\delta = \frac{\tilde{\mu}_T}{\mu_R}$, para os dados não-transformados, pode ser

obtido através da transformação inversa da estimativa encontrada na escala logarítmica.

Baseado-se na medida farmacocinética em escala logarítmica, considere

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

onde $\bar{d}_{.k}$ são as médias amostrais das diferenças de períodos

$$d_{ik} = \frac{1}{2}(Y_{i1k} - Y_{i2k}).$$

Observa-se que

$$d_{ik} = \frac{1}{2}(Y_{i2k} - Y_{i1k}) = \frac{1}{2}(\ln X_{i2k} - \ln X_{i1k}) = \frac{1}{2} \ln(r_{ik}),$$

onde $r_{ik} = \frac{X_{i2k}}{X_{i1k}}$, para $i = 1, 2, \dots, n_k$ e $k = 1, 2$, são as razões de períodos.

A razão de períodos pode remover a variabilidade inter-indivíduos da comparação entre as biodisponibilidades das formulações, considerando-se o modelo multiplicativo. Sob a pressuposição de que os efeitos residual (carry-over) não são significativos

$$r_{ik} = \frac{X_{i2k}}{X_{i1k}} = \begin{cases} \frac{\tilde{P}_2 \tilde{F}_T \tilde{e}_{i2k}}{\tilde{P}_1 \tilde{F}_R \tilde{e}_{i1k}}, & \text{para a sequência } k = 1 \\ \frac{\tilde{P}_2 \tilde{F}_R \tilde{e}_{i2k}}{\tilde{P}_1 \tilde{F}_R \tilde{e}_{i1k}}, & \text{para a sequência } k = 2 \end{cases} \quad \text{onde } i = 1, 2, \dots, n_k.$$

Como \hat{F} é o estimador de máxima verossimilhança de $\mu_T - \mu_R$, então o estimador obtido através da transformação inversa é também um estimador de máxima verossimilhança para $\delta_{MV} = \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R$:

$$\hat{\delta}_{MV} = \exp(\hat{F}) = \exp(\hat{Y}_T - \hat{Y}_R).$$

A relação que existe entre a diferença das médias de mínimos quadrados na escala logarítmica e as razões de períodos na escala original é apresentado a seguir. Considere

$$R_k = \left(\prod_{i=1}^{n_k} r_{ik} \right)^{1/n_k}, \quad k = 1, 2.$$

Logo, tem-se que $\delta = \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^{1/2}$. Portanto, o melhor estimador não-viciado de \hat{F} , na escala logarítmica, é $\hat{F} = \ln(\delta_{MV})$. Desta forma, $\hat{\delta}_{MV}$ tem

distribuição lognormal com média $\delta \exp\left(\frac{m\sigma_d^2}{2}\right)$, onde $m = \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$. Então,

$$\hat{\delta}_{MV} \text{ não é um estimador não-viciado para } \delta^* = \left(\frac{R_1}{R_2}\right)^{1/2}.$$

Liu e Weng (1992) apresentam um estimador não-viciado e de mínima variância (ENVMV) para $\hat{\delta}_{MV} = \tilde{\mu}_T / \tilde{\mu}_R$, que é dado por

$$\hat{\delta}_{ENVMV} = \hat{\delta}_{MV} \Phi_f\left(mSQD\right),$$

onde $m = \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$. SQD é a soma de quadrados das diferenças dos

períodos para os dados transformados, ou seja, $SQD = (n_1 + n_2 - 2)\hat{\sigma}_d^2$, f representa os graus de liberdade $n_1 + n_2 - 2$ e

$$\Phi_f\left(-mSQD\right) = \sum_{j=0}^{\infty} \frac{\Gamma(f/2)}{\Gamma[(f/2)+j]j!} \left[\left(-\frac{m}{4}\right)SQD\right]^j \quad (3.3.30)$$

onde $\Gamma(\cdot)$ é a função gama. A convergência da série infinita em (3.3.30) é mais

rápida que das séries exponenciais, pois $\frac{\Gamma(f/2)}{\Gamma[(f/2)+j]} < 1$. A estimativa

da variância do estimador $\hat{\delta}_{ENVMV}$ é dada por

$$\hat{V}\left(\hat{\delta}_{ENVMV}\right) = \exp\left[2(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R)\right] \left[\left(\Phi_f(-mSQD)\right)^2 - \Phi_f(-4mSQD) \right]$$

5.12 Estimativa de Média das Formulações

Considerando-se o modelo multiplicativo em (3.3.27), pode-se obter um estimador para δ utilizando as médias de mínimos quadrados das formulações T e R, que são dados respectivamente, por

$$\bar{X}_T = \frac{(\bar{X}_{.21} + \bar{X}_{.12})}{2} \text{ e } \bar{X}_R = \frac{(\bar{X}_{.11} + \bar{X}_{.22})}{2}.$$

Portanto, o estimador para a razão de médias é $\hat{\delta}_{RM} = \bar{X}_T / \bar{X}_R$.

Como a distribuição exata de $\frac{\bar{X}_T}{\bar{X}_R}$ é muito complicada, o método de bootstrap

pode ser utilizado para construí-la (Efron e Tibshirami, 1993). Maiores detalhes serão apresentados no capítulo 4, onde o método bootstrap é empregado para a construção do intervalo de confiança não-paramétrico para a razão das médias em escala original. Examinaremos apenas o vício assintótico de $\hat{\delta}_{RM}$, considerando-se o modelo multiplicativo em (3.3.27).

Considerando o vetor de médias amostrais

$$\bar{X} = (\bar{X}_{.11}, \bar{X}_{.21}, \bar{X}_{.12}, \bar{X}_{.22})'$$

e $\lambda_k = n_k/n$, onde $n = n_1 + n_2$ para $k = 1, 2$. Utilizando-se o Teorema Central do

Limite para vetores, tem-se que $\bar{X} \xrightarrow{D} N(\mu, \Sigma/n)$, onde

$$\mu = (\mu_{11}, \mu_{21}, \mu_{12}, \mu_{22}), \text{ e } \Sigma' = \begin{pmatrix} \lambda_1 \Sigma_1 & a_{12} \\ a_{21} & \lambda_2 \Sigma_2 \end{pmatrix}, \quad \lambda_1 \Sigma_1 = \begin{pmatrix} V_{11} & V_{12} \\ V_{21} & V_{22} \end{pmatrix};$$

$$\lambda_1 \Sigma_1 = \begin{pmatrix} V_{33} & V_{34} \\ V_{34} & V_{44} \end{pmatrix};$$

sendo que,

$$\mu_{11} = \exp \left[(\mu + P_1 + F_R) + \left((\sigma_R^2 + \sigma_s^2) / 2 \right) \right];$$

$$\mu_{21} = \exp \left[(\mu + P_2 + F_T) + \left((\sigma_T^2 + \sigma_S^2) / 2 \right) \right];$$

$$\mu_{12} = \exp \left[(\mu + P_1 + F_T) + \left((\sigma_T^2 + \sigma_S^2) / 2 \right) \right];$$

$$\mu_{22} = \exp \left[(\mu + P_2 + F_R) + \left((\sigma_R^2 + \sigma_S^2) / 2 \right) \right];$$

$$V_{11} = \exp \left[2(\mu + P_1 + F_R) + (\sigma_R^2 + \sigma_S^2) \right] \left[\exp(\sigma_R^2 + \sigma_S^2) - 1 \right],$$

$$V_{22} = \exp \left[2(\mu + P_2 + F_T) + (\sigma_T^2 + \sigma_S^2) \right] \left[\exp(\sigma_T^2 + \sigma_S^2) - 1 \right],$$

$$V_{33} = \exp \left[2(\mu + P_1 + F_T) + (\sigma_T^2 + \sigma_S^2) \right] \left[\exp(\sigma_T^2 + \sigma_S^2) - 1 \right],$$

$$V_{44} = \exp \left[2(\mu + P_2 + F_R) + (\sigma_R^2 + \sigma_S^2) \right] \left[\exp(\sigma_R^2 + \sigma_S^2) - 1 \right],$$

$$V_{12} = V_{34} = \exp \left[2\mu + (\sigma_R^2 + \sigma_T^2 + 2\sigma_S^2) / 2 \right] \left[\exp(\sigma_S^2) - 1 \right].$$

Portanto, o vetor de médias amostrais $(\bar{X}_T, \bar{X}_R)'$ tem distribuição assintoticamente normal com vetor de médias $\mu^* = (\mu_T^*, \mu_R^*)$ e matriz de variância-covariância

$$\frac{1}{4n} \Sigma = \begin{pmatrix} V_{TT} & V_{TR} \\ V_{TR} & V_{RR} \end{pmatrix},$$

onde $n = n_1 + n_2$ e

$$\mu_T^* = \frac{1}{2} \left[\exp(\mu + F_T) + (\sigma_T^2 + \sigma_S^2) / 2 \right] \left[\exp(P_1) + \exp(P_2) \right]$$

$$\mu_R^* = \frac{1}{2} \left[\exp(\mu + F_R) + (\sigma_R^2 + \sigma_S^2) / 2 \right] \left[\exp(P_1) + \exp(P_2) \right]$$

$$\begin{aligned}
V_{TT} &= \left[\exp(2(\mu + F_T) + (\sigma_T^2 + \sigma_S^2)) \right] \left[\exp(\sigma_T^2 + \sigma_S^2) - 1 \right] \left[\lambda_1 \exp(2P_2) + \lambda_2 \exp(2P_1) \right] \\
V_{RR} &= \left[\exp(2(\mu + F_R) + (\sigma_R^2 + \sigma_S^2)) \right] \left[\exp(\sigma_R^2 + \sigma_S^2) - 1 \right] \left[\lambda_1 \exp(2P_1) + \lambda_2 \exp(2P_2) \right] \\
V_{TR} &= \left[\exp(2\mu + (\sigma_T^2 + \sigma_R^2 + 2\sigma_S^2)) \right] \left[\exp(\sigma_S^2) - 1 \right].
\end{aligned}$$

Supondo-se que não existe efeito residual (carry-over), o vício assintótico de $\hat{\delta}_{RM}$ é dado por:

$$Vicio(\hat{\delta}_{RM}) = E(\hat{\delta}_{RM}) - \delta = \left[\exp\left[\frac{\sigma_T^2 - \sigma_R^2}{2}\right] \left[1 + \frac{1}{na} \left[b \left[\exp(\sigma_R^2 + \sigma_S^2) - 1 \right] - \left[\exp(\sigma_S^2) \right] \right] \right] \right] - \delta$$

onde $a = \left[\exp(P_1) + \exp(P_2) \right]^2$ e $b = \lambda_1 \exp(2P_1) + \lambda_2 \exp(2P_2)$.

Quando não existe efeito e $\lambda_1 = \lambda_2 = \frac{1}{2}$, então o vício assintótico de

$\hat{\delta}_{RM}$ pode ser escrito como:

$$Vicio(\hat{\delta}_{RM}) = \delta \left[\exp\left[\frac{\sigma_T^2 - \sigma_R^2}{2}\right] \left[1 + \frac{1}{4n} \exp(\sigma_e^2) \left[\exp(\sigma_R^2) - 1 \right] \right] - 1 \right]. \quad (3.3.31)$$

RESULTADOS

Os dados coletados no experimento para avaliar a Bioequivalência média foram tratados com o *software WINONLIN*, específico para avaliar Bioequivalência. Foi cedido por um curto prazo. Sua utilização com finalidade acadêmica permitiu que os cálculos das medidas farmacocinéticas e outras análises estatísticas fossem efetuadas de forma rápida e eficiente.

Pode-se observar no Gráfico 1 que ao longo do tempo, as médias, medianas e desvios padrões crescem e em seguida decrescem refletindo um comportamento natural para um fármaco no organismo referente às fases de absorção até à sua eliminação

Gráfico da Concentração Média_SE da Sildenafil_100mg

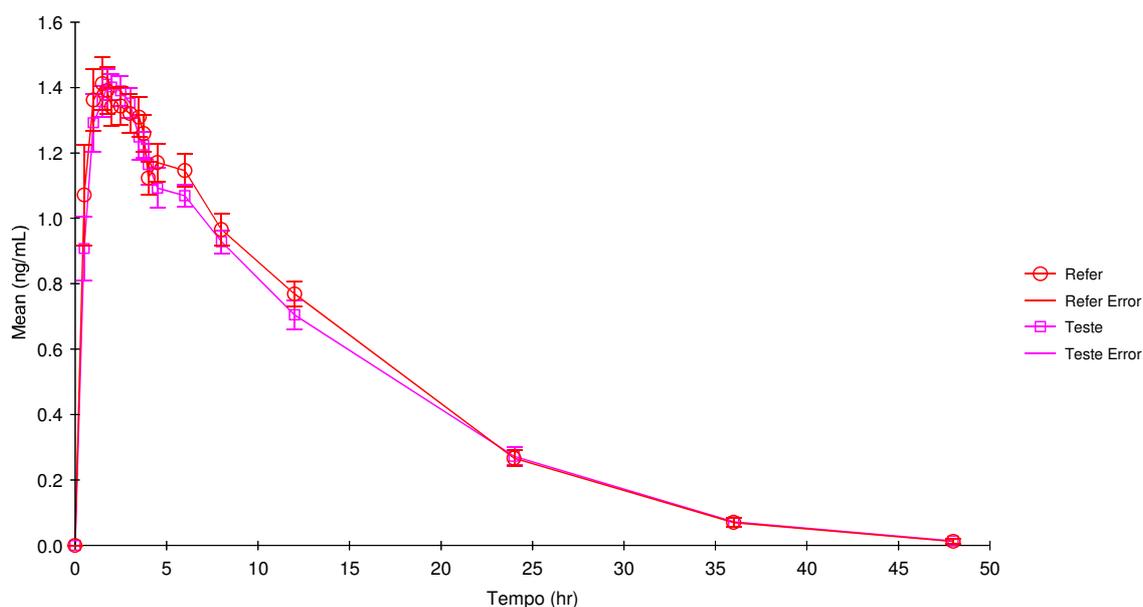


Gráfico 1: Curva de concentração plasmática média \pm desvio padrão da droga teste (T) e referência (R) baseado em 24 voluntários.

Concluí-se que o efeito da sequência não é significativo (Valor-P 0,9275) ao nível de significância de 10%. Observa-se também que o teste de variabilidade inter indivíduos é significativo (valor-P = 0,00428) indicando que há variabilidade entre indivíduos. O efeito da droga e do período e sequência é não significativo.

Tabela 32: ANOVA para o $\log(C_{\max})$

Fonte	Gl	SQ	QM	F	Valor-P
<i>Inter-individual</i>					
<i>Sequência</i>	1	$6,1099 \times 10^{-4}$	$6,1099 \times 10^{-4}$	0,0084	0.9275
<i>Resíduo(inter)</i>	22	15849×10^{-4}	0,07204	32,112	0.0042
<i>Droga</i>	1	$9,5982 \times 10^{-4}$	$9,5982 \times 10^{-4}$	0,00428	0.838
<i>Período</i>	1	$154,338 \times 10^{-4}$	$154,338 \times 10^{-4}$	0,6979	0.4158
<i>Resíduo(intra)</i>	22	$4935,47 \times 10^{-4}$	0.0224339		
<i>Total</i>	47	$6654,5081 \times 10^{-4}$			

Os intervalos de confiança paramétricos estão dentro dos limites de equivalência para a diferença das médias ($\pm 0,2$ com $\alpha = 0,05$) e para a razão das médias ($0,08$ e $1,25$ com $\alpha = 0,05$). Portanto, podemos concluir que existe bioequivalência média entre as formulações (droga) referência (R) e teste (T) segundo a análise de C_{\max} (pico de concentração máxima).

Tabela 33: Intervalo de Confiança Paramétrico para a diferença e razão das médias das formulações R e T utilizando $\log(C_{\max})$

Parâmetro	Método	Estimativa	IC 90%		Conclusão (***)
			L.Inf.	L.Sup.	
$\mu_R - \mu_T$ (*)	Paramétrico	0,00894	-0,653	0,083	BE
μ_T/μ_R (**)	Paramétrico	99,1096	92,0162	106,75	BE

(*) médias na escala logarítmica

(**) média geométricas na escala original

(***) BE= Bioequivalência

Tabela 34: Medidas farmacocinéticas dos 24 voluntários do medicamento teste T

Formulação	Voluntário	C _{max}	T _{max}	K _e	t _{1/2}	ASC _∞	ASC _t
Teste	1	1.821	4.000	0.078	8.932	30.170	28.466
Teste	2	1.427	2.000	0.091	7.648	18.600	17.920
Teste	3	1.577	3.000	0.100	6.940	18.310	17.796
Teste	4	1.421	1.750	0.128	5.402	17.600	16.630
Teste	5	1.710	2.000	0.068	10.151	25.090	24.123
Teste	6	1.617	2.500	0.070	9.967	23.690	21.545
Teste	7	1.730	3.500	0.074	9.352	30.930	29.849
Teste	8	1.693	2.500	0.057	12.210	32.100	28.893
Teste	9	1.920	0.500	0.105	6.583	21.250	19.352
Teste	10	1.662	1.750	0.079	8.733	22.400	19.098
Teste	11	1.250	1.000	0.053	13.188	12.440	10.044
Teste	12	1.617	1.750	0.075	9.278	24.150	22.341
Teste	13	1.427	3.500	0.099	7.033	18.770	16.775
Teste	14	1.930	1.000	0.088	7.870	18.470	16.373
Teste	15	1.883	2.500	0.109	6.358	21.180	20.684
Teste	16	2.247	1.000	0.071	9.816	23.910	22.067
Teste	17	1.461	1.500	0.092	7.531	19.540	18.730
Teste	18	1.880	1.750	0.107	6.457	18.090	16.802
Teste	19	1.262	1.500	0.129	5.354	14.450	13.729
Teste	20	1.324	1.000	0.104	6.687	13.100	12.022
Teste	21	1.787	1.000	0.081	8.569	20.290	19.225
Teste	22	1.366	1.500	0.074	9.349	20.830	19.613
Teste	23	1.998	1.000	0.080	8.718	26.170	25.488
Teste	24	1.563	1.000	0.083	8.310	24.510	23.143

Tabela 35: Estatística descritiva das medidas farmacocinéticas dos 24 voluntários do medicamento teste T

N	24.000	24.000	24.000	24.000	24.000	24.000
Mean	1.649	1.854	0.087	8.352	21.501	20.029
SD	0.255	0.932	0.020	1.934	5.144	5.010
SE	0.052	0.190	0.004	0.395	1.050	1.023
Min	1.250	0.500	0.053	5.354	12.441	10.044
Max	2.247	4.000	0.129	13.188	32.099	29.849
Geometric Mean	1.630	1.641	0.085	8.145	20.906	19.405
95% CI Lower						
Mean	1.541	1.461	0.079	7.535	19.329	17.914
95% CI Upper						
Mean	1.757	2.248	0.096	9.168	23.674	22.145

Tabela 36: Medidas farmacocinéticas dos 24 voluntários do medicamento referência R

Formulação	Voluntário	Cmax	Tmax	K _e	t _{1/2}	ASC _∞	ASC _t
Refer	1	1.447	1.75	0.083	8.328	28.03	26.399
Refer	2	1.289	3	0.102	6.764	19.71	19.097
Refer	3	1.829	1	0.096	7.188	23.06	22.332
Refer	4	1.865	1.5	0.113	6.157	20.79	19.321
Refer	5	1.239	3.75	0.063	11.016	21.14	18.497
Refer	6	1.858	1	0.076	9.104	25.37	23.608
Refer	7	1.789	3.5	0.08	8.696	30.04	29.383
Refer	8	1.971	3.75	0.078	8.936	35.69	34.741
Refer	9	2.102	1.5	0.121	5.714	19.93	18.747
Refer	10	1.693	1	0.094	7.389	19.89	17.768
Refer	11	1.198	3.75	0.063	11.086	20.43	16.243
Refer	12	1.862	1.5	0.094	7.399	19.63	18.837
Refer	13	1.491	3	0.081	8.539	25.67	24.213
Refer	14	2.34	1.75	0.083	8.344	27.11	23.425
Refer	15	2.209	0.5	0.076	9.124	22.03	20.587
Refer	16	2.813	0.5	0.092	7.556	26.93	26.166
Refer	17	2.27	0.5	0.1	6.941	25.25	24.473
Refer	18	1.572	1.5	0.099	6.981	20.6	19.921
Refer	19	1.293	2	0.127	5.441	13.38	12.647
Refer	20	1.457	0.5	0.102	6.764	16.66	15.107
Refer	21	1.513	0.5	0.088	7.871	19.74	19.136
Refer	22	1.042	4	0.103	6.762	17.94	17.349
Refer	23	1.598	1.5	0.064	10.869	25.25	22.852
Refer	24	1.021	4.5	0.096	7.206	10.37	9.409

Tabela 37: Estatística descritiva das medidas farmacocinéticas dos 24 voluntários do medicamento referência R

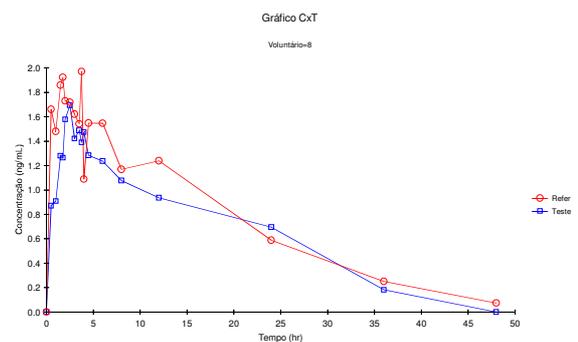
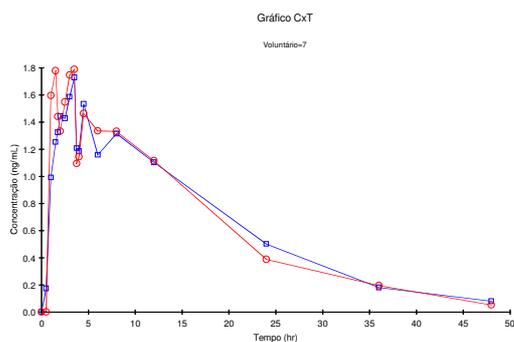
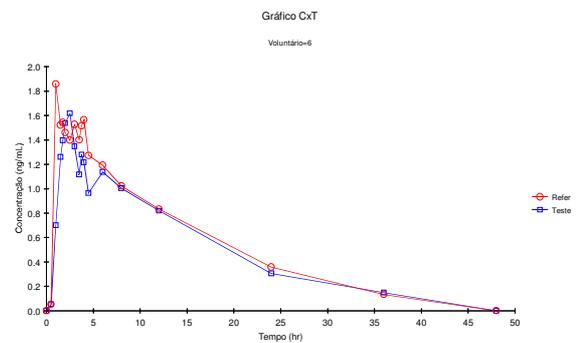
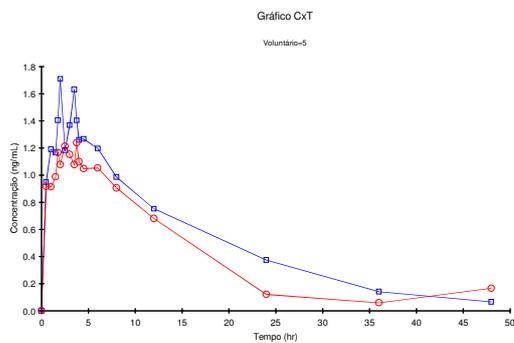
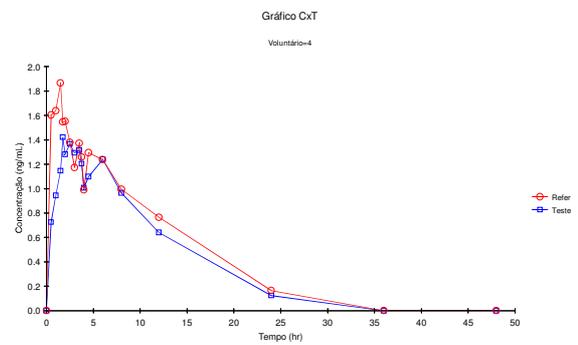
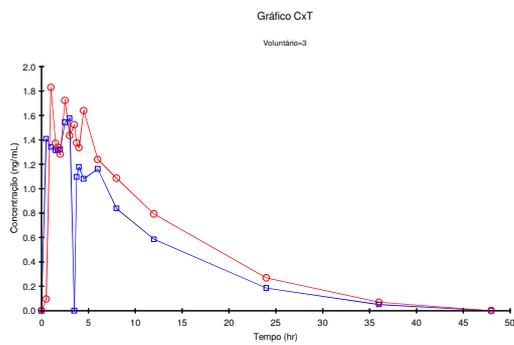
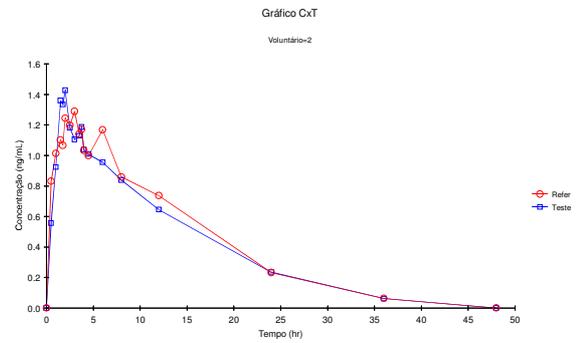
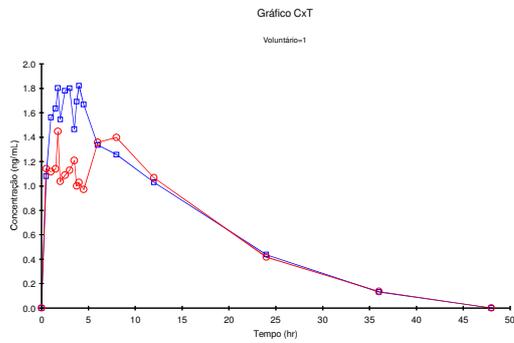
N	24	24	24	24	24	24
Mean	1.698	1.99	0.091	7.924	22.276	20.844
SD	0.442	1.307	0.017	1.55	5.398	5.386
SE	0.09	0.267	0.003	0.316	1.102	1.099
Min	1.021	0.5	0.063	5.441	10.366	9.409
Max	2.813	4.5	0.127	11.086	35.695	34.741
Geometric Mean	1.645	1.56	0.089	7.785	21.608	20.15
95% CI Lower Mean	1.512	1.438	0.083	7.27	19.996	18.57
95% CI Upper Mean	1.885	2.542	0.098	8.578	24.555	23.118

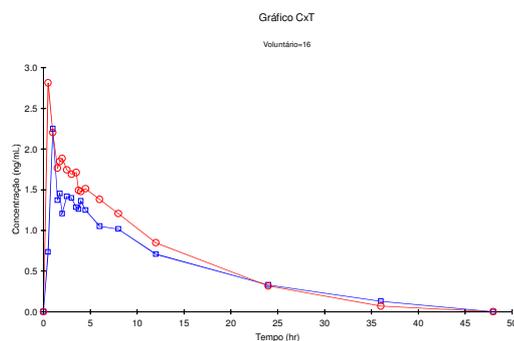
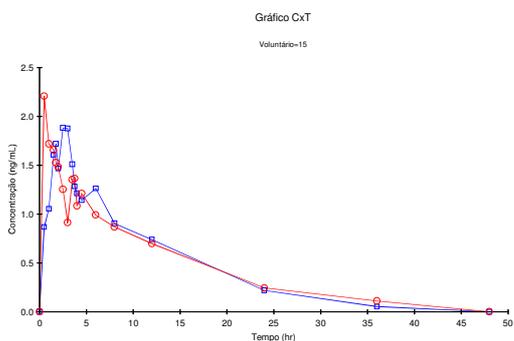
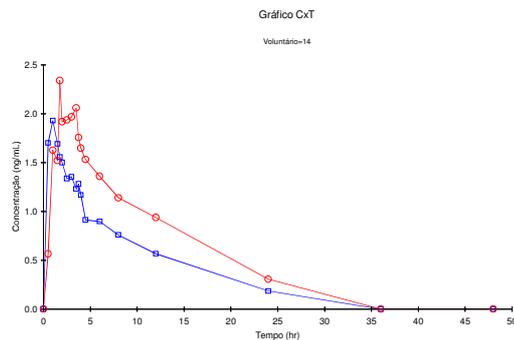
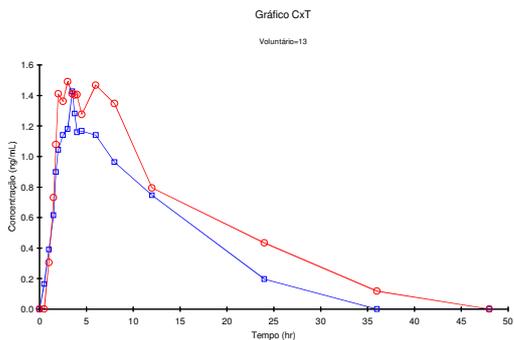
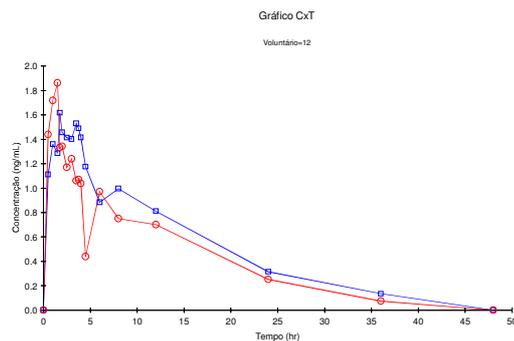
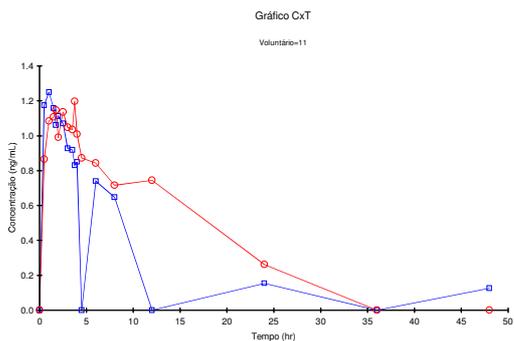
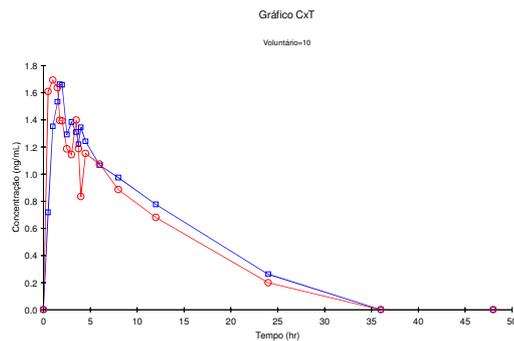
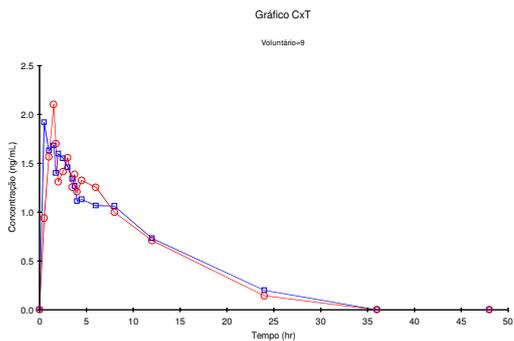
Tabela 38: Análise das medida farmacocinética dos parâmetros não-Paramétricos para T_{max} (intervalos de confiança não-paramétricos para a diferença dos dados não-transformado do T_{max})

Treatment_Diff_(Refer - Teste)	0.0625	0.8	0.8	-0.375	0.5
Treatment_Diff_(Refer - Teste)	0.0625	0.9	0.9	-0.5	0.75
Treatment_Diff_(Refer - Teste)	0.0625	0.95	0.95	-0.5	0.75
Refer	1.5	0.8	0.8	1.5	2
Refer	1.5	0.9	0.9	1	3
Refer	1.5	0.95	0.95	1	3
Teste	1.75	0.8	0.8	1.5	2
Teste	1.75	0.9	0.9	1	2
Teste	1.75	0.95	0.95	1	2
Treatment (SEQ1=SEQ2)	153		0.862		
Period (SEQ1=SEQ2)	128		0.2023		
Treatment & Residual (simultaneous)		0.79	0.6752		

ANEXO

Saída do promama WinNonlin





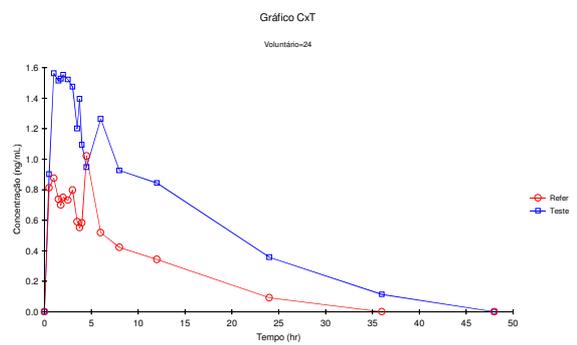
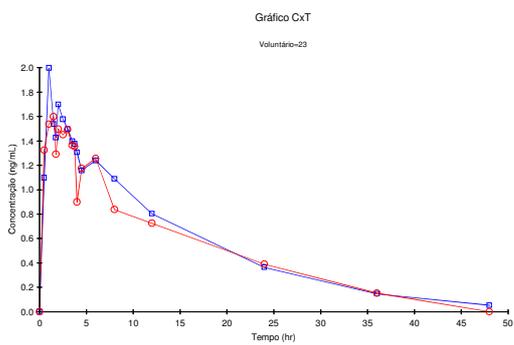
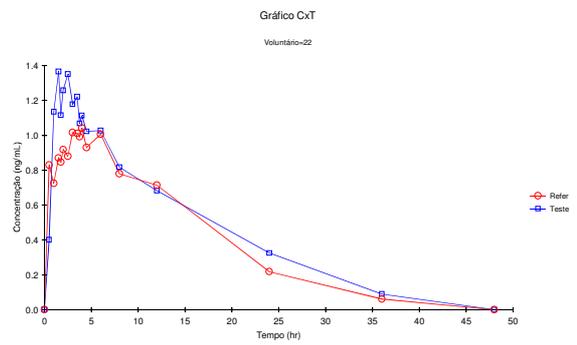
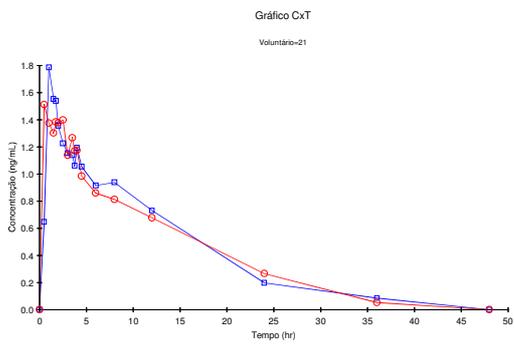
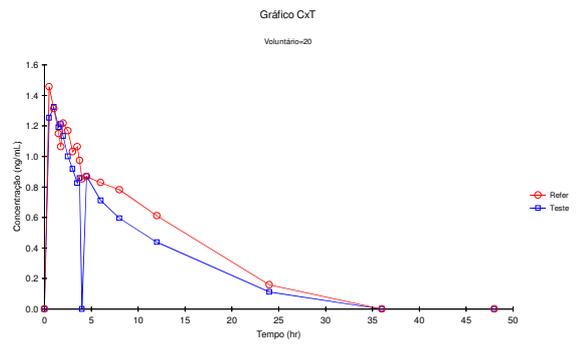
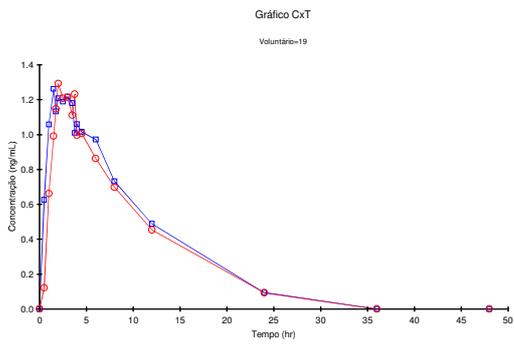
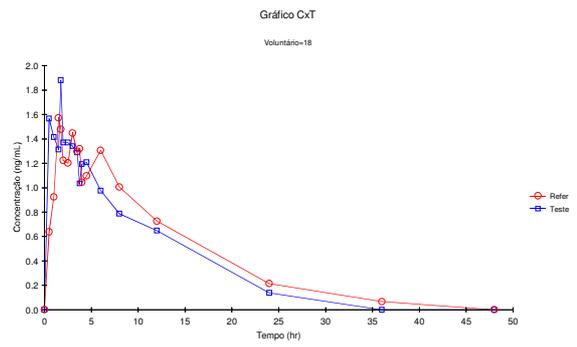
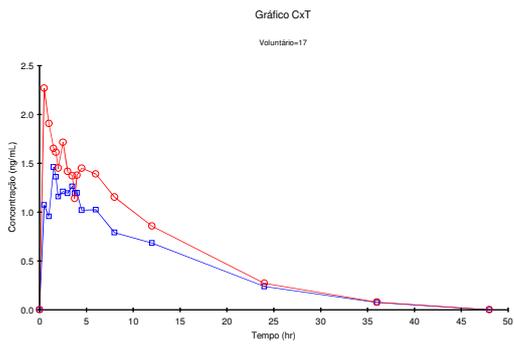


Gráfico da Concentração Média da Sildenafil_100 mg(comprimido)

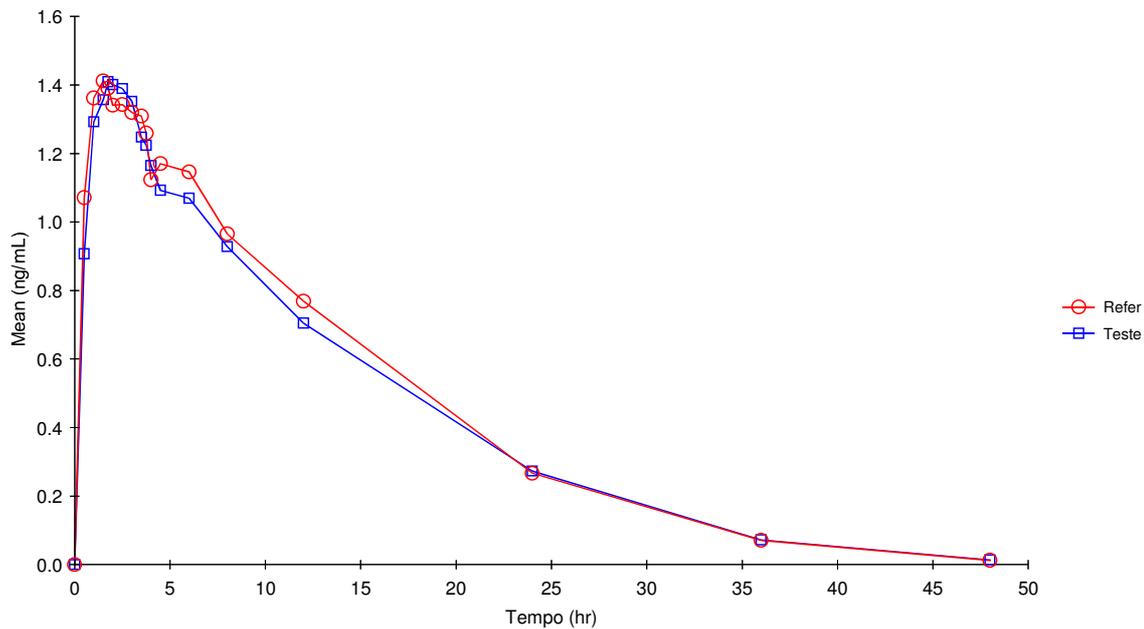


Gráfico da Concentração Média_SE da Sildenafil_100mg

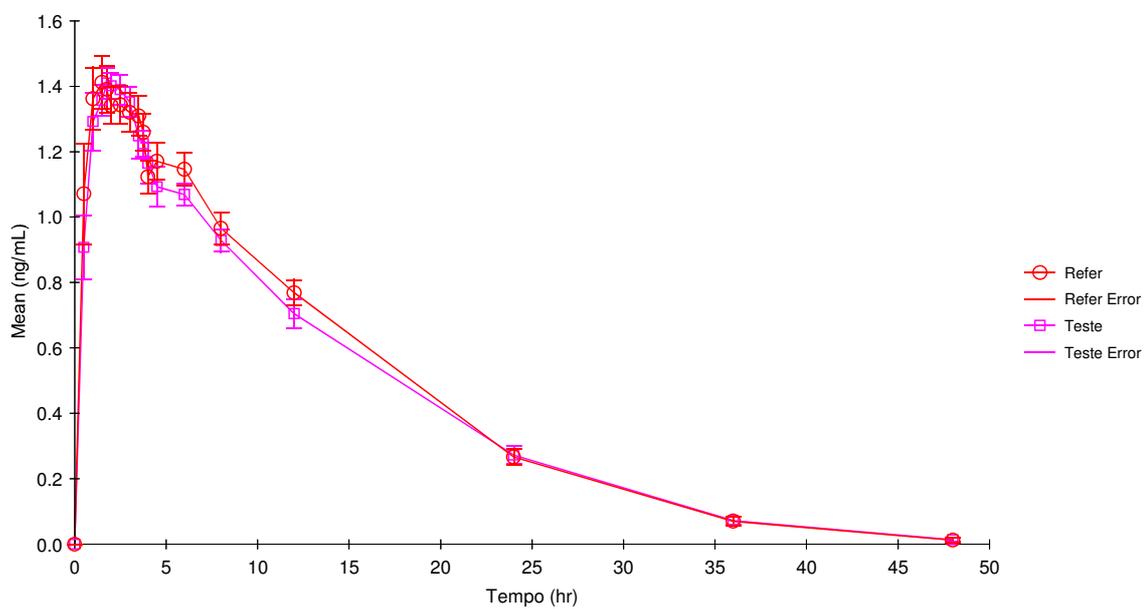


Gráfico da Concentração Mínima, Mediana e Máxima da Sildenafil_100 mg

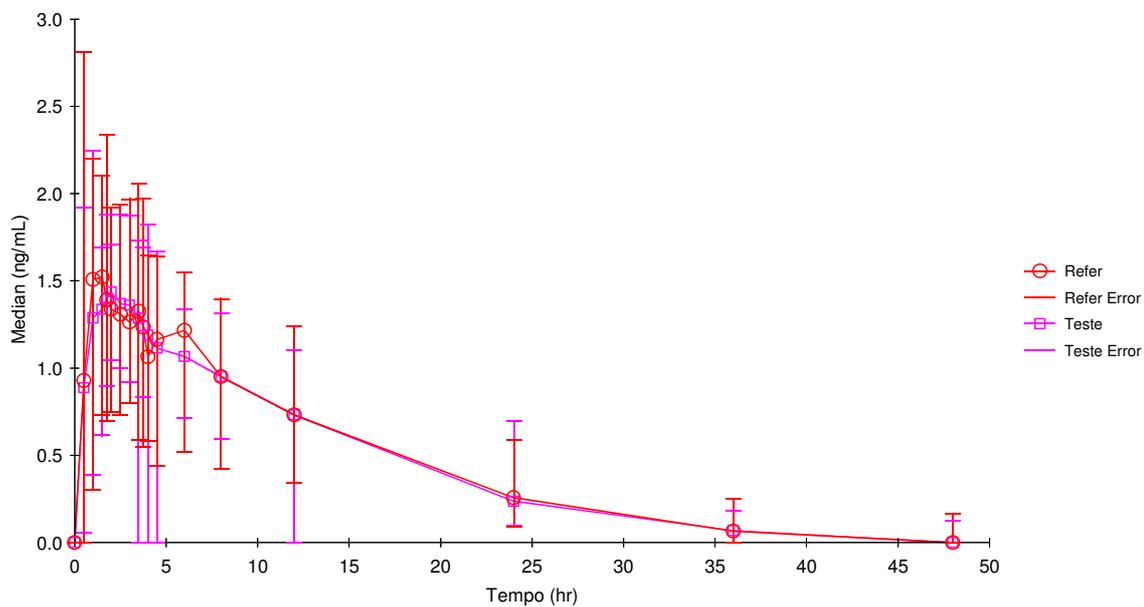
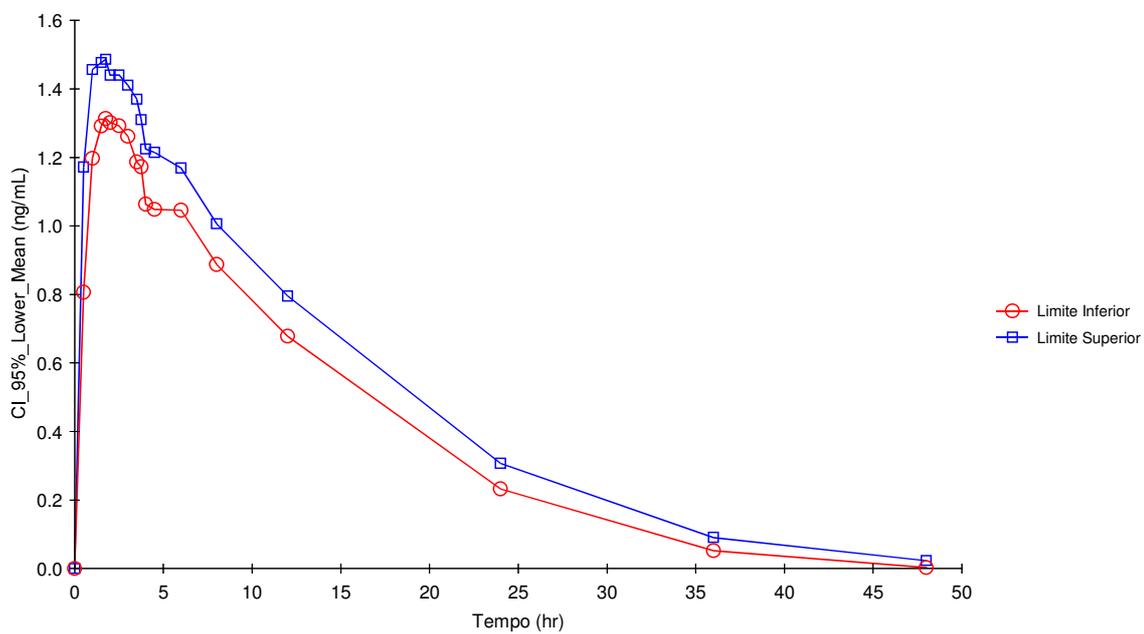
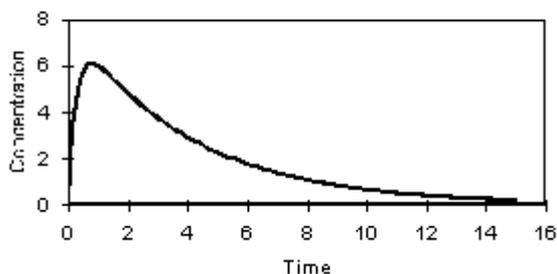


Gráfico da Concentração do IC da Sildenafil_100 mg



NCA Model 200 - [Modelo da Sildenafil_100mg]

Sample Graph



Bioequivalence Text - [Estudo Estatístico de BE.pto] (Detached)

Input File: NCA Workbook - [Untitled5] (Derived)

Date: 12/07/2006

Time: 12:08:10

WINNONLIN LINEAR MIXED EFFECTS MODELING / BIOEQUIVALENCE
Version 5.1 Build 200607251915
Core Version 24Apr2006

Estudo Estatístico de Bioequivalência

Model Specification and User Settings

Dependent variable : Cmax (ng/mL)
Transform : LN
Fixed terms : int+Sequencia+Formulação+Periodo
Random/repeated terms : Sequencia*Voluntário
Maximum iterations : 50
Convergence Criterion : 1e-010
Singularity tolerance : 1e-010
Denominator df option : satterthwaite

Class variables and their levels

			Voluntário :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24								
			Formulação :	Refer	Teste												
			Sequencia :	RT	TR												
			Periodo :	1	2												

Using method of moments for starting values

Starting estimates of variance parameters:

Var(Sequencia*Voluntário) 0.0248035

Var(Residual) 0.0224339

Diagnostics

Total Observations : 48
Observations Used : 48
Obs. Missing Model Terms : 0
Residual SS : 0.493547
Residual df : 22
Residual Variance : 0.0224339

Breakout of variance structure

Variance Index : 1
Source : Random
Type : Variance Components
Columns : Sequencia*Voluntário
Parameters : Var(Sequencia*Voluntário)

Variance Index : 2
Source : Assumed
Type : Identity
Columns : None

```

Parameters : Var(Residual)
-----
Variance parameter estimation at each iteration:
      Objective
Iteration  function Var(Sequencia*Voluntário)  Var(Residual)
      0      -48.7047      0.0248035      0.0224339
Newton's algorithm converged.

Final variance parameter estimates:
Var(Sequencia*Voluntário)  0.0248035
      Var(Residual)      0.0224339
      Intersubject CV    0.158473
      Intrasubject CV   0.150624

      REML log(likelihood)  8.27139
-2* REML log(likelihood) -16.5428
Akaike Information Crit.  -4.54279
      Schwarz Bayesian Crit.  6.16235

Ordered Final Hessian Eigenvalues:
      25059.7
      7394.34

Solution
Effect:Level  Estimate  StdError  Denom_DF  T_stat  P_value  Conf  T_crit  Lower_CI
Upper_CI
-----
--
      int  0.474306  0.0627412  34.5  7.55973  0.0000  95  2.031  0.3469
0.6017
      Sequencia:RT -0.00713555  0.0774817  22-0.0920934  0.9275  95  2.074  -0.1678
0.1536
      Sequencia:TR  Not estimable
Formulação:Refer  0.00894341  0.0432377  22  0.206843  0.8380  95  2.074  -0.08073
0.09861
Formulação:Teste  Not estimable
      Período:1  0.0358629  0.0432377  22  0.829436  0.4158  95  2.074  -0.05381
0.1255
      Período:2  Not estimable

Sequential Tests of Model Effects
-----
      Hypothesis  Numer_DF  Denom_DF  F_stat  P_value
-----
      int  1  22  162.034  0.0000
      Sequencia  1  22  0.00848119  0.9275
      Formulação  1  22  0.042784  0.8380
      Período  1  22  0.687965  0.4158

Sequential Sum of Squares
-----
      Hypothesis  DF  SS  MS  F_stat  P_value
-----
      Sequencia  1  0.000610993  0.000610993  0.00848119  0.9275
      Sequencia*Voluntário  22  1.5849  0.0720409  3.21125  0.0042
      Formulação  1  0.000959815  0.000959815  0.042784  0.8380
      Período  1  0.0154338  0.0154338  0.687965  0.4158
      Error  22  0.493547  0.0224339

Partial Tests of Model Effects
-----
      Hypothesis  Numer_DF  Denom_DF  F_stat  P_value
-----
      int  1  22  162.034  0.0000
      Sequencia  1  22  0.00848119  0.9275
      Formulação  1  22  0.042784  0.8380
      Período  1  22  0.687965  0.4158

Partial Sum of Squares
-----
      Hypothesis  DF  SS  MS  F_stat  P_value
-----
      Sequencia  1  0.000610993  0.000610993  0.00848119  0.9275
      Sequencia*Voluntário  22  1.5849  0.0720409  3.21125  0.0042
      Formulação  1  0.000959815  0.000959815  0.042784  0.8380
      Período  1  0.0154338  0.0154338  0.687965  0.4158
      Error  22  0.493547  0.0224339

Least squares means

```


Using method of moments for starting values
 Starting estimates of variance parameters:
 Var(Sequencia*Voluntário) 0.0352547
 Var(Residual) 0.038924

Diagnostics

Total Observations : 48
 Observations Used : 48
 Obs. Missing Model Terms : 0
 Residual SS : 0.856327
 Residual df : 22
 Residual Variance : 0.038924

Breakout of variance structure

```
-----
      Variance Index : 1
            Source : Random
            Type : Variance Components
            Columns : Sequencia*Voluntário
            Parameters : Var(Sequencia*Voluntário)
-----
      Variance Index : 2
            Source : Assumed
            Type : Identity
            Columns : None
            Parameters : Var(Residual)
-----
```

Variance parameter estimation at each iteration:

Iteration	Objective function	Var(Sequencia*Voluntário)	Var(Residual)
0	-38.0444	0.0352547	0.038924

Newton's algorithm converged.

Final variance parameter estimates:

Var(Sequencia*Voluntário)	0.0352547
Var(Residual)	0.038924
Intersubject CV	0.18943
Intrasubject CV	0.199227
REML log(likelihood)	-2.38889
-2* REML log(likelihood)	4.77779
Akaike Information Crit.	16.7778
Schwarz Bayesian Crit.	27.4829

Ordered Final Hessian Eigenvalues:

8833.06
 3019.95

Solution

Effect:Level	Estimate	StdError	Denom_DF	T_stat	P_value	Conf	T_crit	Lower_CI	Upper_CI
int	2.93064	0.0786229	35.9	37.2747	0.0000	95	2.028	2.771	
3.09 Sequencia:RT	0.0554423	0.0954958	22	0.580573	0.5674	95	2.074	-0.1426	
0.2535 Sequencia:TR	Not estimable								
0.1558 Formulação:Refer	0.0376862	0.0569532	22	0.661704	0.5150	95	2.074	-0.08043	
0.1324 Formulação:Teste	Not estimable								
Periodo:1	0.0143176	0.0569532	22	0.251393	0.8038	95	2.074	-0.1038	
Periodo:2	Not estimable								

Sequential Tests of Model Effects

Hypothesis	Numer_DF	Denom_DF	F_stat	P_value
int	1	22	3906.57	0.0000
Sequencia	1	22	0.337065	0.5674
Formulação	1	22	0.437853	0.5150
Periodo	1	22	0.0631986	0.8038

Sequential Sum of Squares

Hypothesis	DF	SS	MS	F_stat	P_value
------------	----	----	----	--------	---------

Sequencia	1	0.0368862	0.0368862	0.337065	0.5674
Sequencia*Voluntário	22	2.40754	0.109433	2.81147	0.0095
Formulação	1	0.017043	0.017043	0.437853	0.5150
Período	1	0.00245994	0.00245994	0.0631986	0.8038
Error	22	0.856327	0.038924		

Partial Tests of Model Effects

Hypothesis	Numer_DF	Denom_DF	F_stat	P_value
int	1	22	3906.57	0.0000
Sequencia	1	22	0.337065	0.5674
Formulação	1	22	0.437853	0.5150
Período	1	22	0.0631986	0.8038

Partial Sum of Squares

Hypothesis	DF	SS	MS	F_stat	P_value
Sequencia	1	0.0368862	0.0368862	0.337065	0.5674
Sequencia*Voluntário	22	2.40754	0.109433	2.81147	0.0095
Formulação	1	0.017043	0.017043	0.437853	0.5150
Período	1	0.00245994	0.00245994	0.0631986	0.8038
Error	22	0.856327	0.038924		

Least squares means

Formulação	Estimate	StdError	Denom_DF	T_stat	P_value	Conf	T_crit	Lower_CI	Upper_CI
Refer	3.00321	0.0555948	35.9	54.0196	0.0000	90	1.688	2.909	3.097
Teste	2.96552	0.0555948	35.9	53.3417	0.0000	90	1.688	2.872	3.059

Differences between means

Formulação	Estimate	StdError	Denom_DF	T_stat	P_value	Conf	T_crit	Lower_CI	Upper_CI
Refer - Teste	0.0376862	0.0569532	22	0.661704	0.5150	90	1.717	-0.06011	0.1355

Bioequivalence Statistics

User-Specified Confidence Level for CI's and Power = 90.0000
 Percent of Reference to Detect for 2-1 Tests and Power = 20.0%
 A.H.Lower = 0.800 A.H.Upper = 1.250

Formulation variable: Formulação

Reference: Refer LSMeans= 3.003209 SE= 0.055595 GeoLSM= 20.150085

Test: Teste LSMeans= 2.965522 SE= 0.055595 GeoLSM= 19.404837

Difference = -0.0377, Diff_SE= 0.0570, df= 22.0
 Ratio(%Ref) = 96.3015

	Classical	Westlake
CI 80% = (89.3199, 103.8288)	(91.2628, 108.7372)
CI 90% = (87.3274, 106.1978)	(88.9889, 111.0111)
CI 95% = (85.5706, 108.3781)	(87.0382, 112.9618)

Average bioequivalence shown for confidence=90.00 and percent=20.0.

Two One-Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.0018 Prob(> 125%)=0.0001 Max=0.0018 Total=0.0019

Anderson-Hauck Procedure

A.H. p-value = 0.001736

Power of ANOVA for Confidence Level 90.00

Power at 20% = 0.980722

Effect:Level	Estimate	StdError	Denom_DF	T_stat	P_value	Conf	T_crit	Lower_CI	Upper_CI
int	3.01836	0.0743641	36.4	40.5889	0.0000	95	2.027	2.868	
Sequencia:RT	0.0315043	0.089763	22	0.350972	0.7289	95	2.074	-0.1547	
Sequencia:TR	Not estimable								
Formulação:Refer	0.0330164	0.0547965	22	0.602529	0.5530	95	2.074	-0.08062	
Formulação:Teste	Not estimable								
Periodo:1	0.0118698	0.0547965	22	0.216616	0.8305	95	2.074	-0.1018	
Periodo:2	Not estimable								

Sequential Tests of Model Effects

Hypothesis	Numer_DF	Denom_DF	F_stat	P_value
int	1	22	4637.99	0.0000
Sequencia	1	22	0.123182	0.7289
Formulação	1	22	0.363041	0.5530
Periodo	1	22	0.0469227	0.8305

Sequential Sum of Squares

Hypothesis	DF	SS	MS	F_stat	P_value
Sequencia	1	0.0119103	0.0119103	0.123182	0.7289
Sequencia*Voluntário	22	2.12715	0.0966887	2.68343	0.0124
Formulação	1	0.013081	0.013081	0.363041	0.5530
Periodo	1	0.00169071	0.00169071	0.0469227	0.8305
Error	22	0.7927	0.0360318		

Partial Tests of Model Effects

Hypothesis	Numer_DF	Denom_DF	F_stat	P_value
int	1	22	4637.99	0.0000
Sequencia	1	22	0.123182	0.7289
Formulação	1	22	0.363041	0.5530
Periodo	1	22	0.0469227	0.8305

Partial Sum of Squares

Hypothesis	DF	SS	MS	F_stat	P_value
Sequencia	1	0.0119103	0.0119103	0.123182	0.7289
Sequencia*Voluntário	22	2.12715	0.0966887	2.68343	0.0124
Formulação	1	0.013081	0.013081	0.363041	0.5530
Periodo	1	0.00169071	0.00169071	0.0469227	0.8305
Error	22	0.7927	0.0360318		

Least squares means

Formulação	Estimate	StdError	Denom_DF	T_stat	P_value	Conf	T_crit	Lower_CI	Upper_CI
Refer	3.07306	0.0525834	36.4	58.4417	0.0000	90	1.688	2.984	
Teste	3.04005	0.0525834	36.4	57.8138	0.0000	90	1.688	2.951	

Differences between means

Formulação	Estimate	StdError	Denom_DF	T_stat	P_value	Conf	T_crit	Lower_CI	Upper_CI
Refer - Teste	0.0330164	0.0547965	22	0.602529	0.5530	90	1.717	-0.06108	0.1271

Bioequivalence Statistics

User-Specified Confidence Level for CI's and Power = 90.0000
Percent of Reference to Detect for 2-1 Tests and Power = 20.0%
A.H.Lower = 0.800 A.H.Upper = 1.250

Formulation variable: Formulação

Reference: Refer LSMean= 3.073063 SE= 0.052583 GeoLSM= 21.607977

Tabela 38: Concentrações plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (h) para o medicamento Teste (T).

Hora (h)	0.00	0.50	1.00	1.50	1.75	2.00	2.50	3.00	3.50	3.75	4.00	4.50	6.00	8.00	12.00	24.00	36.00	48.00
1	0.000	1.080	1.561	1.634	1.802	1.545	1.779	1.800	1.465	1.691	1.821	1.667	1.335	1.257	1.031	0.437	0.132	0.035
2	0.000	0.556	0.924	1.360	1.334	1.427	1.181	1.105	1.129	1.186	1.038	1.009	0.955	0.839	0.645	0.235	0.062	0.048
3	0.000	1.409	1.340	1.314	1.314	1.322	1.543	1.577	NC	1.096	1.177	1.080	1.161	0.837	0.585	0.185	0.051	0.036
4	0.000	0.725	0.944	1.147	1.421	1.282	1.367	1.294	1.316	1.204	1.007	1.098	1.240	0.965	0.640	0.124	0.045	0.041
5	0.000	0.949	1.191	1.167	1.405	1.710	1.184	1.368	1.631	1.404	1.259	1.267	1.197	0.986	0.752	0.374	0.141	0.066
6	0.000	0.054	0.700	1.261	1.397	1.537	1.617	1.347	1.116	1.280	1.216	0.965	1.137	1.004	0.820	0.306	0.149	0.048
7	0.000	0.174	0.992	1.253	1.325	1.445	1.428	1.588	1.730	1.209	1.186	1.535	1.159	1.316	1.104	0.502	0.181	0.080
8	0.000	0.871	0.909	1.280	1.264	1.579	1.693	1.421	1.488	1.390	1.474	1.284	1.237	1.077	0.936	0.695	0.182	0.037
9	0.000	1.920	1.631	1.683	1.400	1.598	1.552	1.460	1.344	1.268	1.113	1.131	1.067	1.063	0.733	0.200	0.041	0.048
10	0.000	0.718	1.353	1.534	1.662	1.658	1.292	1.384	1.310	1.221	1.345	1.242	1.065	0.975	0.776	0.262	0.019	0.035
11	0.000	1.175	1.250	1.159	1.062	1.113	1.071	0.928	0.919	0.831	0.850	NC	0.740	0.648	NC	0.154	0.000	0.126
12	0.000	1.111	1.360	1.286	1.617	1.457	1.413	1.402	1.530	1.489	1.415	1.175	0.884	0.996	0.811	0.315	0.135	0.047
13	0.000	0.164	0.390	0.615	0.899	1.044	1.140	1.180	1.427	1.282	1.159	1.167	1.140	0.963	0.746	0.197	0.032	0.047
14	0.000	1.701	1.930	1.692	1.556	1.501	1.337	1.354	1.231	1.281	1.168	0.913	0.897	0.759	0.567	0.185	0.001	0.048
15	0.000	0.868	1.053	1.609	1.719	1.465	1.883	1.876	1.511	1.283	1.213	1.142	1.263	0.905	0.739	0.218	0.054	0.024
16	0.000	0.735	2.247	1.372	1.454	1.205	1.419	1.398	1.284	1.260	1.360	1.249	1.051	1.017	0.708	0.329	0.130	0.039
17	0.000	1.073	0.956	1.461	1.361	1.159	1.212	1.194	1.263	1.194	1.197	1.020	1.025	0.791	0.683	0.239	0.075	0.045
18	0.000	1.567	1.415	1.313	1.880	1.371	1.371	1.341	1.289	1.035	1.192	1.208	0.976	0.787	0.648	0.138	0.047	0.027
19	0.000	0.626	1.058	1.262	1.133	1.208	1.189	1.218	1.181	1.009	1.060	1.016	0.972	0.732	0.488	0.094	0.014	0.035
20	0.000	1.253	1.324	1.191	1.211	1.134	1.000	0.918	0.825	0.859	NC	0.870	0.711	0.595	0.438	0.112	0.028	0.039
21	0.000	0.647	1.787	1.553	1.540	1.356	1.226	1.153	1.140	1.062	1.193	1.054	0.916	0.939	0.731	0.197	0.086	0.024
22	0.000	0.401	1.135	1.366	1.116	1.258	1.351	1.178	1.221	1.068	1.113	1.023	1.027	0.817	0.683	0.325	0.090	0.045
23	0.000	1.098	1.998	1.537	1.427	1.699	1.577	1.497	1.397	1.376	1.306	1.158	1.240	1.089	0.803	0.364	0.147	0.054
24	0.000	0.902	1.563	1.514	1.527	1.553	1.522	1.475	1.201	1.396	1.094	0.948	1.264	0.926	0.844	0.358	0.114	0.045

Tabela 39: Concentrações plasmáticas (ng/ml) ao longo do tempo (h) para o medicamento Referência (R).

Hora (h)	0.00	0.50	1.00	1.50	1.75	2.00	2.50	3.00	3.50	3.75	4.00	4.50	6.00	8.00	12.00	24.00	36.00	48.00
1	0.000	1.142	1.117	1.140	1.447	1.037	1.088	1.129	1.208	1.000	1.029	0.972	1.357	1.397	1.067	0.417	0.136	0.048
2	0.000	0.831	1.013	1.102	1.066	1.244	1.198	1.289	1.140	1.170	1.033	0.999	1.168	0.859	0.737	0.232	0.063	0.033
3	0.000	0.096	1.829	1.371	1.338	1.282	1.722	1.434	1.524	1.375	1.336	1.639	1.239	1.085	0.792	0.269	0.070	0.035
4	0.000	1.603	1.638	1.865	1.546	1.552	1.380	1.173	1.372	1.259	0.990	1.294	1.238	0.995	0.765	0.165	0.045	0.025
5	0.000	0.918	0.914	0.988	1.167	1.078	1.214	1.153	1.078	1.239	1.099	1.048	1.053	0.906	0.680	0.121	0.059	0.166
6	0.000	0.053	1.858	1.522	1.543	1.460	1.399	1.527	1.401	1.515	1.566	1.273	1.193	1.023	0.833	0.358	0.134	0.042
7	0.000	0.041	1.597	1.779	1.441	1.334	1.549	1.748	1.789	1.095	1.145	1.464	1.336	1.332	1.116	0.388	0.195	0.052
8	0.000	1.661	1.480	1.859	1.923	1.730	1.719	1.621	1.542	1.971	1.089	1.548	1.547	1.169	1.240	0.588	0.251	0.074
9	0.000	0.938	1.566	2.102	1.701	1.310	1.414	1.557	1.255	1.387	1.207	1.324	1.254	0.998	0.708	0.143	0.048	0.037
10	0.000	1.609	1.693	1.637	1.396	1.393	1.186	1.144	1.399	1.187	0.835	1.153	1.074	0.886	0.681	0.199	0.035	0.029
11	0.000	0.866	1.085	1.108	1.148	0.992	1.137	1.049	1.036	1.198	1.010	0.873	0.844	0.717	0.745	0.262	0.040	0.024
12	0.000	1.439	1.718	1.862	1.332	1.343	1.170	1.239	1.061	1.071	1.038	0.439	0.971	0.750	0.701	0.252	0.074	0.020
13	0.000	0.045	0.305	0.731	1.079	1.411	1.362	1.491	1.411	1.403	1.406	1.276	1.468	1.347	0.794	0.434	0.118	0.030
14	0.000	0.565	1.627	1.521	2.340	1.919	1.937	1.968	2.060	1.758	1.647	1.532	1.360	1.140	0.938	0.306	0.039	0.019
15	0.000	2.209	1.719	1.657	1.527	1.484	1.254	0.913	1.353	1.365	1.084	1.211	0.991	0.869	0.698	0.244	0.110	0.030
16	0.000	2.813	2.202	1.765	1.847	1.883	1.743	1.690	1.711	1.492	1.477	1.513	1.381	1.206	0.848	0.316	0.070	0.018
17	0.000	2.270	1.908	1.653	1.613	1.452	1.715	1.417	1.371	1.141	1.378	1.450	1.391	1.154	0.857	0.272	0.078	0.045
18	0.000	0.638	0.924	1.572	1.479	1.224	1.203	1.448	1.297	1.320	1.045	1.097	1.306	1.005	0.726	0.215	0.067	NQ
19	0.000	0.122	0.662	0.992	1.148	1.293	1.209	1.214	1.112	1.232	0.997	1.006	0.863	0.698	0.454	0.093	0.036	0.024
20	0.000	1.457	1.313	1.150	1.064	1.218	1.169	1.031	1.064	0.974	0.852	0.867	0.829	0.782	0.611	0.159	0.048	0.025
21	0.000	1.513	1.376	1.302	1.384	1.378	1.399	1.139	1.268	1.171	1.175	0.985	0.860	0.813	0.678	0.266	0.053	0.025
22	0.000	0.829	0.725	0.870	0.846	0.918	0.880	1.016	1.011	0.992	1.042	0.930	1.006	0.780	0.714	0.218	0.061	0.033
23	0.000	1.324	1.537	1.598	1.291	1.496	1.450	1.493	1.363	1.354	0.899	1.175	1.255	0.837	0.725	0.390	0.153	0.032
24	0.000	0.813	0.875	0.738	0.699	0.749	0.732	0.797	0.590	0.551	0.582	1.021	0.519	0.422	0.343	0.092	NQ	0.028

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balaam, L. N. (1968). Two-period design with t^2 experimental units. *Biometrics*, 24, 61-73.

Chow, S. C.; Liu, J. P. (2000) *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*. New York: Marcel Dekker.

Crow, E., Shimizu, K. (1988) *Lognormal distribution. Theory and Applications*. Marcel Dekker.

Fisher, R. A (1935) *The Design of Experiments*. Oliver and Boyd.

Grizzle, J. E. (1965) The two-period changeover design and its use in clinical trials. *Biometrics*, 21, 467-480.

Hollander, M; Wolfe; D. A. (1973). *Nonparametrics Statistical Methods*. New York: John Wiley Sons.

Jones, B; Kenward, M. G. (1989) *Design and Analysis of Crossover Trials*. London: Chapman-Hall.

Kunz, R., Oxman, A. D. (1998) *British Medical Journal*, 317, 1185-90.

Resolução – RDC nº.896 de 29 de maio de 2003/ ANVISA / Ministério da Saúde.

Resolução – RDC nº.898 de 29 de maio de 2003/ ANVISA / Ministério da Saúde.

Westlake, W. J. (1974) The use of balanced incomplete block designs in comparative bioavailability trials. *Biometrics*, 30, 319-327.

Williams, E. J. (1949) Experimental designs balanced for the residual effects of treatment. *Australian Journal of Scientific Research*, 2, 149-168.

Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, que aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília, DOU de 16 de outubro de 1996.

Brasil. Lei 9.729 de 14 de agosto de 1996 ou 14 de maio de 1997

Brasil. Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Brasília, DOU de 11 de fevereiro de 1999.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 391, de 09 de agosto de 1999. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos. Brasília, DOU de 10 de agosto de 1999.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 41, de 28 de abril de 2000. Determina que as entidades ou empresas que porventura pretendam cadastrar-se junto à ANVS/MS para se habilitarem à realização dos ensaios de equivalência farmacêutica, biodisponibilidade e/ou bioequivalência deverão proceder ao preenchimento de formulário específico disponível, via Internet, no endereço eletrônico <http://anvs.saude.gov.br>, seção da rede Brasileira de Laboratórios, item cadastramento. Brasília, DOU de 03 de maio de 2000.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 10, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos. Brasília, DOU de 15 de janeiro de 2001

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 135, de 29 de maio de 2003. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos. Brasília, DOU de 02 de junho de 2003^a

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. Estabelece o “Guia de validação de métodos analíticos e bionalíticos”. Brasília, DOU 02 de junho de 2003c.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 897, de 29 de maio de 2003. Estabelece o “Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência”. Brasília. DOU 02 de junho de 2003d

