

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional	
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2 PROTOCOLO ESTATÍSTICO Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023

Protocolo Estatístico: Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional

Action Stat Dissolução Versão 4.2

ESTATCAMP

Dezembro / 2023

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Sumário

1	Aprovação	4
2	Objetivos	5
3	Histórico de Revisões	6
4	Perfil de Dissolução Comparativo	7
4.1	Modelo Independente Simples	8
4.1.1	Coeficiente de Variação	9
4.1.2	Fator de Similaridade	9
4.1.3	Fator de Diferença	9
4.1.4	Aplicação	10
4.2	Modelo Independente Multivariado	16
4.2.1	Distância de Mahalanobis	16
4.2.2	Passos para a aplicação do MIM	17
4.2.3	Comparação entre dois medicamentos de referência	19
4.2.4	Testes de Normalidade Multivariada	23
4.2.5	Teste de Igualdade das Matrizes de Covariância	26
4.2.6	Aplicação 1	27
4.2.7	Aplicação 2	33
4.3	Fator de Similaridade via <i>bootstrap</i>	40
4.3.1	Aplicação	42
4.4	Modelo Dependente	45
4.4.1	Gráfico de médias transformadas	50
4.4.2	Aplicação	51
4.5	Cálculo de fator de correção para perfil de dissolução	60
4.5.1	Aplicação	61
5	Teste de Bioequivalência Populacional <i>in vitro</i>	61
5.1	Teste por bioequivalência <i>in vitro</i> via métricas convencionais	63
5.2	Aplicação	63
5.3	Teste de bioequivalência populacional <i>in vitro</i> via EMD	66
5.3.1	Distância EMD	66
5.3.2	Passos para a análise de bioequivalência via distância EMD	67
5.4	Aplicação	68
6	Teste de Dissolução (USP três estágios)	70
6.1	Liberação Imediata	71
6.2	Liberação Prolongada	72
6.3	Liberação Retardada	72
6.3.1	Estágio Ácido	72
6.3.2	Estágio Tampão	73
6.4	Aplicação 1: Liberação imediata	74
6.5	Aplicação 2: Liberação prolongada	76
6.6	Aplicação 3: Liberação retardada	79

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

7	Alta e Baixa Solubilidade	81
7.1	Aplicação	81
8	Estabilidade da Amostra	82
8.1	Aplicação	83
9	Filtro	84
9.1	Aplicação	84
	Referências	86

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2 PROTOCOLO ESTATÍSTICO	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023

1 Aprovação

A assinatura abaixo indica a aprovação deste relatório.

ELABORADO POR:

NOME: Dorival Leão Pinto Júnior **CARGO:** Consultor estatístico

Registro CONRE: 9795



ASSINATURA:

DATA: 1 de dezembro de 2023

	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

2 Objetivos

Este protocolo estatístico tem por finalidade apresentar e elucidar os métodos estatísticos utilizados na ferramenta perfil de dissolução do Action Stat, sendo eles o cálculo do fator de similaridade e de diferença, o modelo independente multivariado e o modelo dependente. O descrever da metodologia esta separado por tópicos:

- Perfil de dissolução comparativo
 - Modelo Independente Simples: Fator de similaridade e diferença
 - Modelo Independente Multivariado
 - Fator de similaridade via *bootstrap*
 - Modelo Dependente
- Teste de bioequivalência populacional *in vitro*
- Teste de Dissolução (USP três estágios)
- Alta e Baixa Solubilidade
- Estabilidade da Amostra
- Filtro

Em cada tópico são descritas as técnicas estatísticas utilizadas e são dados também exemplos de aplicação demonstrando as contas calculadas de forma manual e os resultados do Action Stat.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

3 Histórico de Revisões

Nesta seção apresenta-se o histórico das revisões do protocolo de perfil de dissolução.

Tabela 1: Histórico de Revisões

Tópico	Alteração	Versão
Perfil de Dissolução	Emissão	00
Perfil de Dissolução	Novas seções: Bioequivalência, 3 Estágios, Alta Solubilidade, Estabilidade e Filtro	01

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

4 Perfil de Dissolução Comparativo

O teste de dissolução é uma importante ferramenta na indústria farmacêutica, tanto no desenvolvimento de novos produtos quanto no controle da qualidade de novos medicamentos. É por meio do teste de dissolução que se analisa a equivalência entre os perfis de dissolução dos respectivos medicamentos, isto é, se a liberação do princípio ativo do medicamento teste que se torna disponível para ser absorvido pelo organismo é equivalente a liberação do princípio ativo do medicamento referência.

O modelo independente simples, sugerido pela ANVISA [1], é o método usual para avaliar a equivalência entre os perfis de dissolução e consiste em aplicar dois fatores, o fator de diferença f_1 e o fator de similaridade f_2 . Existe equivalência entre os perfis de dissolução por meio do fator de similaridade, quando o mesmo está entre os valores 50 e 100. Já para o fator de diferença, conclui-se equivalência entre os perfis de dissolução, quando o fator f_1 calculado estiver entre os valores 0 e 15. Contudo, quando algum dos coeficientes de variação para os primeiros pontos de coleta, pontos correspondentes a 40% dos tempos de coleta iniciais, excedem 20% ou algum dos coeficientes de variação para os demais pontos de coleta excedem 10%, os fatores do modelo independente simples não podem ser aplicados.

Neste cenário, alternativas para o estudo do perfil de dissolução comparativo são o modelo independente multivariado e o modelo dependente, métodos sugeridos pelo FDA [2], bem como o fator de similaridade via *bootstrap*, apresentado em [3]. A principal diferença entre os fatores de similaridade e diferença (modelo independente simples) e o modelo independente multivariado é que o modelo independente multivariado utiliza uma distância que depende da variabilidade dos dados. Já o modelo dependente utiliza o ajuste de um modelo e, por fim, o fator de similaridade via *bootstrap* utiliza um estudo de simulação para a análise da similaridade entre os perfis.

O fluxograma para a determinação da metodologia mais adequada ao estudo de perfil de dissolução comparativo é apresentado na Figura 1.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

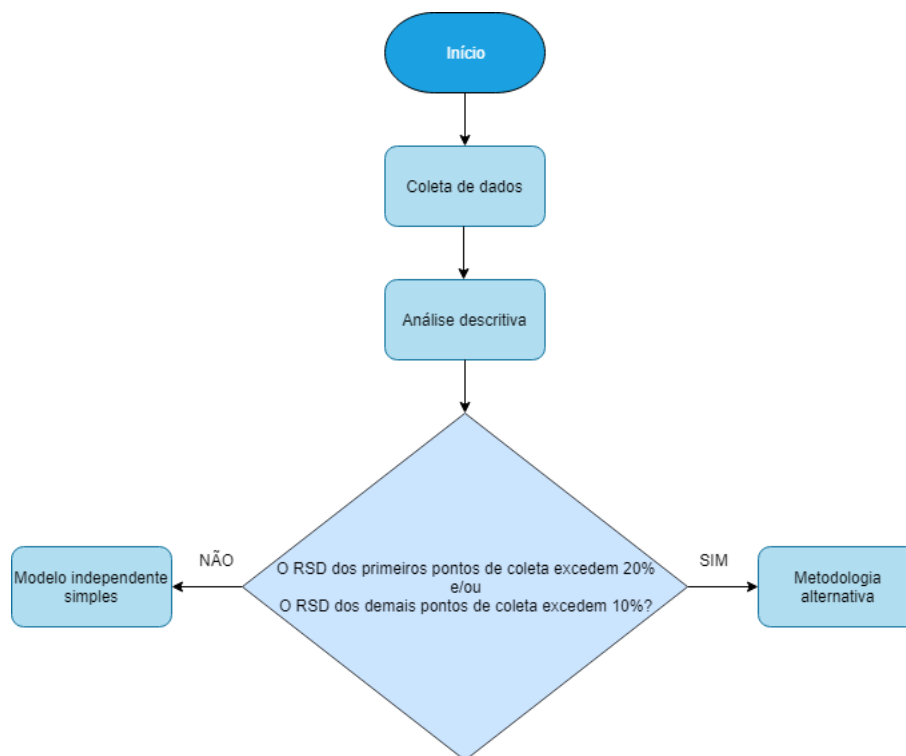


Figura 1: Fluxograma da determinação da metodologia.

4.1 Modelo Independente Simples

Nesta seção detalha-se o modelo independente simples. Segundo a resolução [1] da ANVISA e o guia [2] do FDA, para que dois perfis de dissolução sejam considerados equivalentes por meio do modelo independente simples, devem atender os seguintes critérios:

- os Medicamentos Teste e de Referência devem apresentar tipos de dissoluções correspondentes;
- o valor do fator de similaridade f_2 deve estar compreendido entre 50 a 100 e o valor do fator de diferença deve estar compreendido entre 0 a 15;
- os tempos de coleta devem ser os mesmos para as duas formulações;
- o número de pontos de coleta deve ser representativo do processo de dissolução até que se obtenha platô na curva, sendo obrigatória a quantificação de amostras de, no mínimo, cinco tempos de coleta;
- para fins de cálculo do f_1 e f_2 , utilizar, no mínimo, os três primeiros pontos, excluindo o tempo zero;
- para fins de cálculo do f_1 e do f_2 , incluir apenas um ponto da curva após ambos os medicamentos atingirem a média de 85% de dissolução;

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

- para permitir o uso de médias, os coeficientes de variação para os primeiros pontos de coleta não podem exceder 20%. Para os demais pontos considera-se o máximo de 10%. São considerados como primeiros pontos de coleta o correspondente a 40% do total de pontos coletados. Por exemplo, para um perfil de dissolução com cinco tempos de coleta, consideram-se primeiros pontos os dois primeiros tempos de coleta.

4.1.1 Coeficiente de Variação

Como mencionado na Seção 4, para que o modelo independente simples possa ser aplicado, é necessário avaliar se as exigências estabelecidas sobre os coeficientes de variação são satisfeitas. Estas exigências são impostas de modo a limitar a variabilidade em cada ponto de coleta, uma vez que os fatores f_1 e f_2 utilizam apenas medidas de posição.

O coeficiente de variação é uma medida padronizada de dispersão, sendo definido como a razão entre o desvio padrão estimado pela média amostral. Seja s o desvio padrão estimado e $\bar{x}$ a média amostral para cada ponto de coleta, o estimador do coeficiente de variação é dado por:

$$\widehat{CV} = \frac{s}{\bar{x}}.$$

4.1.2 Fator de Similaridade

Definido por Moore e Flanner em 1996 [4], o Fator de Similaridade é a medida usual para avaliar a equivalência dos perfis de dissolução, sendo definido por:

$$f_2 = 50 \log_{10} \left(\left(1 + \frac{\sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{y}_i)^2}{p} \right)^{-0,5} 100 \right) \quad (1)$$

em que:

- p é o número de pontos de coleta;
- $\bar{x}_i$ é a média das dissoluções do referência para o i -ésimo tempo de coleta;
- $\bar{y}_i$ é a média das dissoluções do teste para o i -ésimo tempo de coleta.

4.1.3 Fator de Diferença

O Fator de Diferença f_1 é uma medida pontual utilizada na equivalência de perfis no caso do modelo independente simples. O Fator de Diferença calcula a diferença em % entre os dois perfis em cada tempo e consiste em uma medida do erro relativo entre os dois perfis:

$$f_1 = \frac{\sum_{i=1}^p |\bar{x}_i - \bar{y}_i|}{\sum_{i=1}^p \bar{x}_i} \times 100\%$$

em que:

- p é o número de pontos de coleta;
- $\bar{x}_i$ é a média das dissoluções do referência para o i -ésimo tempo de coleta;
- $\bar{y}_i$ é a média das dissoluções do teste para o i -ésimo tempo de coleta.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

O critério utilizado no fator de diferença é, se $0 \leq f_1 \leq 15\%$, a equivalência entre os perfis é aceita, caso contrário, não aceitamos a equivalência.

A seguir, apresenta-se o fluxograma para a aplicação do modelo independente simples no estudo perfil de dissolução comparativo, Figura 2.

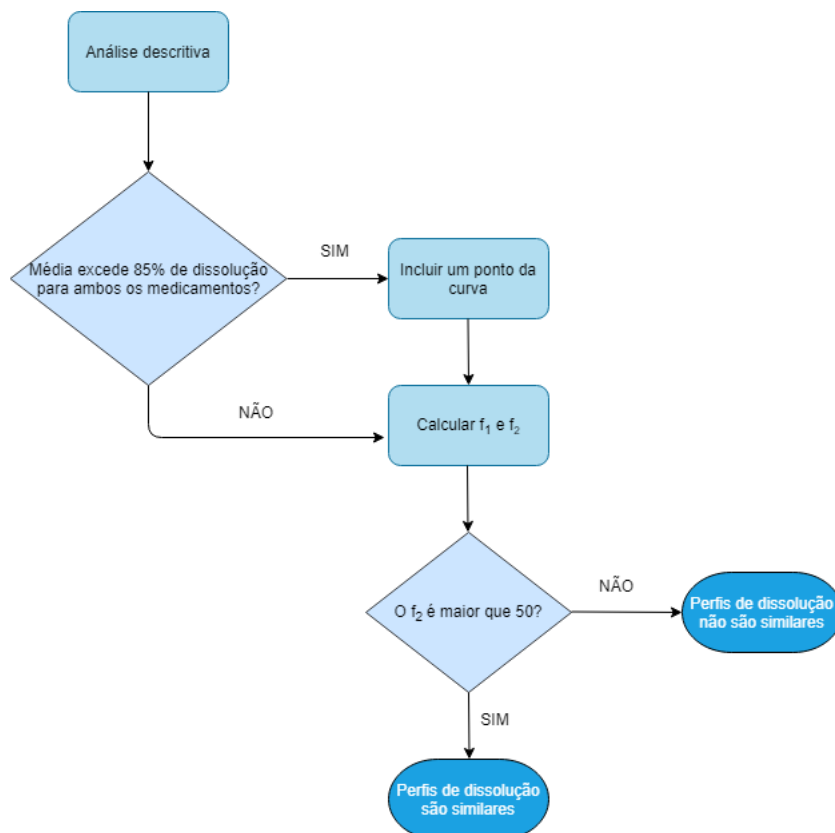


Figura 2: Fluxograma do modelo independente simples.

4.1.4 Aplicação

Tem-se as seguintes medições exibidas na Tabela 2. Foram utilizadas 12 amostras para o medicamento teste e 12 para o medicamento de referência em 7 diferentes tempos de coleta. Aplicam-se os passos descritos na seção 4.1.

Primeiramente calcula-se o vetor de médias das medições de dissolução para o medicamento de teste e de referência. Sendo $\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_n$ e $\mathbf{y}_1, \dots, \mathbf{y}_m$ as dissoluções do medicamento de referência e de teste, tem-se:

$$\bar{\mathbf{x}}_1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{1i} = \frac{9,052 + \dots + 7,347}{12} = 9,739$$

$$\bar{\mathbf{x}}_2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{2i} = \frac{19,621 + \dots + 17,915}{12} = 17,995$$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 2: Experimento perfil de dissolução - exemplo 1.

Medicamento	10	15	20	30	45	60	90
Teste	4,447211	6,676777	17,97265	38,41231	74,33061	87,07301	93,73867
Teste	6,911449	9,236841	18,04717	38,89742	74,34231	85,85281	93,71245
Teste	6,297723	6,097209	18,16644	37,20107	75,13821	85,64233	95,36936
Teste	7,291583	8,464648	18,12143	39,2817	76,50749	85,28448	93,74845
Teste	6,1795	8,690881	17,69454	38,64857	76,2731	87,07596	93,19338
Teste	6,28397	8,544052	17,62469	39,54655	76,26338	85,52231	94,38614
Teste	6,904296	7,420781	18,8003	38,17453	74,69602	86,8076	94,61373
Teste	5,559168	6,621777	19,3979	38,99274	74,23254	86,87937	94,99449
Teste	7,53353	7,961008	18,32628	38,67826	76,31552	86,07635	94,15828
Teste	6,368516	7,872004	17,93695	39,57193	75,01048	85,52524	94,67581
Teste	5,653523	7,161945	19,22604	37,61278	75,69893	86,78667	93,83007
Teste	5,899801	7,882108	17,9522	36,40311	75,93099	88,26274	93,70567
Referência	9,051624	19,62095	25,7419	46,86086	86,91256	93,26098	98,29941
Referência	8,943188	17,12295	28,70118	46,05174	84,07297	96,59048	100,426
Referência	9,950955	16,97342	29,10791	47,33912	85,76344	95,26156	99,61632
Referência	10,89442	18,38186	28,23038	48,91314	84,86284	96,93756	100,5006
Referência	9,685285	19,14906	29,33318	48,01121	86,22612	94,8678	100,9795
Referência	10,21548	17,58594	26,74063	48,23474	86,70814	93,97161	97,89668
Referência	11,21916	18,43402	29,23465	46,92073	84,57016	95,00845	98,94096
Referência	9,827234	17,69795	27,12492	47,95666	85,74829	97,92509	100,7573
Referência	10,32502	17,5657	28,76808	46,86251	87,73023	96,06223	101,7472
Referência	9,62915	17,35696	29,27765	49,40652	84,70598	96,78184	101,2163
Referência	9,783233	18,13203	28,01477	47,7301	85,893	95,48108	101,4122
Referência	7,346516	17,91542	28,56962	48,51934	85,27902	95,46368	100,6295

$$\bar{x}_3 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{3i} = \frac{25,742 + \dots + 28,570}{12} = 28,237$$

$$\bar{x}_4 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{4i} = \frac{46,861 + \dots + 48,519}{12} = 47,734$$

$$\bar{x}_5 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{5i} = \frac{86,913 + \dots + 85,279}{12} = 85,706$$

$$\bar{x}_6 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{6i} = \frac{93,261 + \dots + 95,464}{12} = 95,634$$

$$\bar{x}_7 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{7i} = \frac{98,299 + \dots + 100,629}{12} = 100,202$$

$$\bar{y}_1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_{1i} = \frac{4,447 + \dots + 5,9}{12} = 6,278$$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$\bar{y}_2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_{2i} = \frac{6,677 + \dots + 7,882}{12} = 7,719$$

$$\bar{y}_3 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_{3i} = \frac{17,973 + \dots + 17,952}{12} = 18,272$$

$$\bar{y}_4 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_{4i} = \frac{38,412 + \dots + 36,403}{12} = 38,452$$

$$\bar{y}_5 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_{5i} = \frac{74,331 + \dots + 75,931}{12} = 75,395$$

$$\bar{y}_6 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_{6i} = \frac{87,073 + \dots + 88,263}{12} = 86,399$$

$$\bar{y}_7 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_{7i} = \frac{93,739 + \dots + 93,706}{12} = 94,177$$

Então, o vetor de médias dos medicamentos de referência e teste são:

$$\bar{\mathbf{x}} = (9,739; 17,995; 28,237; 47,734; 85,706; 95,634; 100,202)^T$$

e

$$\bar{\mathbf{y}} = (6,278; 7,719; 18,272; 38,452; 75,395; 86,399; 94,177)^T$$

O próximo passo é calcular os coeficientes de variações CV_{ref} e CV_{test} para cada ponto de coleta. Sendo s_{ref_i} e s_{test_i} os desvios padrão da dissolução dos medicamentos teste e de referência, para $i = 1, \dots, 7$. Tem-se:

$$s_{\text{ref}_1} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{1i} - \bar{y}_1)^2}{n-1}} = 1$$

$$CV_{\text{ref}_1} = \frac{s_{\text{ref}_1}}{\bar{y}_1} \times 100\% = \frac{1}{9,739} \times 100\% = 10,266\%$$

$$s_{\text{ref}_2} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{2i} - \bar{y}_2)^2}{n-1}} = 0,797$$

$$CV_{\text{ref}_2} = \frac{s_{\text{ref}_2}}{\bar{y}_2} \times 100\% = \frac{0,797}{17,995} \times 100\% = 4,431\%$$

$$s_{\text{ref}_3} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{3i} - \bar{y}_3)^2}{n-1}} = 1,144$$

$$CV_{\text{ref}_3} = \frac{s_{\text{ref}_3}}{\bar{y}_3} \times 100\% = \frac{1,144}{28,237} \times 100\% = 4,052\%$$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$s_{\text{ref}_4} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{4i} - \bar{y}_4)^2}{n-1}} = 0,97$$

$$CV_{\text{ref}_4} = \frac{s_{\text{ref}_4}}{\bar{y}_4} \times 100\% = \frac{0,97}{47,734} \times 100\% = 2,032\%$$

$$s_{\text{ref}_5} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{5i} - \bar{y}_5)^2}{n-1}} = 1,075$$

$$CV_{\text{ref}_5} = \frac{s_{\text{ref}_5}}{\bar{y}_5} \times 100\% = \frac{1,075}{85,706} \times 100\% = 1,255\%$$

$$s_{\text{ref}_6} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{6i} - \bar{y}_6)^2}{n-1}} = 1,312$$

$$CV_{\text{ref}_6} = \frac{s_{\text{ref}_6}}{\bar{y}_6} \times 100\% = \frac{1,312}{95,634} \times 100\% = 1,372\%$$

$$s_{\text{ref}_7} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{7i} - \bar{y}_7)^2}{n-1}} = 1,243$$

$$CV_{\text{ref}_7} = \frac{s_{\text{ref}_7}}{\bar{y}_7} \times 100\% = \frac{1,243}{100,202} \times 100\% = 1,24\%$$

$$s_{\text{test}_1} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_{1i} - \bar{x}_1)^2}{n-1}} = 0,843$$

$$CV_{\text{test}_1} = \frac{s_{\text{test}_1}}{\bar{x}_1} \times 100\% = \frac{0,843}{6,278} \times 100\% = 13,429\%$$

$$s_{\text{test}_2} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_{2i} - \bar{x}_2)^2}{n-1}} = 0,949$$

$$CV_{\text{test}_2} = \frac{s_{\text{test}_2}}{\bar{x}_2} \times 100\% = \frac{0,949}{7,719} \times 100\% = 12,298\%$$

$$s_{\text{test}_3} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_{3i} - \bar{x}_3)^2}{n-1}} = 0,572$$

$$CV_{\text{test}_3} = \frac{s_{\text{test}_3}}{\bar{x}_3} \times 100\% = \frac{0,572}{18,272} \times 100\% = 3,131\%$$

$$s_{\text{test}_4} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_{4i} - \bar{x}_4)^2}{n-1}} = 0,966$$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$CV_{\text{test}_4} = \frac{s_{\text{test}_4}}{\bar{x}_4} \times 100\% = \frac{0,966}{38,452} \times 100\% = 2,513\%$$

$$s_{\text{test}_5} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_{5i} - \bar{x}_5)^2}{n-1}} = 0,868$$

$$CV_{\text{test}_5} = \frac{s_{\text{test}_5}}{\bar{x}_5} \times 100\% = \frac{0,868}{75,395} \times 100\% = 1,151\%$$

$$s_{\text{test}_6} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_{6i} - \bar{x}_6)^2}{n-1}} = 0,888$$

$$CV_{\text{test}_6} = \frac{s_{\text{test}_6}}{\bar{x}_6} \times 100\% = \frac{0,888}{86,399} \times 100\% = 1,028\%$$

$$s_{\text{test}_7} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_{7i} - \bar{x}_7)^2}{n-1}} = 0,638$$

$$CV_{\text{test}_7} = \frac{s_{\text{test}_7}}{\bar{x}_7} \times 100\% = \frac{0,638}{94,177} \times 100\% = 0,677\%$$

Tabela 3: Tabela de coeficientes de variação exemplo 1.

Conjuntos	10	15	20	30	45	60	90
Teste	13,43%	12,3%	3,13%	2,51%	1,15%	1,03%	0,68%
Referência	10,27%	4,43%	4,05%	2,03%	1,25%	1,37%	1,24%

O coeficiente de variação para os primeiros 40% pontos de coleta, os primeiros 3 pontos, são menores que 20% nos dois medicamentos e os demais pontos de coleta são menores que 10%. Assim, pode-se aplicar os fatores de similaridade e de diferença para avaliar a similaridade dos medicamentos.

Tabela 4: Tabela de Médias de Dissolução Exemplo 1

Conjuntos	10	15	20	30	45	60	90
Teste	6,278	7,719	18,272	38,452	75,395	86,399	94,177
Referência	9,739	17,995	28,237	47,734	85,706	95,634	100,202

A partir da dissolução no tempo de coleta 60, como pode-se observar na Tabela 4, as médias do grupo teste e referência são superiores a 85. Como descrito em 4.1, no cálculo do fator de similaridade e de diferença são utilizadas as dissoluções até o primeiro tempo em que a dissolução de ambos os medicamentos sejam superiores a 85.

Tem-se que a soma do quadrado das diferenças das médias é dada por:

$$\sum_{i=1}^6 (\bar{x}_i - \bar{y}_i)^2 = 11,984 + 105,586 + 99,298 + 86,158 + 106,319 + 85,291 = 494,636$$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Assim, obtém-se o fator de similaridade f_2 .

$$f_2 = 50 \log_{10} \left(\left(1 + \frac{494,636}{6} \right)^{-0,5} 100 \right) = 51,966$$

Para o cálculo do fator de diferença, calcula-se as seguintes somas:

$$\sum_{i=1}^6 |\bar{x}_i - \bar{y}_i| = 3,462 + 10,276 + 9,965 + 9,282 + 10,311 + 9,235 = 52,531$$

$$\sum_{i=1}^6 \bar{x}_i = 285,045$$

E obtém-se o fator de diferença

$$f_1 = \frac{52,531}{285,045} \times 100\% = 18,4289\%$$

Tomando como critério o fator de similaridade, tem-se que $f_2 > 50$. Assim, conclui-se que os experimentos são equivalentes.

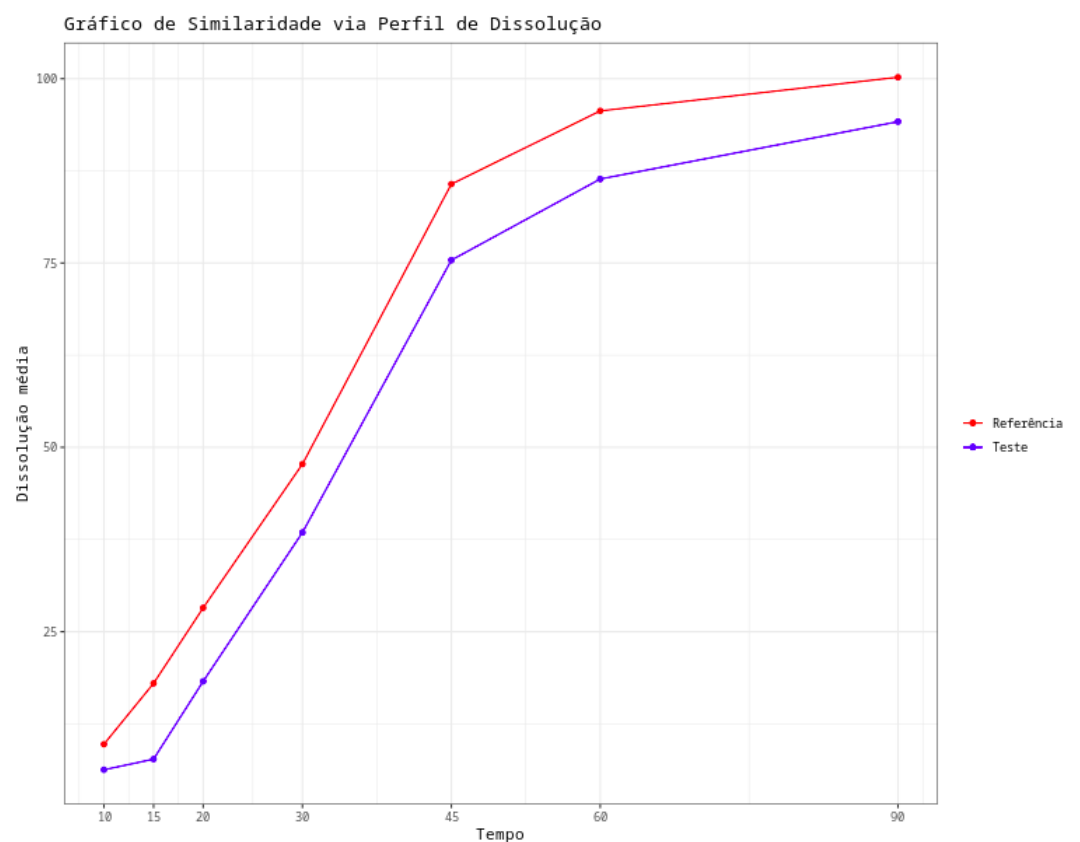
Veja a seguir os resultados obtidos pelo Action Stat:

Resumo Descritivo para Medicamento Referência							
	10	15	20	30	45	60	90
Média	9.739	17.995	28.237	47.734	85.706	95.634	100.202
Desvio-padrão	1	0.797	1.144	0.97	1.075	1.312	1.243
RSD (%)	10.268	4.429	4.051	2.032	1.254	1.372	1.24

Resumo Descritivo para Medicamento Teste							
	10	15	20	30	45	60	90
Média	6.278	7.719	18.272	38.452	75.395	86.399	94.177
Desvio-padrão	0.843	0.949	0.572	0.966	0.868	0.888	0.638
RSD (%)	13.428	12.294	3.13	2.512	1.151	1.028	0.677

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão:
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	1 de dezembro de 2023

Gráfico de perfis



Resultado de análise

Fator de diferença	Fator de similaridade	Conclusão
18.429	51.966	Similar

4.2 Modelo Independente Multivariado

4.2.1 Distância de Mahalanobis

A distância de Mahalanobis é uma distância entre dois vetores que depende da estrutura de variância e covariância existente nos dados. Proposta pelo indiano Prasanta Chandra Mahalanobis em 1936, atualmente é utilizada principalmente para comparar populações e realizar classificações.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Considere $\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_n$ amostras da população referência p-dimensional P_R e $\mathbf{y}_1, \mathbf{y}_2, \dots, \mathbf{y}_m$ amostras da população teste p-dimensional P_T . Suponha que $P_R \sim N(\mu_R, \Sigma)$ e $P_T \sim N(\mu_T, \Sigma)$, no qual μ_R e μ_T são vetores de médias de dimensão $p \times 1$ e Σ é a matriz de variância e covariância de dimensão $p \times p$.

Defina os vetores de médias

$$\bar{\mathbf{x}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mathbf{x}_i = (\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_p)^T$$

e

$$\bar{\mathbf{y}} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \mathbf{y}_i = (\bar{y}_1, \bar{y}_2, \dots, \bar{y}_p)^T.$$

Denota-se $\mathbf{a}^T$ ao vetor $\mathbf{a}$ transposto. No contexto de perfis de dissolução, $\bar{x}_i$ e $\bar{y}_i$ correspondem as médias das dissoluções do i-ésimo tempo de coleta para os medicamentos referência e teste, respectivamente.

Defina também a matriz de variância e covariância agrupada

$$S_{pool} = \frac{(n-1)S_R^2 + (m-1)S_T^2}{n+m-2}$$

com S_R^2 a matriz de variância e covariância estimada de P_R e S_T^2 a matriz de variância e covariância estimada de P_T .

A distância de Mahalanobis entre as observações de P_R e P_T é definida por

$$D_M = \sqrt{(\bar{\mathbf{x}} - \bar{\mathbf{y}})^T S_{pool}^{-1} (\bar{\mathbf{x}} - \bar{\mathbf{y}})} \quad (2)$$

Note que quando a matriz de variância e covariância é diagonal, tem-se que a distância de Mahalanobis é igual a distância euclidiana ponderada. Note também que a distância de Mahalanobis corresponde a raiz quadrada do termo $(\bar{\mathbf{x}} - \bar{\mathbf{y}})^T S_{pool}^{-1} (\bar{\mathbf{x}} - \bar{\mathbf{y}})$. Logo, o termo dentro da raiz quadrada necessita ser positivo, fato garantido quando a matriz S_{pool} é positiva semi-definida.

Ademais, do ponto de vista matemático, a distância de Mahalanobis é uma métrica e portanto apresenta as seguintes propriedades:

- **simétrica:** a distância do vetor $\mathbf{x}$ para o vetor $\mathbf{y}$ é igual a distância do vetor $\mathbf{y}$ para o vetor $\mathbf{x}$;
- **positiva:** a distância entre dois vetores é maior ou igual a zero;
- **desigualdade triangular:** a distância entre os vetores $\mathbf{x}$ e $\mathbf{y}$ é menor ou igual a distância entre os vetores $\mathbf{x}$ e $\mathbf{z}$ mais a distância entre os vetores $\mathbf{z}$ e $\mathbf{y}$.

Na aplicação do perfil de dissolução comparativo, a distância de Mahalanobis é igual a zero somente quando os vetores de médias das dissoluções do medicamento referência e do medicamento teste forem idênticos, ou seja, evidência extrema de que os perfis de dissolução são equivalentes. Por outro lado, quanto maior a distância de Mahalanobis maior a evidência de que os perfis de dissolução não são equivalentes.

4.2.2 Passos para a aplicação do MIM

O modelo independente multivariado, apresentado no guia [2], é um método para o estudo de perfil de dissolução comparativo quando existe “alta” variabilidade nas medidas de dissolução isto é, quando o coeficiente de variação da dissolução para algum dos tempos de coleta estiver fora dos critérios estabelecidos para a aplicação dos fatores do modelo independente simples. Também é aplicado quando os testes não batem 85% de dissolução no mesmo tempo. O modelo independente multivariado utiliza a distância de Mahalanobis, apresentada na seção 4.2.1. A

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

distância de Mahalanobis mede a discrepância entre os perfis de dissolução ponderando pela variância e covariância das observações.

A seguir apresenta-se o algoritmo para a realização do teste:

1. Especificação da diferença aceitável (Limite de Similaridade Δ) entre as médias das dissoluções dos medicamentos referência e teste;
2. Cálculo da distância máxima tolerada D_{Max} , que pode ser obtida transformando o limite de similaridade Δ em termos da distância de Mahalanobis;
3. Cálculo da distância de Mahalanobis estimada D_M entre as médias das dissoluções do medicamento teste e do medicamento referência;
4. Cálculo do intervalo de confiança (D_M^l, D_M^u) para a distância de Mahalanobis;
5. Comparação do limite superior D_M^u do intervalo de confiança com a distância máxima tolerada D_{Max} . Caso o limite superior do intervalo de confiança seja menor do que o limite superior do intervalo teórico, conclui-se que os perfis são similares.

A aplicação do modelo independente multivariado consiste em realizar estes cinco passos descritos acima. No restante desta seção será dado os detalhes associados a cada um destes passos.

Passo 1

Quando a dissolução dos medicamentos teste e referência estiverem em porcentagem, o limite de similaridade adotado é dado por $\Delta = 10$, um vetor de dimensão $p \times 1$ cujo os componentes são iguais a 10. A justificativa para a escolha de $\Delta = 10$ é pelo fato de que na aplicação do fator de similaridade f_2 , equação 1, conclui-se que os perfis de dissolução são equivalentes quando o fator de similaridade f_2 assume algum valor no intervalo fechado $[50, 100]$. O fator atinge o menor valor quando

$$1 + \frac{\sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{y}_i)^2}{p} = 100$$

e ao assumir que $(\bar{x}_i - \bar{y}_i)^2 = (\bar{x}_j - \bar{y}_j)^2$ para $i \neq j$, tem-se

$$\bar{x}_i - \bar{y}_i = \sqrt{99} = 9,9498.$$

Isto significa que para perfis de dissolução que satisfazem as condições impostas para o coeficiente de variação, conclui-se que os perfis de dissolução são equivalentes se a diferença entre as médias das dissoluções não ultrapassarem 9,94%. Esta é a razão pela qual adota-se $\Delta = 10$.

Passo 2

Com o limite de similaridade especificado, calcula-se a distância máxima tolerada, dada por

$$D_{Max} = \sqrt{(\Delta)^T S_{pool}^{-1} (\Delta)}$$

Ressalta-se que a distância máxima tolerada delimita uma faixa para as diferenças entre os vetores.

Passo 3

Denote $\bar{z} = (\bar{x} - \bar{y})$, a distância de Mahalanobis estimada é dada por

	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$D_M = \sqrt{\bar{\mathbf{z}}^T S_{pool}^{-1} \bar{\mathbf{z}}}.$$

A distância de Mahalanobis estimada corresponde a distância obtida para a diferença entre as médias observadas ponderada pela matriz de variância e covariância agrupada.

Passo 4

Com a estimativa da distância de Mahalanobis, calcula-se o intervalo de confiança para o verdadeiro valor da distância de Mahalanobis. O intervalo de confiança (D_M^l, D_M^u) com nível de significância α é dado por

$$D_M^l = \min \left(\sqrt{(y_1^*)^T S_{pool}^{-1} y_1^*}, \sqrt{(y_2^*)^T S_{pool}^{-1} y_2^*} \right) \quad (3)$$

$$D_M^u = \max \left(\sqrt{(y_1^*)^T S_{pool}^{-1} y_1^*}, \sqrt{(y_2^*)^T S_{pool}^{-1} y_2^*} \right) \quad (4)$$

com

$$y_1^* = \bar{\mathbf{z}} \left(1 + \sqrt{\frac{F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

$$y_2^* = \bar{\mathbf{z}} \left(1 - \sqrt{\frac{F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

Em que $K = \left(\frac{m \cdot n}{m+n} \right) \left(\frac{m+n-p-1}{(m+n-2)p} \right)$ e $F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}$ o quantil de $100(1 - \alpha)\%$ da distribuição F de Snedecor com p graus de liberdade no numerador e $m + n - p - 1$ graus de liberdade no denominador. Estes cálculos podem ser encontrados em [5].

Passo 5

Conclui-se que os perfis de dissolução são similares se $D_M^u < D_{Max}$, isto é, se o limite superior do intervalo de confiança estiver contido dentro da faixa delimitada pela distância máxima tolerada.

4.2.3 Comparação entre dois medicamentos de referência

Pode-se também aplicar o Modelo Independente Multivariado calculando a distância máxima tolerada através da comparação de dois medicamentos de referência. Esses dois medicamentos de referência podem ser:

- o medicamento de referência que se está comparando com o medicamento teste e um segundo medicamento de referência ou
- dois outros medicamentos de referência além do que se está sendo utilizado de comparação com o medicamento teste.

Assim, o conjunto de dados deve conter os dados do medicamento de teste, os dados do medicamento de referência para comparar com o de teste e os dados de mais um ou dois medicamentos de referência.

A distância máxima tolerada, nesse caso, é o limite superior do intervalo de 90% de confiança para a distância de Mahalanobis entre dois medicamentos de referência. Ressalta-se que a distância máxima tolerada delimita uma faixa para as diferenças entre os vetores.

A seguir apresenta-se o algoritmo para a realização do teste para essa situação:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

1. Cálculo da distância de Mahalanobis entre as médias das dissoluções de dois medicamentos de referência;
2. Cálculo do intervalo de confiança para essa distância calculada: a distância máxima tolerada D_{Max} será o limite superior desse intervalo de confiança;
3. Cálculo da distância de Mahalanobis estimada D_M entre as médias das dissoluções do medicamento teste e do medicamento referência;
4. Cálculo do intervalo de confiança (D_M^l, D_M^u) para a distância de Mahalanobis;
5. Comparação do limite superior D_M^u do intervalo de confiança com a distância máxima tolerada D_{Max} . Caso o limite superior do intervalo de confiança seja menor do que o limite superior do intervalo teórico, conclui-se que os perfis são similares.

A seguir, será descrito cada um desses passos.

Passo 1

Denote $\bar{\mathbf{z}} = (\overline{\mathbf{Ref1}} - \overline{\mathbf{Ref2}})$ o vetor com a diferença entre as médias dos medicamentos de referência. A distância de Mahalanobis estimada é dada por

$$D_M = \sqrt{\bar{\mathbf{z}}^T S_{pool}^{-1} \bar{\mathbf{z}}},$$

em que $S_{pool} = \frac{(n-1)S_{Ref1}^2 + (m-1)S_{Ref2}^2}{n+m-2}$, S_{Ref1}^2 a matriz de variância e covariância estimada de P_{Ref1} (população referência 1) e S_{Ref2}^2 a matriz de variância e covariância estimada de P_{Ref2} (população referência 2).

Passo 2

Com a estimativa da distância de Mahalanobis, calcula-se o intervalo de confiança para o verdadeiro valor da distância de Mahalanobis. O intervalo de confiança (D_M^l, D_M^u) com nível de significância α é dado por

$$D_M^l = \min \left(\sqrt{(y_1^*)^T S_{pool}^{-1} y_1^*}, \sqrt{(y_2^*)^T S_{pool}^{-1} y_2^*} \right) \quad (5)$$

$$D_M^u = \max \left(\sqrt{(y_1^*)^T S_{pool}^{-1} y_1^*}, \sqrt{(y_2^*)^T S_{pool}^{-1} y_2^*} \right) \quad (6)$$

com

$$y_1^* = \bar{\mathbf{z}} \left(1 + \sqrt{\frac{F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

$$y_2^* = \bar{\mathbf{z}} \left(1 - \sqrt{\frac{F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

Em que $K = \left(\frac{m*n}{m+n} \right) \left(\frac{m+n-p-1}{(m+n-2)p} \right)$ e $F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}$ o quantil de $100(1-\alpha)\%$ da distribuição F de Snedecor com p graus de liberdade no numerador e $m+n-p-1$ graus de liberdade no denominador. Estes cálculos podem ser encontrados em [5].

A distância máxima tolerada é o limite superior do intervalo de 90% de confiança para a distância de Mahalanobis entre dois medicamentos de referência, isto é, $D_{Max} = D_M^u$.

Passo 3

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Agora, denote $\bar{\mathbf{z}} = (\bar{\mathbf{x}} - \bar{\mathbf{y}})$ o vetor com a diferença entre as médias do medicamento de referência e de teste. Então a distância de Mahalanobis estimada é dada por

$$D_M = \sqrt{\bar{\mathbf{z}}^T S_{pool}^{-1} \bar{\mathbf{z}}},$$

em que $S_{pool} = \frac{(n-1)S_R^2 + (m-1)S_T^2}{n+m-2}$, S_R^2 a matriz de variância e covariância estimada de P_R e S_T^2 a matriz de variância e covariância estimada de P_T .

Passo 4

Com a estimativa da distância de Mahalanobis, calcula-se o intervalo de confiança para o verdadeiro valor da distância de Mahalanobis. O intervalo de confiança (D_M^l, D_M^u) com nível de significância α é dado por

$$D_M^l = \min \left(\sqrt{(y_1^*)^T S_{pool}^{-1} y_1^*}, \sqrt{(y_2^*)^T S_{pool}^{-1} y_2^*} \right) \quad (7)$$

$$D_M^u = \max \left(\sqrt{(y_1^*)^T S_{pool}^{-1} y_1^*}, \sqrt{(y_2^*)^T S_{pool}^{-1} y_2^*} \right) \quad (8)$$

com

$$y_1^* = \bar{\mathbf{z}} \left(1 + \sqrt{\frac{F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

$$y_2^* = \bar{\mathbf{z}} \left(1 - \sqrt{\frac{F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

Em que $K = \left(\frac{m*n}{m+n} \right) \left(\frac{m+n-p-1}{(m+n-2)p} \right)$ e $F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}$ o quantil de $100(1-\alpha)\%$ da distribuição F de Snedecor com p graus de liberdade no numerador e $m+n-p-1$ graus de liberdade no denominador. Estes cálculos podem ser encontrados em [5].

Passo 5

Conclui-se que os perfis de dissolução são similares se $D_M^u < D_{Max}$, isto é, se o limite superior do intervalo de confiança estiver contido dentro da faixa delimitada pela distância máxima tolerada.

Vale ressaltar que o Modelo Independente Multivariado assume que os vetores de médias das dissoluções para os medicamentos de teste e referência possuem distribuição normal multivariada, com matrizes de variâncias e covariâncias iguais. Assim, testes devem ser feitos a fim de investigar a adequabilidade dessas suposições em cada cenário. Para a verificação da normalidade multivariada, aplica-se um teste estatístico, conforme apresentado na subseção 4.2.4.

O Fluxograma 3 ilustra as etapas a serem realizadas no estudo de equivalência entre os perfis de dissolução segundo o Modelo Independente Multivariado.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2 PROTOCOLO ESTATÍSTICO	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023

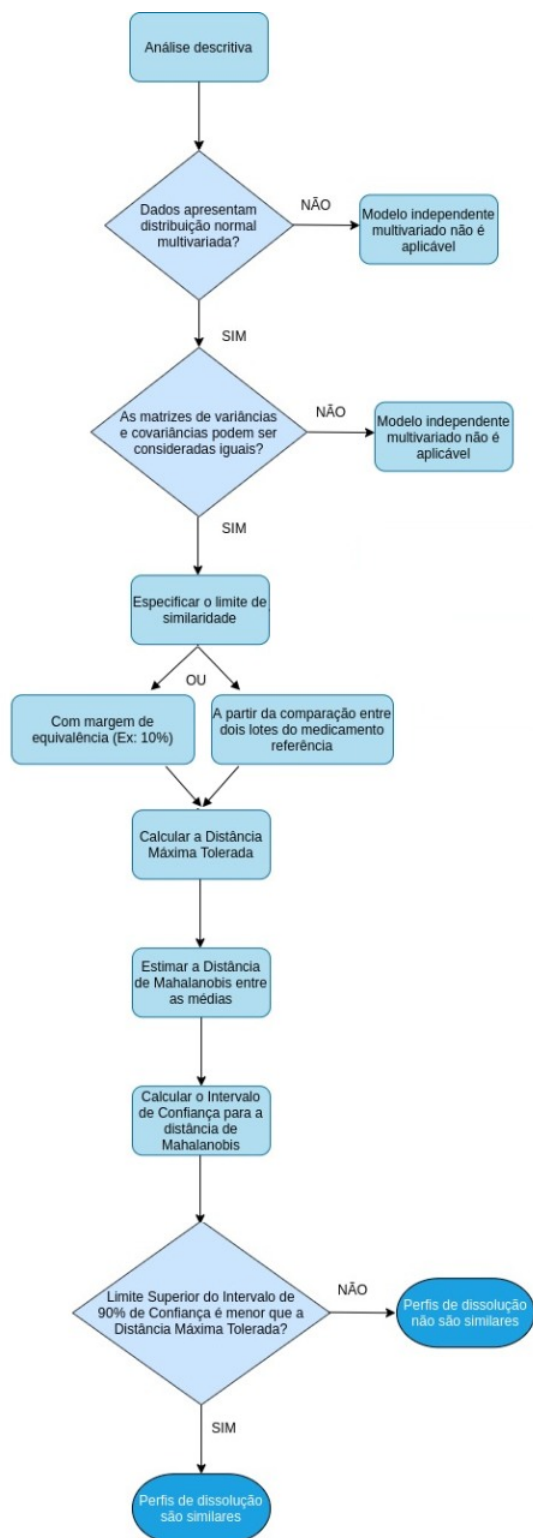


Figura 3: Fluxograma do modelo independente multivariado.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

4.2.4 Testes de Normalidade Multivariada

Teste de Royston

O teste de Royston [8], proposto em 1983, é baseado na estatística W dos testes de Shapiro-Wilk [9] e Shapiro-Francia [10] e visa testar a normalidade multivariada dos dados. Logo, tem-se as hipóteses:

$$\begin{cases} H_0 : \text{Os dados seguem uma distribuição normal multivariada.} \\ H_1 : \text{Os dados não seguem uma distribuição normal multivariada.} \end{cases}$$

A estatística de teste é dada por:

$$H = \frac{e \sum_{j=1}^p \psi_j}{p} \sim \chi_e^2. \quad (9)$$

Tem-se que:

$$e = \frac{p}{1 + (p-1)\bar{c}}$$

e

$$\psi_j = \left\{ \phi^{-1} \left[\frac{1}{2} \phi \left(- \left(\frac{\omega_j - \mu}{\sigma} \right) \right) \right] \right\}^2$$

em que:

- p : dimensão da distribuição;
- j : j -ésima variável;
- e : graus de liberdade;
- ϕ : função distribuição acumulada da Normal Padrão;
- $\bar{c}$: estimativa da correlação média entre os $\psi_{j's}$.

A distribuição Qui-quadrado, χ_e^2 , é utilizada para se obter os valores críticos do teste. Tem-se que $\bar{c}$ é dado por:

$$\bar{c} = \sum_i \sum_j \frac{c_{ij}}{p(p-1)},$$

em que

$$c_{ij} = \begin{cases} g(r_{ij}, n), & \text{se } i \neq j \\ 1, & \text{se } i = j \end{cases}$$

Tem-se que:

$$g(r, n) = r^\lambda \left[1 - \frac{\mu}{\nu} (1-r)^\mu \right]$$

em que r_{ij} representa a correlação entre a i -ésima e a j -ésima variável. Os valores dos parâmetros μ , λ e ν foram estimados a partir de um estudo de simulação [11], sendo eles $\mu = 0,715$, $\lambda = 5$, para o tamanho amostral de $10 \leq n \leq 2000$ e $\nu = 0,21364 + 0,015124x^2 + 0,0018034x^3$, no qual $x = \ln(n)$.

Em relação a estatística de teste, tem-se que, se a curtose for superior a 3, utiliza-se a estatística de teste de Shapiro-Francia [10], caso contrário utiliza-se a estatística de teste de Shapiro-Wilk [9].

Tem-se também que a transformação da estatística de teste W depende do tamanho amostral, isto é, se:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

- $4 \leq n \leq 11$, utiliza-se $\omega_j = -\ln[\gamma - \ln(1 - W_j)]$, em que:
 - $\gamma = -2,273 + 0,459n$;
 - $\mu = 0,5440 - 0,39978n + 0,025054n^2 - 0,0006714n^4$;
 - $\sigma = \exp(1,3822 - 0,77857n + 0,062767n^2 - 0,0020322n^3)$
- $12 \leq n \leq 2000$, utiliza-se $\omega_j = \ln(1 - W_j)$, em que:
 - $x = \ln(n)$;
 - $\mu = -1,5861 - 0,31082x - 0,083751x^2 + 0,0038915x^3$;
 - $\sigma = \exp(-0,4803 - 0,082676x + 0,0030302x^2)$

Os valores de γ , μ e σ são obtidos por meio de aproximações polinomiais, dadas em [12].

O p-valor do teste é dado por:

$$p - \text{valor} = P(\chi_e^2 > H)$$

Se o $p - \text{valor}$ for menor que o nível de significância α adotado, rejeita-se a hipótese nula, isto é, rejeita-se que os dados seguem uma distribuição normal multivariada.

Teste de Mardia

O teste de Mardia [19], proposto em 1970, é baseado nos coeficientes de assimetria e curtose. Seja $X_1, \dots, X_n$ uma amostra aleatória de uma distribuição normal multivariada $N_k(\mu, \Sigma)$ onde μ (vetor de médias) é um vetor arbitrário k -dimensional e Σ (matriz de covariâncias) é uma matriz positiva $k \times k$. Considere-se os coeficientes de assimetria e curtose dados por β_{1k} e β_{2k} respectivamente. O estimador não viesado de β_{1k} é $\hat{\beta}_{1k}$ e o estimador viesado de β_{2k} é $\hat{\beta}_{2k}$.

Mardia (1970) mostra que:

- $E(\hat{\beta}_{1k}) = 0 \longrightarrow \text{Var}(\hat{\beta}_{1k}) = 6/n$
- $E(\hat{\beta}_{2k}) = k(k+2)(n-1)/(n+1) \longrightarrow \text{Var}(\hat{\beta}_{2k}) = 8k(k+2)$

e utiliza as propriedades assintóticas desses estimadores para propor os testes.

A estatística do teste é:

$$\chi_2^c = \frac{n\hat{\beta}_{1k}}{6}$$

e tem distribuição assintótica de qui-quadrado com $v = k(k+1)(k+2)/6$ graus de liberdade. A estatística do teste para $H_0 : \beta_{2k} = k(k+2)$ é:

$$Z_c = \frac{\hat{\beta}_{2k} - k(k+2)(k-1)/(n+1)}{\sqrt{8k(k+2)/n}}$$

Rejeita-se a hipótese nula (H_0) de que "os dados seguem distribuição normal multivariada" se o valor de $P(\chi_e^2 \geq \chi_{\alpha,v}^2)$.

Teste de Cramer-Von Mises

Seja $X_1, \dots, X_n$ uma amostra aleatória de uma distribuição normal multivariada $N_k(\mu, \Sigma)$. Define-se o vetor de distâncias quadráticas como:

$$\psi(X, \theta) = (X_i - \mu)\Sigma^{-1}(X_i - \mu).$$

Dessa forma, a transformação $X_i \rightarrow Y_i = \psi(X_i, \theta_i)$ gera uma amostra aleatória com distribuição qui-quadrado e k graus de liberdade. Neste caso, os desvios da normalidade multivariada poderiam ser avaliados usando o processo empírico:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$Z_n(t) = n^{1/2}[F_n(t) - F_{(k)}(t)], \text{ para } t \in [0, \infty)$$

onde $F_n(\cdot)$ é a função de distribuição empírica de $Y_1 \dots Y_n$ e $F_0(\cdot)$ é a função de distribuição acumulada da Qui-quadrado. Se θ_0 e $F_0(\cdot)$ são completamente especificadas, então o teste de Cramer-Von Mises poderá ser utilizado. Contudo, na maioria dos casos, θ_0 não será conhecido e deverá ser estimado da amostra, sendo $\theta_n = (\bar{X}_n, S_n)$, onde:

- $\bar{X}$: vetor de médias amostrais;
- S : matriz de covariâncias amostrais.

A estatística de Cramer-Von Mises para avaliar a normalidade assintótica é uma integral definida entre $(0, \infty]$ escrita assim:

$$J = \int_0^\infty W^2(\cdot) dF_{(k)}.$$

Essa integral pode ser descomposta e associada ao núcleo da covariância em termos de autovalores e autovetores e depois aproximada com precisão à curva de Pearson. Uma vez feita essa aproximação, é possível obter-se, para um determinado número de valores de k usando um método de simulação, os valores numéricos aproximados dos cumulantes que podem ser usados para determinar os pontos de porcentagem assintóticos.

O valor da estatística do teste é dado por:

$$J_n = \sum_{i=1}^n [Z_i - (i - \frac{1}{2})/n]^2 + (12n)^{-1}.$$

Passos para realizar o teste de Cramer-Von Mises

O teste de Cramer-Von Mises consiste em calcular primeiro $\bar{X}$ (vetor de médias amostrais) e S (matriz de covariâncias amostrais). Depois, calcula-se o vetor de distâncias $Y_1 \dots Y_n$ da seguinte forma:

$$Y_i = (X_i - \bar{X})S^{-1}(X_i - \bar{X})$$

Coloca-se $Z_i = F_{(k)}(Y_i)$ ($i = 1, \dots, n$), sendo que o vetor $Z_1 \dots Z_n$ são os valores ordenados de Z_i . Então, o valor crítico J_n será calculado desta maneira:

$$J_n = \sum_{i=1}^n [Z_i - (i - \frac{1}{2})/n]^2 + (12n)^{-1}.$$

Através de simulação, esse valor de J_n é calculado para diversas combinações de valores de n e de k .

O p-valor do teste é dado por:

$$p - \text{valor} = P(\chi_e^2 > H)$$

Se o $p - \text{valor}$ for menor que o nível de significância α adotado, rejeita-se a hipótese nula, isto é, rejeita-se que os dados seguem uma distribuição normal multivariada.

Teste de Anderson Darling

Dado o vetor de distâncias quadráticas:

$$z_j = (X_j - \mu)S^{-1}(X_j - \mu),$$

este segue distribuição qui-quadrado com vetor de médias μ e matriz de covariância S .

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

A estatística é baseada no teste de Anderson-Darling. Este teste não é aplicável para distribuições multivariadas, no entanto, podemos considerar o fato de que baixo a hipótese de normalidade multivariada, os z'_j s dados pelo vetor de distâncias quadráticas são:

$$A_{p,n}^2 = - \sum_{i=1}^n \frac{2i-1}{n} \log G_p(z_{(i)}) + \log[1 - G_p(z_{(n+1-i)})] - n$$

onde $z_{(1)}, z_{(2)}, \dots, z_{(n)}$ são os z_j organizados em ordem ascendente e

$$G_n(z) = \frac{1}{n} \text{ com } z'_j \leq z.$$

No entanto, na maioria das aplicações práticas μ e S são desconhecidos e precisam ser estimados dos dados da amostra. Usando o método da máxima verossimilitude, estimamos

$$\hat{\mu} = \frac{1}{n} \sum x_j, \quad \hat{S} = \frac{1}{n} \sum (x_j - \hat{\mu})(x_j - \hat{\mu}),$$

e definimos

$$\hat{z}_i = (X_i - \bar{X})\hat{S}^{-1}(X_i - \bar{X})$$

sendo $\bar{X}$ (vetor de médias amostrais) e S (matriz de covariâncias amostrais) que são organizados em ordem ascendente como $\hat{z}_{(i)}$ e

$$\hat{G}_n(z) = \frac{1}{n} \text{ com } \hat{z}'_i \leq z.$$

Os $\hat{z}_i$ são substituídos por $z_{(i)}$ e assim, a estatística dos teste pode ser definida como:

$$\hat{A}_{p,n}^2 = - \sum_{i=1}^n \frac{2i-1}{n} \log G_p(\hat{z}_{(i)}) + \log[1 - G_p(\hat{z}_{(n+1-i)})] - n.$$

A distribuição de $\hat{A}_{p,n}^2$ para um n finito pode ser tabulada usando algum método de simulação.

4.2.5 Teste de Igualdade das Matrizes de Covariância

Teste de M de Box

Para testar a igualdade de matrizes de variância e covariância deve-se verificar primeiramente o pressuposto de normalidade multivariada.

George E.P.Box[24] desenvolveu um teste estatístico (teste M) que é uma generalização do teste univariado de igualdade de variâncias de Bartlett, e muito sensível a violações do pressuposto de normalidade. Esta sensibilidade atribui-se ao fato de que o teste utiliza as variâncias generalizadas, os determinantes das matrizes de covariância. E deste modo, a hipótese de igualdade de matrizes pode ser rejeitada apenas pela violação do pressuposto de normalidade multivariada e não por se tratarem de matrizes significativamente diferentes.

Box definiu o teste M utilizando o método do quociente de verossimilhanças e pressupondo que os vetores de médias dos grupos são desconhecidos. As hipóteses a serem testadas são as seguintes:

$$\begin{cases} H_0 : \sum_1 = \sum_2 = \dots = \sum_i & \text{com } \widehat{\sum} = S \text{ e } \widehat{\mu}_j = \hat{x}_j \\ H_1 : \sum_i \neq \sum_j & i \neq j \quad \text{com } \widehat{\sum} = S_j \text{ e } \widehat{\mu}_j = \hat{x}_j \end{cases}$$

Seja n a dimensão total da amostra com $v_i = n_i - 1$ graus de liberdade associados a cada grupo, S_i a matriz de covariância do grupo i e S a matriz de covariância total. O teste M de Box é definido da seguinte maneira:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$M = (n - I) \ln |S_c| - \sum_{I=1}^i v_i \ln |S_i| \quad (10)$$

onde:

- $n = \sum_{I=1}^i n_i$ é a dimensão total da amostra;
- $S_c = \sum_{I=1}^i \frac{n_i S_i}{\sum n_i}$ é a matriz de variância e covariância.

Para realizar o teste M, Box sugeriu duas aproximações. A primeira é uma aproximação pela distribuição χ^2 ; dada por:

$$M.C \chi^2_{[\frac{1}{2} K(K+1)(I-1)]} \quad (11)$$

sendo

- $C = 1 - \frac{2K^2+3K-1}{6(K+1)(I-1)} (\sum_{I=1}^i \frac{1}{v_i} - \frac{1}{n-I})$ para grupos com tamanhos de amostras diferentes;
- $C = 1 - \frac{(2K^2+3K-1)(I+1)}{6(K+1)ln}$ para grupos com tamanhos amostrais iguais.

Aconselha-se utilizar essa aproximação quando as dimensões dos grupos forem superiores a 20 e o número de variáveis e de grupos for inferior a 6.

A segunda maneira proposta por Box é uma aproximação pela distribuição F, designada por:

$$\frac{M(1 - a_1 - \frac{v}{v_0})}{v} F_{(v, v_0)}. \quad (12)$$

Onde:

- $a_1 = 1 - C$;
- $a_2 = \frac{(k-1)(k+2)}{6(I-1)} [\sum_{I=1}^i \frac{1}{v_i^2} \frac{1}{(n-I)^2}]$;
- $v = \frac{K(K+1)(I-1)}{2}$ e $v_0 = \frac{v+2}{a_2+a_1^2}$.

Aconselha-se utilizar essa aproximação em todas as outras situações.

4.2.6 Aplicação 1

Na Tabela 5 apresentam-se os dados utilizados na análise. Foram utilizadas 12 amostras para o medicamento teste e 12 para o medicamento de referência em 7 diferentes tempos de coleta.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 5: Experimento perfil de dissolução - exemplo 2.

Medicamento	10	15	20	30	45	60	90
Teste	3,88	8,34	13,71	27,41	58,92	88,76	102,85
Teste	1,77	5,78	11,33	25,68	60,56	86,87	104,61
Teste	2,4	7,25	13,28	27,05	65,34	94,13	105,61
Teste	6,27	11,46	19,06	34,69	65,84	91,98	103,5
Teste	5,83	8,68	13,95	28,78	60,58	94,35	105,52
Teste	7,27	11,91	18,98	36,79	70,93	91,14	107,12
Teste	3,96	8,41	13,82	28,05	59,62	89,99	102,33
Teste	1,8	5,83	11,52	25,88	62,02	87,74	104,41
Teste	2,42	7,63	13,45	27,3	65,76	96,06	106,15
Teste	6,29	11,54	19,54	35,23	66,44	94,38	103,8
Teste	5,93	8,8	14,1	29,06	61,29	95,36	105,75
Teste	7,35	11,92	19,16	37,44	72,6	91,69	107,72
Referência	0,76	3,54	8,25	22,94	59,82	93,37	102,85
Referência	0,81	4,67	10,24	25,48	56,12	88,46	100,93
Referência	1,72	5,89	11,14	27,31	58,64	90,85	102,19
Referência	2,66	7,39	13,45	30,5	63,7	94,58	103,36
Referência	1,1	4,85	9,56	25,87	59,01	89,81	103,14
Referência	1,63	6,13	10,98	27,89	64,4	94,33	103,68
Referência	0,52	3,56	9,09	25,78	62,59	92,25	100,27
Referência	0,47	3,57	9,48	22,42	56	88,08	100,28
Referência	1,44	5,26	10,13	24,04	55,87	81,69	100,63
Referência	1,74	6,82	11,37	28	61,78	91,18	100,23
Referência	0,65	4,02	9,63	22,52	57,36	87,23	101,18
Referência	1,45	4,92	10,35	25,32	59,98	93,41	101,31

Primeiramente obtêm-se os vetores de médias do medicamento de teste e de referência

$$\bar{\mathbf{x}} = (4,598; 8,963; 15,158; 30,280; 64,158; 91,871; 104,948)^T$$

$$\bar{\mathbf{y}} = (1,246; 5,052; 10,306; 25,672; 59,606; 90,437; 101,671)^T$$

E os coeficientes de variação.

Tabela 6: Tabela de coeficientes de variação exemplo 2.

Conjuntos	10	15	20	30	45	60	90
Teste	46,4%	25,1%	20,5%	14,6%	6,9%	3,3%	1,6%
Referência	52,1%	25,7%	13%	9,6%	5%	4,1%	1,3%

Tem-se que os primeiros coeficientes de variação são superiores a 20%. Então, não pode-se aplicar o modelo independente simples, logo utiliza-se o modelo independente multivariado. Seguindo os passos como descrito em 3, obtêm-se as matrizes de variância e covariância das medições do medicamento teste e referência.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$S_T^2 = \begin{bmatrix} 4,544 & 4,474 & 5,728 & 8,343 & 5,136 & 2,248 & 1,128 \\ 4,474 & 5,069 & 6,851 & 9,609 & 6,931 & 2,288 & 0,956 \\ 5,728 & 6,851 & 9,623 & 13,404 & 10,349 & 2,819 & 1,243 \\ 8,343 & 9,609 & 13,404 & 19,489 & 15,875 & 3,036 & 2,740 \\ 5,136 & 6,931 & 10,349 & 15,875 & 19,609 & 3,781 & 5,150 \\ 2,248 & 2,288 & 2,819 & 3,036 & 3,781 & 9,376 & 1,908 \\ 1,128 & 0,956 & 1,243 & 2,740 & 5,150 & 1,908 & 2,757 \end{bmatrix}$$

$$S_R^2 = \begin{bmatrix} 0,421 & 0,798 & 0,788 & 1,357 & 1,006 & 0,798 & 0,395 \\ 0,798 & 1,680 & 1,603 & 2,814 & 1,935 & 1,261 & 0,609 \\ 0,788 & 1,603 & 1,782 & 2,814 & 1,762 & 1,358 & 0,495 \\ 1,357 & 2,814 & 2,814 & 6,107 & 5,358 & 4,953 & 1,369 \\ 1,006 & 1,935 & 1,762 & 5,358 & 9,000 & 9,058 & 1,869 \\ 0,798 & 1,261 & 1,358 & 4,953 & 9,058 & 13,675 & 2,574 \\ 0,395 & 0,609 & 0,495 & 1,369 & 1,869 & 2,574 & 1,699 \end{bmatrix}$$

Assim obtém-se a matriz de variância e covariância agrupada.

$$S_{pool}^2 = \frac{(n-1)S_R^2 + (m-1)S_T^2}{n+m-2}$$

$$S_{pool}^2 = \begin{bmatrix} 2,482 & 2,636 & 3,258 & 4,850 & 3,071 & 1,523 & 0,761 \\ 2,636 & 3,375 & 4,227 & 6,211 & 4,433 & 1,775 & 0,782 \\ 3,258 & 4,227 & 5,703 & 8,109 & 6,056 & 2,088 & 0,869 \\ 4,850 & 6,211 & 8,109 & 12,798 & 10,617 & 3,994 & 2,055 \\ 3,071 & 4,433 & 6,056 & 10,617 & 14,305 & 6,420 & 3,510 \\ 1,523 & 1,775 & 2,088 & 3,994 & 6,420 & 11,525 & 2,241 \\ 0,761 & 0,782 & 0,869 & 2,055 & 3,510 & 2,241 & 2,228 \end{bmatrix}$$

E calcula-se sua inversa

$$S_{pool}^{-1} = \begin{bmatrix} 3,176 & -1,715 & -0,029 & -0,709 & 0,597 & -0,111 & -0,646 \\ -1,715 & 7,031 & -2,798 & -1,254 & 0,384 & -0,101 & -0,137 \\ -0,029 & -2,798 & 3,533 & -0,842 & -0,174 & 0,067 & 0,598 \\ -0,709 & -1,254 & -0,842 & 1,961 & -0,619 & 0,087 & 0,090 \\ 0,597 & 0,384 & -0,174 & -0,619 & 0,490 & -0,091 & -0,381 \\ -0,111 & -0,101 & 0,067 & 0,087 & -0,091 & 0,129 & -0,020 \\ -0,646 & -0,137 & 0,598 & 0,090 & -0,381 & -0,020 & 1,021 \end{bmatrix}$$

Sendo o limite de similaridade $\Delta = 10$, calcula-se a distância máxima:

$$D_{Max} = \sqrt{(\Delta)^T S_{pool}^{-1} (\Delta)} = 13,158.$$

Em seguida, obtém-se o vetor de diferença das médias $\bar{z}$

$$\bar{z} = (\bar{x} - \bar{y}) = (3,352; 3,911; 4,852; 4,608; 4,552; 1,434; 3,277).$$

E assim calcula-se a distância de Mahalanobis estimada

$$\hat{D}_M = \sqrt{\bar{z}^T S_{pool}^{-1} \bar{z}} = 4,686.$$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

O próximo passo consiste em calcular o intervalo de confiança para a distância de Mahalanobis (D_M^l, D_M^u). Fixa-se um nível de significância de 10% e para o delineamento apresentado (12 comprimidos de cada medicamento e 7 tempos de coleta), tem-se que a constante K é igual a:

$$K = \left(\frac{mn}{m+n} \right) \left(\frac{m+n-p-1}{(m+n-2)p} \right) = \left(\frac{12 \times 12}{24} \right) \left(\frac{24-7-1}{(24-2)7} \right) = 0,623$$

Os valores de y_1^* e y_2^* são respectivamente:

$$y_1^* = \bar{z} \left(1 + \sqrt{\frac{F_{(p, m+n-p-1, 0.9)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

$$y_1^* = (4,674; 5,454; 6,766; 6,426; 6,348; 2,000; 4,570)^T$$

$$y_2^* = \bar{z} \left(1 - \sqrt{\frac{F_{(p, 2n-p-1, 0.9)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

$$y_2^* = (2,030; 2,368; 2,938; 2,790; 2,756; 0,868; 1,984)^T$$

Assim, calcula-se o intervalo com 90% de confiança para a distância de Mahalanobis

$$\sqrt{(y_1^*)^T S_{pool}^{-1} y_1^*} = 6,532593$$

$$\sqrt{(y_2^*)^T S_{pool}^{-1} y_2^*} = 2,836579$$

$$D_M^u = 6,532593$$

$$D_M^l = 2,836579$$

Tem-se que o limite superior do intervalo de confiança é menor que a distância máxima tolerada, $D_M^u < D_{Max}$. Portanto conclui-se que há similaridade entre o medicamento teste e o de referência. Os resultados do Action Stat são dados a seguir.

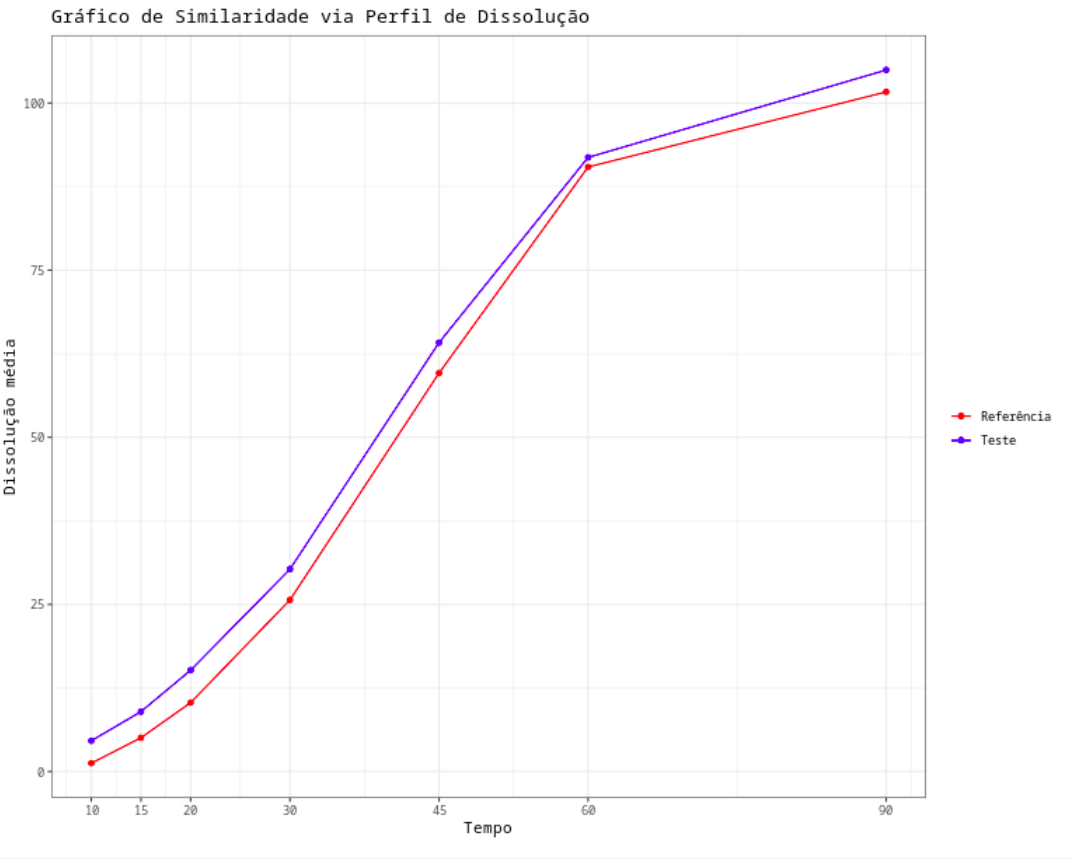
Resumo Descritivo para Medicamento Referência							
	10	15	20	30	45	60	90
Média	1.246	5.052	10.306	25.672	59.606	90.437	101.671
Desvio-padrão	0.649	1.296	1.335	2.471	3	3.698	1.303
RSD (%)	52.087	25.653	12.954	9.625	5.033	4.089	1.282

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Resumo Descritivo para Medicamento Teste

	10	15	20	30	45	60	90
Média	4.598	8.963	15.158	30.28	64.158	91.871	104.948
Desvio-padrão	2.132	2.252	3.102	4.415	4.428	3.062	1.66
RSD (%)	46.368	25.126	20.464	14.581	6.902	3.333	1.582

Gráfico de perfis



GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Distância Mahalanobis				
Estimativa ▾	Limite Inferior ▾	Limite Superior ▾	Distância Máxima Tolerada ▾	Conclusão ▾
4.685	2.838	6.533	13.158	Similar

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

4.2.7 Aplicação 2

A seguir temos um exemplo de comparação entre dois medicamentos de referência. Considere os dados apresentados na Tabela 7. Foram utilizadas 12 amostras para o medicamento teste, 12 para o medicamento de referência, 12 para o medicamento de referência 1 e 12 para o medicamento de referência 2 em 5 diferentes tempos de coleta.

Tabela 7: Experimento perfil de dissolução - exemplo 3.

Medicamento	5	10	15	30	60
Teste	1,23	9,93	45,26	98,42	103,1
Teste	0,65	11,15	74,78	100,81	102,78
Teste	1,02	13,64	60,45	98,5	101,65
Teste	1,17	23,12	79,23	99,58	101,42
Teste	1,76	14,75	62,57	99,79	103,4
Teste	1,67	10,74	43,12	96,01	101,56
Teste	0,31	14,29	61,28	98,09	102,2
Teste	1,02	10,38	67,46	98,05	101,01
Teste	0,57	22,1	55,18	96,85	101,27
Teste	0,95	18,81	67,21	97,59	101,09
Teste	0,91	15,25	75,85	99,54	101,72
Teste	2,06	14,4	85,88	100,49	101,67
Referencia	1,82	8,59	52,3	95,89	102,95
Referencia	1,58	12,91	61,06	96,9	102,79
Referencia	1,85	20,86	66,41	96,81	103,58
Referencia	2,82	18,34	76,29	99,28	102,64
Referencia	2,12	33,49	84,32	100,02	102,44
Referencia	2,08	8,13	57,51	98,55	103,45
Referencia	1,15	18,02	55,96	97,1	102,5
Referencia	1,39	15,07	77,86	99,72	101,9
Referencia	2,5	24,21	73,57	98,98	102,83
Referencia	1,02	21,5	76,66	100,05	102,53
Referencia	0,98	16,67	57,36	96,66	102,24
Referencia	3,33	61,77	96,02	103,03	103,38
Referencia1	0,11	3,1	16,34	96,58	104,42
Referencia1	0	5,62	62,77	102,03	103,9
Referencia1	0	3,76	42,15	95,85	101,5
Referencia1	0,46	3,73	38,88	95,38	101,38
Referencia1	0	5,93	72,39	101,06	103,9
Referencia1	0,14	3,95	23,83	92,58	101,78
Referencia1	0	4,7	28,93	93,32	101,46
Referencia1	0	4,78	33,33	93,69	103,01
Referencia1	1,37	5,82	29,84	93,99	100,85
Referencia1	0	2,43	38,87	93,18	101,33
Referencia1	0	3,74	20,05	89,28	100,68
Referencia1	0	3,37	71,31	97,18	100,25
Referencia2	1,82	8,59	52,3	95,89	102,95
Referencia2	1,58	12,91	61,06	96,9	102,79
Referencia2	1,85	20,86	66,41	96,81	103,58
Referencia2	2,82	18,34	76,29	99,28	102,64
Referencia2	2,12	33,49	84,32	100,02	102,44
Referencia2	2,08	8,13	57,51	98,55	103,45
Referencia2	1,15	18,02	55,96	97,1	102,5
Referencia2	1,39	15,07	77,86	99,72	101,9
Referencia2	2,5	24,21	73,57	98,98	102,83
Referencia2	1,02	21,5	76,66	100,05	102,53
Referencia2	0,98	16,67	57,36	96,66	102,24
Referencia2	3,33	61,77	96,02	103,03	103,38

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Primeiramente obtêm-se os vetores de médias do medicamento de teste e de referência

$$\bar{x} = (1, 11; 14, 88; 64, 856; 98, 643; 101, 906)^T$$

$$\bar{y} = (1, 887; 21, 63; 69, 61; 98, 582; 102, 769)^T$$

E os coeficientes de variação.

Tabela 8: Tabela de coeficientes de variação exemplo 3.

Conjuntos	5	10	15	30	60
Teste	46,1%	29,6%	20,1%	1,5%	0,8%
Referência	38,8%	66,6%	19,2%	2,1%	0,49%

Tem-se que os primeiros coeficientes de variação são superiores a 20%. Então, não pode-se aplicar o modelo independente simples, logo utiliza-se o modelo independente multivariado. De acordo com a Seção 3, a distância máxima tolerada pode ser calculada transformando o limite de similaridade Δ em termos da distância de Mahalanobis ou calculando a distância de Mahalanobis entre dois medicamentos referência. Para esse conjunto de dados, iremos considerar a distância de Mahalanobis entre dois medicamentos referência (que são os medicamentos “Referência1” e “Referência2”).

Seguindo os passos como descrito na Seção 4.2.3, obtêm-se as matrizes de variância e covariância das medições do medicamento Referência1 e Referência2.

$$S_{Ref1}^2 = \begin{bmatrix} 0,160 & 0,160 & -1,734 & -0,190 & -0,155 \\ 0,160 & 1,265 & 7,037 & 1,764 & 0,506 \\ -1,734 & 7,037 & 367,676 & 52,907 & 3,091 \\ -0,190 & 1,764 & 52,907 & 12,754 & 3,101 \\ -0,155 & 0,506 & 3,091 & 3,101 & 1,966 \end{bmatrix}$$

$$S_{Ref2}^2 = \begin{bmatrix} 0,535 & 6,428 & 5,702 & 0,855 & 0,193 \\ 6,428 & 207,179 & 158,535 & 23,011 & 1,652 \\ 5,702 & 158,535 & 177,974 & 25,037 & -0,198 \\ 0,855 & 23,011 & 25,037 & 4,096 & 0,025 \\ 0,193 & 1,652 & -0,198 & 0,025 & 0,256 \end{bmatrix}$$

Assim obtêm-se a matriz de variância e covariância agrupada.

$$S_{pool}^2 = \frac{(n-1)S_R^2 + (m-1)S_T^2}{n+m-2}$$

$$S_{pool}^2 = \begin{bmatrix} 0,347 & 3,294 & 1,984 & 0,332 & 0,019 \\ 3,294 & 104,222 & 82,786 & 12,388 & 1,079 \\ 1,984 & 82,786 & 272,825 & 38,972 & 1,447 \\ 0,332 & 12,388 & 38,972 & 8,425 & 1,563 \\ 0,019 & 1,079 & 1,447 & 1,563 & 1,111 \end{bmatrix}$$

E calcula-se sua inversa

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$S_{pool}^{-1} = \begin{bmatrix} 4,175 & -0,143 & 0,035 & -0,162 & 0,251 \\ -0,143 & 0,018 & -0,005 & 0,008 & -0,019 \\ 0,035 & -0,005 & 0,021 & -0,117 & 0,141 \\ -0,162 & 0,008 & -0,117 & 0,846 & -1,043 \\ 0,251 & -0,019 & 0,141 & -1,043 & 2,197 \end{bmatrix}$$

Em seguida, obtém-se o vetor de diferença das médias $\bar{z}$

$$\bar{z} = (\mathbf{Ref1} - \mathbf{Ref2}) = (1,713; 17,386; 29,719; 3,239; 0,731).$$

E assim calcula-se a distância de Mahalanobis estimada

$$\hat{D}_M = \sqrt{\bar{z}^T S_{pool}^{-1} \bar{z}} = 3,692.$$

O próximo passo consiste em calcular o intervalo de confiança para a distância de Mahalanobis (D_M^l, D_M^u). Fixa-se um nível de significância de 10% e para o delineamento apresentado (12 comprimidos de cada medicamento e 5 tempos de coleta), tem-se que a constante K é igual ao calculado anteriormente, ou seja, $K = 0,982$.

Os valores de y_1^* e y_2^* são respectivamente:

$$y_1^* = \bar{z} \left(1 + \sqrt{\frac{F_{(p,m+n-p-1,0,9)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

$$y_1^* = (2,407; 24,427; 41,756; 4,551; 1,027)^T$$

$$y_2^* = \bar{z} \left(1 - \sqrt{\frac{F_{(p,2n-p-1,0,9)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

$$y_2^* = (1,019; 10,344; 17,682; 1,927; 0,435)^T$$

Assim, calcula-se o intervalo com 90% de confiança para a distância de Mahalanobis

$$\sqrt{(y_1^*)^T S_{pool}^{-1} y_1^*} = 5,188$$

$$\sqrt{(y_2^*)^T S_{pool}^{-1} y_2^*} = 2,197$$

$$D_M^u = 5,188$$

$$D_M^l = 2,197$$

Como a distância máxima tolerada é definida como sendo o limite superior do intervalo de confiança, a distância máxima tolerada é 5,188.

Assim, tem-se a distância máxima tolerada. O próximo passo é encontrar a distância de Mahalanobis entre o Teste e o Referência e seu intervalo de confiança. Para isso, é necessário repetir o procedimento acima, mas com os dados dos medicamentos teste e Referência. Primeiro, obtém-se as matrizes de variância e covariância das medições do medicamento teste e Referência.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$S_T^2 = \begin{bmatrix} 0,262 & -0,441 & 0,539 & 0,139 & 0,059 \\ -0,441 & 19,413 & 17,994 & -0,270 & -1,410 \\ 0,539 & 17,994 & 169,800 & 14,416 & -2,058 \\ 0,138 & -0,270 & 14,416 & 2,099 & 0,509 \\ 0,059 & -1,410 & -2,058 & 0,509 & 0,627 \end{bmatrix}$$

$$S_R^2 = \begin{bmatrix} 0,535 & 6,428 & 5,702 & 0,855 & 0,193 \\ 6,428 & 207,179 & 158,535 & 23,011 & 1,652 \\ 5,702 & 158,535 & 177,974 & 25,037 & -0,198 \\ 0,855 & 23,011 & 25,037 & 4,096 & 0,025 \\ 0,193 & 1,652 & -0,198 & 0,025 & 0,256 \end{bmatrix}$$

Assim obtém-se a matriz de variância e covariância agrupada.

$$S_{pool}^2 = \frac{(n-1)S_R^2 + (m-1)S_T^2}{n+m-2}$$

$$S_{pool}^2 = \begin{bmatrix} 0,398 & 2,993 & 3,121 & 0,497 & 0,126 \\ 2,993 & 113,296 & 88,265 & 11,370 & 0,121 \\ 3,121 & 88,265 & 173,887 & 19,727 & -1,128 \\ 0,497 & 11,370 & 19,727 & 3,098 & 0,267 \\ 0,126 & 0,121 & -1,128 & 0,267 & 0,442 \end{bmatrix}$$

E calcula-se sua inversa

$$S_{pool}^{-1} = \begin{bmatrix} 3,665 & -0,064 & -0,043 & 0,021 & -1,149 \\ -0,064 & 0,016 & -0,004 & -0,022 & 0,016 \\ -0,043 & -0,004 & 0,037 & -0,231 & 0,247 \\ 0,021 & -0,022 & -0,231 & 2,030 & -1,817 \\ -1,149 & 0,016 & 0,247 & -1,817 & 4,316 \end{bmatrix}$$

Em seguida, obtém-se o vetor de diferença das médias $\bar{\mathbf{z}}$

$$\bar{\mathbf{z}} = (\bar{\mathbf{x}} - \bar{\mathbf{y}}) = (-0,777; -6,750; -4,754; 0,061; -0,863).$$

E assim calcula-se a distância de Mahalanobis estimada

$$\hat{D}_M = \sqrt{\bar{\mathbf{z}}^T S_{pool}^{-1} \bar{\mathbf{z}}} = 2,595.$$

O próximo passo consiste em calcular o intervalo de confiança para a distância de Mahalanobis (D_M^l, D_M^u). Fixa-se um nível de significância de 10% e para o delineamento apresentado (12 comprimidos de cada medicamento e 5 tempos de coleta), tem-se que a constante K é igual a:

$$K = \left(\frac{mn}{m+n} \right) \left(\frac{m+n-p-1}{(m+n-2)p} \right) = \left(\frac{12 \times 12}{24} \right) \left(\frac{24-5-1}{(24-2)5} \right) = 0,982$$

Os valores de y_1^* e y_2^* são respectivamente:

$$y_1^* = \bar{\mathbf{z}} \left(1 + \sqrt{\frac{F_{(p, m+n-p-1, 0,9)}}{K \hat{D}_M^2}} \right)$$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$y_1^* = (-1,224; -10,640; -7,494; 0,096; -1,361)^T$$

$$y_2^* = \bar{\mathbf{z}} \left(1 - \sqrt{\frac{F_{(p,2n-p-1,0,9)}}{K\hat{D}_M^2}} \right)$$

$$y_2^* = (-0,329; -2,860; -2,015; 0,026; -0,366)^T,$$

pois $F_{(p,m+n-p-1,0,9)} = F_{(p,12+12-5-1,0,9)} = 2,196$.

Assim, calcula-se o intervalo com 90% de confiança para a distância de Mahalanobis

$$\sqrt{(y_1^*)^T S_{pool}^{-1} y_1^*} = 4,091$$

$$\sqrt{(y_2^*)^T S_{pool}^{-1} y_2^*} = 1,100$$

$$D_M^u = 4,091$$

$$D_M^l = 1,100$$

Tem-se que o limite superior do intervalo de confiança utilizando os dados do teste e referência é menor que a distância máxima tolerada, $4,091 = D_M^u < D_{Max} = 5,188$. Portanto conclui-se que há similaridade entre o medicamento teste e o de referência.

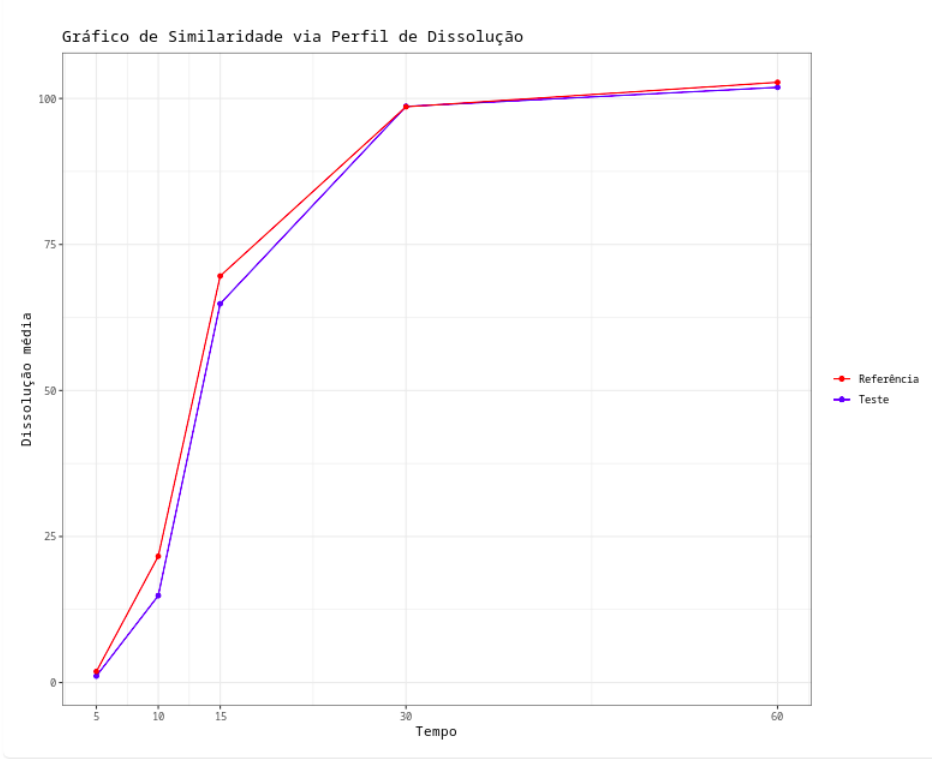
Veja a seguir os resultados obtidos com o Action Stat.

Resumo Descritivo para Medicamento Referência					
	5	10	15	30	60
Média	1.887	21.63	69.61	98.582	102.769
Desvio-padrão	0.731	14.394	13.341	2.024	0.506
RSD (%)	38.739	66.546	19.165	2.053	0.492

Resumo Descritivo para Medicamento Teste					
	5	10	15	30	60
Média	1.11	14.88	64.856	98.643	101.906
Desvio-padrão	0.512	4.406	13.031	1.449	0.792
RSD (%)	46.126	29.61	20.092	1.469	0.777

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão:
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	1 de dezembro de 2023

Gráfico de perfis



GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Resultado de análise

Teste de Royston			
Medicamento	Estatística do teste	Valor-p	
Teste	5.239	0.379	
Referência	9.414	0.059	

Teste M de Box			
Estatística	G.L.	Valor-p	
Chi-Sq (approx.)	33.346	0.004	

Distância Mahalanobis				
Estimativa	Limite Inferior	Limite Superior	Distância Máxima Tolerada	Conclusão
2.595	1.100	4.091	5.188	Similar

Se a distância máxima tolerada fosse calculada sem os medicamentos Referência1 e Referência2, ou seja, transformando o limite de similaridade Δ em termos da distância de Mahalanobis, em que o limite de similaridade é $\Delta = 10$, tem-se que a distância máxima é seria dada por

$$D_{Max} = \sqrt{(\Delta)^T S_{pool}^{-1} (\Delta)} = 19,921,$$

e, assim, também se concluiria que há similaridade entre o medicamento de teste e o de referência pois $4,091 = D_M^u < D_{Max} = 19,921$. Esse resultado também pode ser encontrado no Action, porém não selecionando a opção “Calcular distância global”, e é dado na Figura a seguir.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Resultado de análise

Teste de Royston			
Medicamento	Estatística do teste	Valor-p	
Teste	5.239	0.379	
Referência	9.414	0.059	

Teste M de Box			
Estatística	G.L.	Valor-p	
Chi-Sq (approx.)	118.199	45.000	
		0.000	

Distância Mahalanobis				
Estimativa	Limite Inferior	Limite Superior	Distância Máxima Tolerada	Conclusão
2.595	1.100	4.091	19.921	Similar

4.3 Fator de Similaridade via *bootstrap*

O fator de similaridade via *bootstrap* [3], assim como as demais metodologias apresentadas, é um método alternativo para o estudo de perfil de dissolução comparativo quando existe alta variabilidade nas medidas das dissoluções, impossibilitando assim a aplicação do modelo independente simples.

A seguir, apresenta-se o algoritmo para a realização do teste:

1. Gera-se B amostras *bootstrap* para o medicamento teste e referência;
2. Calcula-se o fator de similaridade para cada amostra *bootstrap* obtida;
3. Calcula-se o intervalo empírico;
4. Se o limite inferior do intervalo, ao nível de significância α , for maior que 50, conclui-se que os perfis são similares.

A aplicação do fator de similaridade via *bootstrap* consiste em realizar os cinco passos descritos acima. No restante desta seção será dado detalhes associados a cada um desses passos.

• Passo 1

Inicialmente, gera-se B amostras *bootstrap* a partir dos medicamentos teste e referência, isto é, seleciona-se com reposição B amostras de cada tipo de medicamento. Recomenda-se a utilização de, no mínimo, $B = 20000$.

• Passo 2

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2 PROTOCOLO ESTATÍSTICO	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023

Calcula-se o fator de similaridade para cada amostra *bootstrap* obtida, isto é:

$$\widehat{f_{2,B}^*} = 50 \log_{10} \left(\left(1 + \frac{\sum_{i=1}^p (\bar{x}_{i,B}^* - \bar{y}_{i,B}^*)^2}{p} \right)^{-0,5} 100 \right) \quad (13)$$

em que

- p : número de pontos de coleta de cada amostra obtida;
- $\bar{x}_{i,B}^*$: média das dissoluções do referência para o i -ésimo tempo de coleta da B -ésima amostra *bootstrap*;
- $\bar{y}_{i,B}^*$: média das dissoluções do teste para o i -ésimo tempo de coleta da B -ésima amostra *bootstrap*.

• Passo 3

Calcula-se o intervalo empírico *bootstrap*, ao nível de significância α , para o fator de similaridade. Primeiramente ordena-se crescentemente os valores obtidos no passo anterior, isto é,

$$\widehat{f_{2,(1)}^*} < \widehat{f_{2,(2)}^*} < \dots < \widehat{f_{2,(B)}^*},$$

em que $\widehat{f_{2,(B)}^*}$ é o valor ordenado obtido para o fator de similaridade da amostra *bootstrap* gerada.

Posteriormente obtém-se o intervalo percentil, isto é, por meio da técnica *bootstrap* obtém-se um intervalo de confiança via percentil. O intervalo é dado por:

$$IC(1 - \alpha)100\% = \left(\widehat{f_{2,(\frac{\alpha}{2})}^*} ; \widehat{f_{2,(1-\frac{\alpha}{2})}^*} \right) = \left(\widehat{f_{2,(l)}^*} ; \widehat{f_{2,(u)}^*} \right)$$

em que:

- $\widehat{f_{2,(l)}^*}$: limite inferior do intervalo empírico;
- $\widehat{f_{2,(u)}^*}$: limite superior do intervalo empírico.

No fator de similaridade via *bootstrap*, tem-se que o valor referente a l -ésima posição, isto é, o valor $\widehat{f_{2,(l)}^*}$ obtido para o fator de similaridade é o limite inferior do intervalo empírico.

• Passo 4

Conclui-se que os perfis de dissolução são similares se $\widehat{f_{2,(l)}^*} \geq 50$, isto é, se o limite inferior do intervalo empírico for maior ou igual que 50. Critério esse análogo ao adotado para o modelo independente simples via fator de similaridade.

A seguir, apresenta-se na Figura 4 o fluxograma para a aplicação do fator de similaridade via *bootstrap* no estudo perfil de dissolução comparativo.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

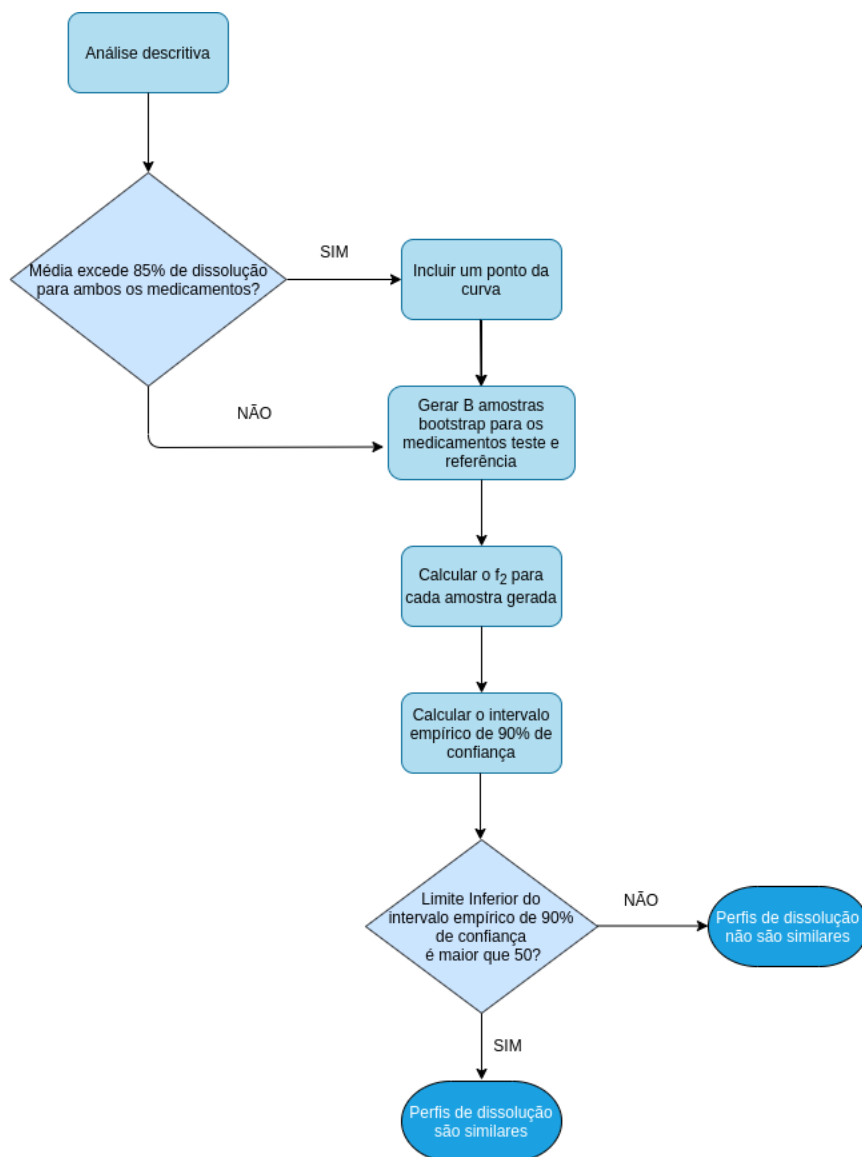


Figura 4: Fluxograma do fator de similaridade via *bootstrap*.

4.3.1 Aplicação

Conforme apresentado em 4.3, o fator de similaridade via *bootstrap* é um estudo de simulação e, por isso, os resultados são reprodutíveis sob certas circunstâncias, como a semente escolhida e o número de reamostragens selecionado. Recomenda-se o uso de, no mínimo, 20000 amostras e estabelece-se o valor da semente como 2021. Sob essas condições, usando os dados da Tabela 5, tem-se que os resultados são:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Resumo Descritivo para Medicamento Referência

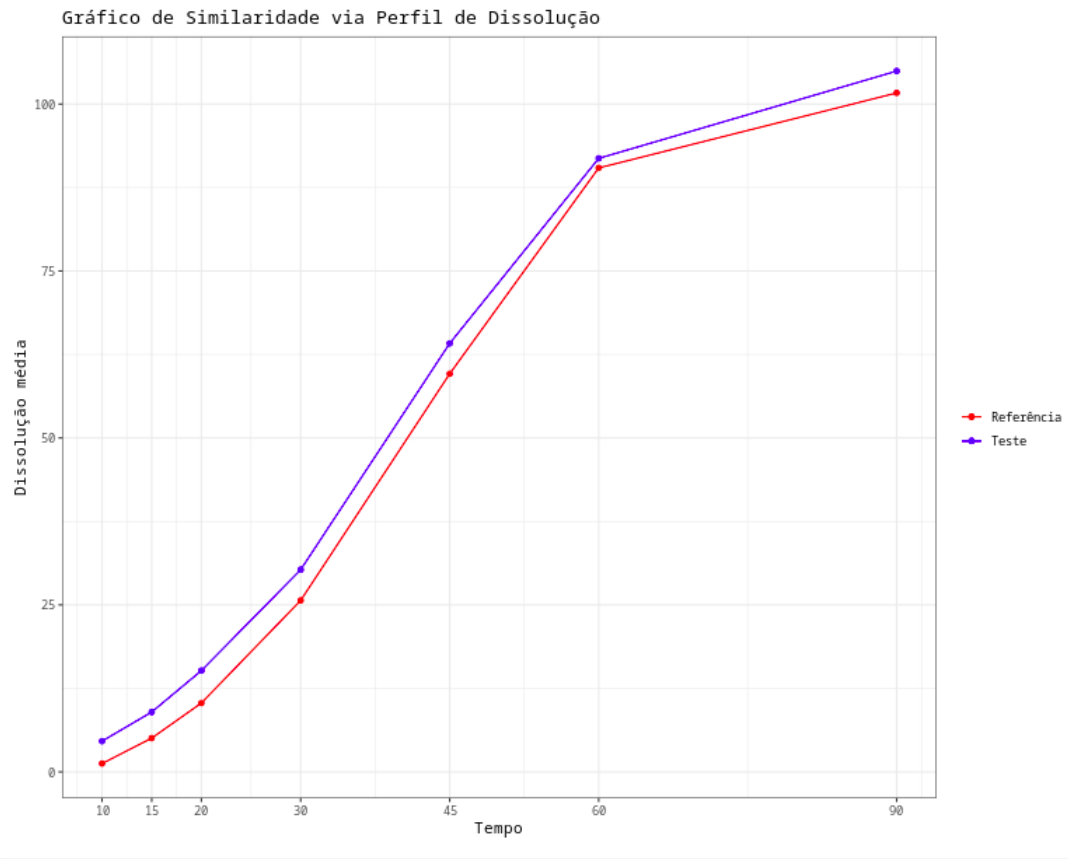
	10	15	20	30	45	60	90
Média	1.246	5.052	10.306	25.672	59.606	90.437	101.671
Desvio-padrão	0.649	1.296	1.335	2.471	3	3.698	1.303
RSD (%)	52.087	25.653	12.954	9.625	5.033	4.089	1.282

Resumo Descritivo para Medicamento Teste

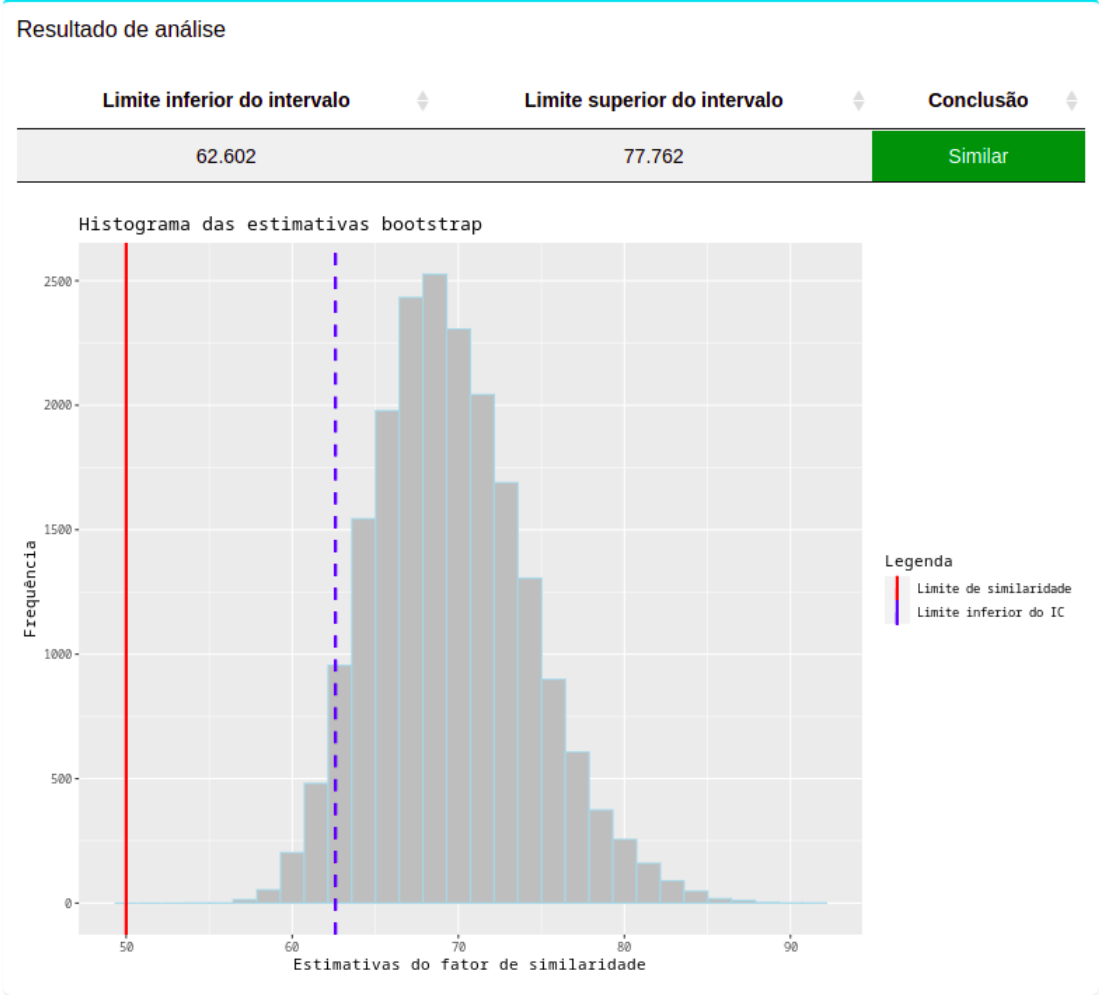
	10	15	20	30	45	60	90
Média	4.598	8.963	15.158	30.28	64.158	91.871	104.948
Desvio-padrão	2.132	2.252	3.102	4.415	4.428	3.062	1.66
RSD (%)	46.368	25.126	20.464	14.581	6.902	3.333	1.582

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Gráfico de perfis



GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	



E conclui-se que os perfis são similares.

4.4 Modelo Dependente

O modelo dependente, apresentado no guia [2], assim como o modelo independente multivariado é um método alternativo para o estudo de perfil de dissolução comparativo quando algum dos critérios exigidos para os coeficientes de variação não são satisfeitos para a aplicação dos fatores do modelo independente simples.

Proposto por Sathe *et al* em 1996 [6], o modelo dependente consiste em encontrar o melhor modelo que explique os dados, de modo que ocorra uma redução da dimensionalidade destes e conclusões visuais, obtidas por meio da região de similaridade e de confiança, possam ser realizadas. O modelo dependente utiliza a distância de Mahalanobis, apresentada na Seção 4.2.1, a qual mede a discrepância entre os perfis de dissolução ponderando a variância e covariância das observações.

A seguir, apresenta-se o algoritmo para a realização do teste:

1. Ajuste de modelos para os dados do lote de referência agrupados. O guia [2] sugere os modelos Weibull,

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Probit, Logito, Gompertz e Quadrático, isto é, um modelo com não mais que três parâmetros. Neste protocolo, apresentam-se os modelos Weibull, Probit, Logístico, Gompertz e Higuchi;

2. Seleção do modelo que melhor se adeque aos dados, utilizando algum dos seguintes critérios de seleção:
 - modelo que minimize AIC;
 - modelo que minimize SQR (Soma do Quadrado do Resíduo);
 - modelo que maximize R^2 .
3. Ajuste do modelo selecionado para cada uma das observações do medicamento teste e o medicamento referência;
4. Especificação da região de similaridade dos perfis com base na variação dos parâmetros obtidos pelo ajuste do modelo;
5. Cálculo da distância de Mahalanobis estimada D_M entre as médias das dissoluções do medicamento teste e do medicamento referência;
6. Cálculo da região de confiança para a distância de Mahalanobis;
7. Comparação da região de confiança com a região de similaridade. Caso a região de confiança estiver contida na região de similaridade, conclui-se que os perfis de dissolução são equivalentes.

A aplicação do modelo dependente consiste em realizar os passos descritos acima. No restante desta seção será dado os detalhes associados a cada um destes passos, para isto, adota-se o modelo Weibull.

Passo 1

Ajuste os modelos para os dados do medicamento referência agrupados. Na Tabela 10 apresenta-se alguns modelos sugeridos pelo guia [2] e artigo [5].

Tabela 9: Modelos sugeridos no guia [2] e artigo [5]

Modelo	Forma
Weibull	$y(t) = y_{max}(1 - \exp(-\alpha t^\beta))$
Probit	$y(t) = y_{max}\Phi(\alpha + \beta \ln(t))$
Logístico	$y(t) = y_{max} \exp(\alpha + \beta \ln(t)) / \{1 + \exp(\alpha + \beta \ln(t))\}$
Gompertz	$y(t) = y_{max} \exp(-\alpha \exp(-\beta \ln(t)))$
Higuchi	$y(t) = y_{max}(\beta \sqrt{t})$

Após a linearização em cada modelo, tem-se:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 10: Linearização dos modelos

Modelo	Forma
Weibull	$y^*(t) = \ln \left(-\ln \left(1 - \frac{y(t)}{y_{max}} \right) \right) = \ln(\alpha) + \beta \ln(t)$
Probit	$y^*(t) = \phi^{-1} \left(\frac{y(t)}{y_{max}} \right) = \alpha + \beta \ln(t)$
Logístico	$y^*(t) = \ln \left(\frac{\frac{y(t)}{y_{max}}}{1 - \frac{y(t)}{y_{max}}} \right) = \alpha + \beta \ln(t)$
Gompertz	$y^*(t) = \ln \left(-\ln \left(\frac{y(t)}{y_{max}} \right) \right) = \alpha + \beta \ln(t)$
Higuchi	$y^*(t) = \frac{y(t)}{y_{max}} = \beta \sqrt{t}$

Passo 2

Seleção do modelo que melhor se adequa aos dados.

AIC

O Critério de Informação de Aikake (AIC) é definido como

$$AIC_p = -2 \log(L_p) + 2[(p + 1) + 1]$$

em que:

- L_p é a função de máxima verossimilhança do modelo (para mais detalhes ver [7]);
- p é o número de variáveis explicativas do modelo.

Tem-se que, quanto menor é o seu valor, mais parcimonioso é o modelo e, portanto, pode-se buscar o modelo com o menor AIC.

SQR

A Soma do Quadrado do Resíduo (SQR) é definida como

$$SQR = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

em que

- y_i : i-ésimo valor observado;
- $\hat{y}_i$: valor estimado para a i-ésima observação.

Assim, quanto menor é o seu valor, mais próximas as estimativas estão dos valores observados e melhor é o modelo.

R²

O coeficiente de determinação R² é definido como

$$R^2 = 1 - \frac{SQR}{SQT}$$

em que

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

- $SQR = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$;
- $SQT = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$;
- y_i : i -ésimo valor observado;
- $\hat{y}_i$: valor estimado para a i -ésima observação;
- $\bar{y}$: média das observações.

Quanto maior é o seu valor, maior é a porcentagem de variação explicada pelo modelo e, portanto, mais adequado ele está aos dados.

Passo 3

Com o modelo selecionado, estima-se os parâmetros. Em geral, conforme a Tabela 9, tem-se que:

- $y(t)$ representa a dissolução acumulada no tempo t , em porcentagem;
- y_{max} representa a dissolução máxima;
- α representa o parâmetro de escala do modelo;
- β representa o parâmetro de forma do modelo.

Ressalta-se que y_{max} não deve ser menor ou igual ao máximo das observações dos lotes teste e referência.

Para estimar os parâmetros α e β do modelo, utiliza-se o método de mínimos quadrados, transformando os dados conforme a Tabela 10. Assim, tem-se um modelo para cada medicamento, ou seja, tem-se doze modelos para cada medicamento.

Passo 4

A região de similaridade é definida com base na variância dos parâmetros obtidos para o medicamento referência. Assim, sendo

$$d_1 = \sqrt{\text{var}(\alpha_R)} \text{ e } d_2 = \sqrt{\text{var}(\beta_R)}$$

a composição da região de similaridade é dada por:

- Eixo x : $(-k \times d_1; k \times d_1)$
- Eixo y : $(-k \times d_2; k \times d_2)$

em que:

- $\text{var}(\alpha)$ representa a variância dos parâmetros de escala para os comprimidos do medicamento referência;
- $\text{var}(\beta)$ representa a variância dos parâmetros de forma para os comprimidos do medicamento referência;
- k representa o número de desvios-padrão. Sathe et al, [6] considerou $k = 1, 2, 3$, que correspondem a aproximadamente 68%, 95% e 99% dos casos.

Deve-se verificar se o logaritmo dos parâmetros estimados, $\ln(\alpha)$ e $\ln(\beta)$, têm distribuição normal multivariada. Para isto, aplica-se o teste de Royston, conforme descrito na subseção 4.2.4. Se o logaritmo dos parâmetros estimados têm distribuição normal multivariada, a região de similaridade é dada conforme a Figura a seguir:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

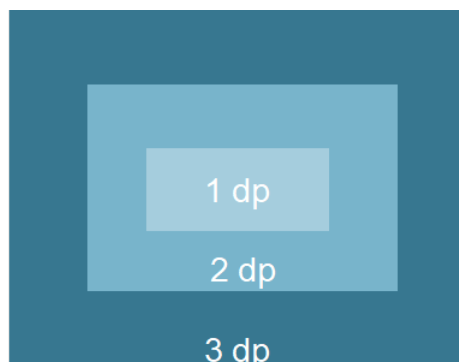


Figura 5: Região de similaridade.

Passo 5

Denote $\bar{\mathbf{z}} = (\bar{\mathbf{x}} - \bar{\mathbf{y}})$, em que:

- $\bar{\mathbf{x}} = \left(\frac{\sum_i^n \alpha_i}{n}; \frac{\sum_i^n \beta_i}{n} \right)$ representa a média dos parâmetros para o medicamento referência;
- $\bar{\mathbf{y}} = \left(\frac{\sum_i^n \alpha_i}{n}; \frac{\sum_i^n \beta_i}{n} \right)$ representa a média dos parâmetros para o medicamento teste;
- n representa o número de comprimidos para cada medicamento.

A distância de Mahalanobis estimada é dada por

$$D_M = \sqrt{\bar{\mathbf{z}}^T S_{pool}^{-1} \bar{\mathbf{z}}}.$$

A distância de Mahalanobis estimada, conforme descrito na Seção 4.2.1, corresponde a distância obtida para a diferença entre as médias observadas ponderada pela matriz de variância e covariância agrupada, a qual é dada por:

$$S_{pool} = \frac{S_R + S_T}{2}$$

em que:

- S_R é a matriz de variância e covariância dos parâmetros do medicamento referência;
- S_T é a matriz de variância e covariância dos parâmetros do medicamento teste.

Passo 6

Com a estimativa da distância de Mahalanobis, calcula-se a região de confiança para o verdadeiro valor da distância de Mahalanobis. A região de confiança, CR , com nível de significância α é dada por:

$$CR = \{K(y - \bar{\mathbf{z}})^T S_{pool}^{-1} (y - \bar{\mathbf{z}}) \leq F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}\}. \quad (14)$$

Em que $K = \left(\frac{m \cdot n}{m+n} \right) \left(\frac{m+n-p-1}{(m+n-2)p} \right)$ e $F_{(p, m+n-p-1, 1-\alpha)}$ o quantil de $100(1 - \alpha)\%$ da distribuição F de Snedecor com p graus de liberdade no numerador e $m + n - p - 1$ graus de liberdade no denominador.

Os y que satisfazem a desigualdade formam uma elipse, a qual representa a região de confiança.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Passo 7

Conclui-se que os perfis de dissolução são similares se a região de confiança estiver contida dentro da região de similaridade.

O fluxograma 6 ilustra as etapas a serem realizadas no estudo de equivalência entre os perfis de dissolução segundo o modelo dependente.

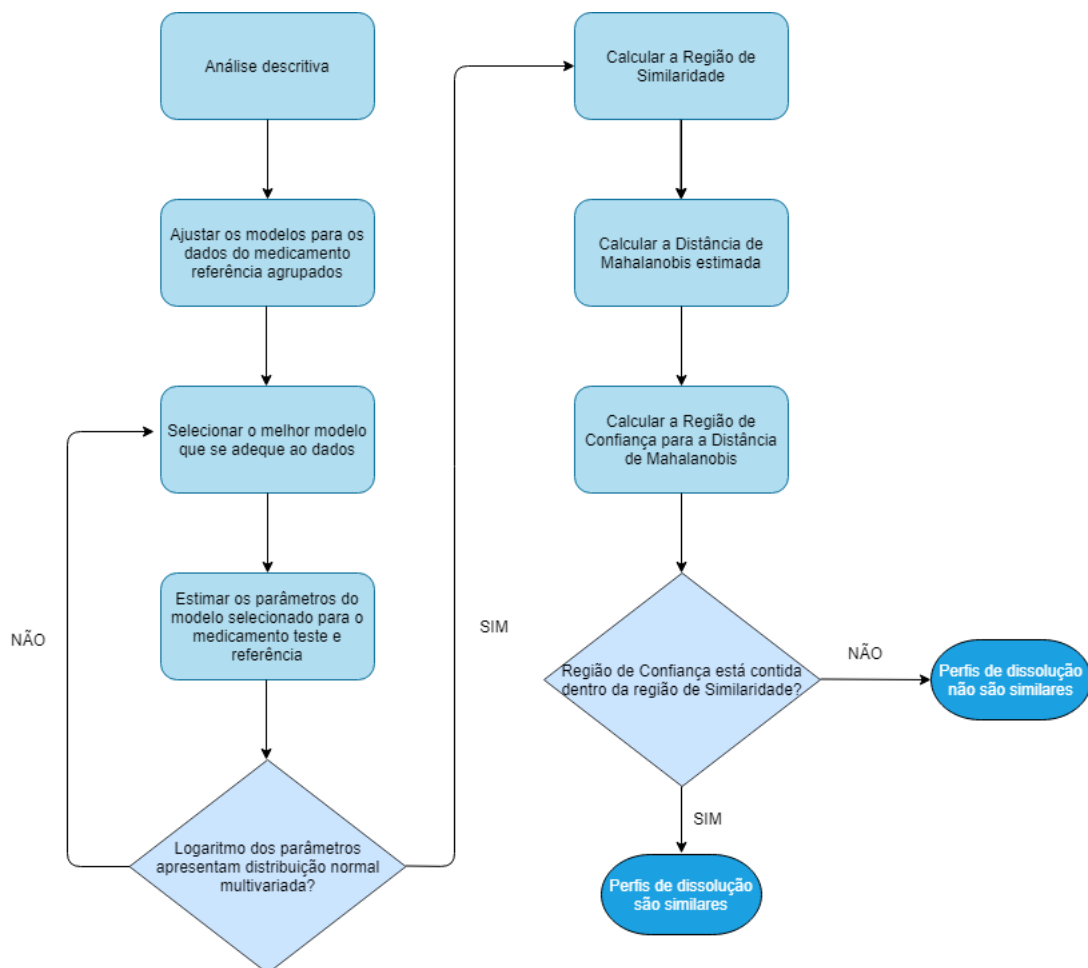


Figura 6: Fluxograma para o modelo dependente.

4.4.1 Gráfico de médias transformadas

O gráfico de médias transformadas da dissolução apresenta, no eixo x, os valores transformados dos tempos, e, no eixo y, os valores linearizados das dissoluções de acordo com o modelo selecionado, conforme Tabela 10. Assim, tem-se o gráfico do ajuste do modelo de regressão linear para os dados de teste e de referência e, quanto mais próximas as retas estiverem, maior é o indício de que os perfis são similares.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

4.4.2 Aplicação

Tem-se as seguintes medições exibidas na Tabela 11. Foram utilizadas 12 amostras para o medicamento teste e 12 para o medicamento de referência em 7 diferentes tempos de coleta.

Tabela 11: Experimento perfil de dissolução - exemplo 3.

Medicamento	10	15	20	30	45	60	90
Teste	1,75540	6,11765	8,12849	23,11199	62,59756	93,68092	102,08882
Teste	1,90504	4,78254	7,78196	26,22654	48,84576	90,09046	98,99838
Teste	0,99544	5,35327	9,03355	27,83873	56,31316	86,30538	100,28904
Teste	0,35104	6,26978	9,24692	26,54179	65,55399	88,94080	99,51165
Teste	1,95470	3,73882	10,48516	24,35081	58,53757	86,68736	99,57920
Teste	0,73469	4,15171	9,59335	26,58880	62,07072	88,45386	97,80333
Teste	0,43558	4,60079	9,55663	23,38638	60,98411	91,41679	101,21666
Teste	0,93251	5,88974	9,50763	26,59055	53,16869	84,77471	100,53056
Teste	0,29434	6,21265	6,75975	23,88144	59,53573	89,98092	101,47881
Teste	0,49723	4,81281	9,45157	27,29151	57,78985	92,91417	98,97528
Teste	1,71216	6,01989	10,47091	22,36621	55,80351	89,22002	100,35959
Teste	1,15622	5,68868	11,47067	21,78706	63,85500	97,07380	100,59205
Referência	6,26355	7,88517	19,03471	19,85315	69,27524	94,32446	104,48222
Referência	1,91936	8,78903	13,06000	29,89500	62,01864	92,31186	105,51553
Referência	5,90287	10,47132	19,17107	27,02512	63,61098	91,42777	105,74631
Referência	1,90607	9,46438	18,29586	36,41865	65,67760	90,42559	104,93029
Referência	5,25388	13,09009	20,58026	40,79825	69,41460	92,06778	103,87861
Referência	6,29913	11,53029	15,46481	24,42475	61,20546	87,65682	103,77419
Referência	4,84910	10,83830	16,60113	29,11001	62,31255	89,75092	104,83272
Referência	6,18121	8,10613	22,67939	28,49656	61,69196	95,95838	104,10408
Referência	1,40350	11,50675	11,33095	35,03031	54,44499	93,03407	104,03505
Referência	1,85253	6,61161	13,64478	29,13091	62,00603	89,74296	103,99741
Referência	4,46082	9,65391	13,54588	30,40949	68,02129	94,27593	103,10410
Referência	9,10968	10,36376	12,80054	32,43720	64,83148	91,81177	104,50940

Primeiramente, obtêm-se os vetores de médias do medicamento de teste e referência

$$\bar{x} = (4, 62; 9, 86; 16, 35; 30, 25; 63, 71; 91, 90; 104, 40)^T$$

$$\bar{y} = (1, 06; 5, 30; 9, 30; 25; 58, 75; 89, 96; 100, 10)^T$$

E os coeficientes de variação.

Tabela 12: Coeficientes de variação exemplo 3.

Conjuntos	10	15	20	30	45	60	90
Teste	59,34%	16,29%	13,73%	8,30%	8,09%	3,82%	1,20%
Referência	51,80%	18,45%	21,94%	18,25%	6,54%	2,52%	0,72%

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tem-se que os tempos de coleta 10 e 20 minutos, os quais estão contidos nos primeiros 40% pontos de coleta, possuem coeficientes de variação superiores a 20%. Então, não pode-se aplicar o modelo independente simples e utiliza-se o modelo dependente. Adotando-se $y_{max} = 110$ e seguindo os passos como descrito em 4.4 utilizando o modelo Weibull, tem-se os resultados abaixo.

O primeiro tempo de medição de dissolução transformado é dado por:

$$\log(10) = 2,30259$$

A primeira medição de dissolução transformada do medicamento teste é dada por:

$$\ln\left(-\ln\left(1 - \frac{y(t)}{y_{max}}\right)\right) = \ln\left(-\ln\left(1 - \frac{1,75540}{110}\right)\right) = -4,129750$$

E a primeira medição de dissolução transformada do medicamento referência é dada por:

$$\ln\left(-\ln\left(1 - \frac{y(t)}{y_{max}}\right)\right) = \ln\left(-\ln\left(1 - \frac{6,26355}{110}\right)\right) = -2,836562$$

Na Tabela 13 apresentam-se as medições transformadas dos perfis de dissolução do medicamento teste e referência.

Tabela 13: Dados transformados do experimento perfil de dissolução.

Medicamento	2,30259	2,70805	2,99573	3,40120	3,80666	4,09434	4,49981
Teste	-4,12975	-2,86083	-2,56697	-1,44452	-0,17220	0,64613	0,96782
Teste	-4,04726	-3,11336	-2,61221	-1,30062	-0,53259	0,53607	0,83397
Teste	-4,70051	-2,99793	-2,45700	-1,23170	-0,33224	0,42868	0,88675
Teste	-5,74574	-2,83554	-2,43261	-1,28687	-0,09849	0,50268	0,85451
Teste	-4,02130	-3,36447	-2,30085	-1,38541	-0,27493	0,43921	0,85725
Teste	-5,00544	-3,25779	-2,39413	-1,28483	-0,18542	0,48875	0,78815
Teste	-5,52958	-3,15297	-2,39815	-1,43119	-0,21278	0,57561	0,92728
Teste	-4,76610	-2,89988	-2,40353	-1,28475	-0,41492	0,38705	0,89707
Teste	-5,92216	-2,84497	-2,75795	-1,40750	-0,24947	0,53286	0,93920
Teste	-5,39692	-3,10691	-2,40972	-1,25471	-0,29410	0,62178	0,83306
Teste	-4,15489	-2,87740	-2,30228	-1,48142	-0,34550	0,51072	0,88975
Teste	-4,55004	-2,93557	-2,20613	-1,51083	-0,14077	0,76138	0,89972
Referência	-2,83656	-2,59854	-1,66072	-1,61425	-0,00638	0,66700	1,09611
Referência	-4,03970	-2,48563	-2,06840	-1,14841	-0,18673	0,60300	1,16311
Referência	-2,89759	-2,30224	-1,65285	-1,26605	-0,14686	0,57595	1,17948
Referência	-4,04671	-2,40830	-1,70423	-0,91108	-0,09542	0,54596	1,12402
Referência	-3,01714	-2,06594	-1,57437	-0,76905	-0,00293	0,59547	1,06080
Referência	-2,83073	-2,20065	-1,88712	-1,38197	-0,20719	0,46622	1,05493
Referência	-3,09923	-2,26598	-1,81032	-1,17964	-0,17935	0,52613	1,11780
Referência	-2,85019	-2,56983	-1,46580	-1,20452	-0,19494	0,72196	1,07371
Referência	-4,35510	-2,20281	-2,21908	-0,95869	-0,38110	0,62550	1,06973
Referência	-4,07545	-2,78082	-2,02163	-1,17880	-0,18705	0,52590	1,06757
Referência	-3,18452	-2,38754	-2,02941	-1,12829	-0,03737	0,66541	1,01869
Referência	-2,44823	-2,31310	-2,08977	-1,05156	-0,11644	0,58762	1,09776

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Com os dados transformados, obtêm-se as estimativas dos parâmetros, por meio do método de mínimos quadrados, para os parâmetros dos modelos para o medicamento teste e referência.

Na Tabela 14 apresenta-se as estimativas para os parâmetros obtidos para cada comprimido do medicamento teste. Observe que, conforme requerido pela resolução [1] da ANVISA e o guia [2] do FDA, tem-se $n = 12$ comprimidos.

Tabela 14: Estimativas dos parâmetros para o medicamento teste.

Escala	Forma
-9,63280	0,88815
-9,48440	0,85807
-10,09568	0,92873
-11,23054	1,04315
-9,53339	0,86744
-10,60258	0,97891
-11,30465	1,04816
-10,04425	0,92138
-11,67954	1,07913
-11,01923	1,02154
-9,36933	0,85217
-10,00383	0,93003

Da Tabela 14 obtêm-se que a média das estimativas dos parâmetros escala e forma, respectivamente, são dadas por:

$$\bar{y}_1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{1i} = \frac{-9,63280 + \dots + (-10,00383)}{12} = -10,33335$$

$$\bar{y}_2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{2i} = \frac{0,88815 + \dots + 0,93003}{12} = 0,95141$$

Assim $\bar{\mathbf{y}} = (-10,33335; 0,95141)^T$

Na Tabela 15 apresenta-se as estimativas para os parâmetros obtidos para cada comprimido do medicamento referência.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 15: Estimativas dos parâmetros para o medicamento referência.

Escala	Forma
-7,65572	0,67235
-9,08198	0,84474
-7,43629	0,64864
-8,76719	0,81662
-7,21826	0,63116
-7,24147	0,60740
-7,62359	0,66887
-7,45454	0,65189
-9,16099	0,85004
-9,21259	0,85241
-7,93762	0,71112
-7,06363	0,59376

Da Tabela 15 obtém-se que a média das estimativas dos parâmetros escala e forma, respectivamente, são dadas por:

$$\bar{x}_1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{1i} = \frac{-7,65572 + \dots + (-7,06363)}{12} = -7,987825$$

$$\bar{x}_2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{2i} = \frac{0,67235 + \dots + 0,59376}{12} = 0,71242$$

Assim $\bar{\mathbf{x}} = (-7,987825; 0,71242)^T$

Previamente a definição da região de similaridade, deve-se verificar se os parâmetros estimados seguem uma distribuição normal multivariada. Conforme descrito na subseção 4.2.4, aplica-se o teste de Royston, do qual obtém-se:

Tabela 16: Teste de normalidade multivariada para o medicamento teste.

Estatística H	P-valor
0,720150	0,1934026

Tabela 17: Teste de normalidade multivariada para o medicamento referência.

Estatística H	P-valor
2,292835	0,0524035

Adotando-se o nível de significância de 5%, tem-se que, para os medicamentos teste e referência, Tabelas 16 e 17 respectivamente, as estimativas dos parâmetros seguem distribuição normal multivariada.

E a região de similaridade é dada por:

$$d_1 = \sqrt{\text{var}(\alpha_R)} = \sqrt{0,6834944} = 0,8267372$$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$d_2 = \sqrt{\text{var}(\beta_R)} = \sqrt{0,009986852} = 0,09993424$$

Adotando-se $k = 1, 2, 3$, obtêm-se a composição da região de similaridade, a qual é dada por:

- Eixo x : $(-k \times d_1; k \times d_1) =$
 - $(-0,82674; 0,82674)$, para $k = 1$
 - $(-1,65348; 1,65348)$, para $k = 2$
 - $(-2,48022; 2,48022)$, para $k = 3$
- Eixo y : $(-k \times d_2; k \times d_2) =$
 - $(-0,09993; 0,09993)$, para $k = 1$
 - $(-0,19986; 0,19986)$, para $k = 2$
 - $(-0,29979; 0,29979)$, para $k = 3$

O vetor de diferença das médias entre os medicamentos teste e referência é dado por:

$$\bar{\mathbf{z}} = (\bar{\mathbf{x}} - \bar{\mathbf{y}}) = (-2,34553; 0,23899)$$

Seguindo os passos descritos na subseção 4.4, obtêm-se as matrizes de variância e covariância das medições do medicamento teste e referência, as quais são dadas por:

$$S_T^2 = \begin{bmatrix} 0,648448 & -0,064657 \\ -0,064657 & 0,006477 \end{bmatrix}$$

$$S_R^2 = \begin{bmatrix} 0,683494 & -0,082381 \\ -0,082381 & 0,009987 \end{bmatrix}$$

Assim obtém-se a matriz de variância e covariância agrupada.

$$S_{pool}^2 = \frac{(n-1)S_R^2 + (m-1)S_T^2}{n+m-2}$$

$$S_{pool}^2 = \begin{bmatrix} 0,665971 & -0,073519 \\ -0,073519 & 0,008232 \end{bmatrix}$$

E calcula-se sua inversa

$$S_{pool}^{-1} = \begin{bmatrix} 106,5617 & 951,6886 \\ 951,6886 & 8620,8836 \end{bmatrix}$$

Calculando-se a distância de Mahalanobis estimada, obtém-se:

$$\hat{D}_M = \sqrt{\bar{\mathbf{z}}^T S_{pool}^{-1} \bar{\mathbf{z}}} = 3,4189$$

O próximo passo consiste em calcular a região de confiança para a distância de Mahalanobis CR . Fixa-se um nível de significância de 10% e para o delineamento apresentado (12 comprimidos de cada medicamento e 2 parâmetros), tem-se que a constante K é igual a:

$$K = \left(\frac{mn}{m+n} \right) \left(\frac{m+n-p-1}{(m+n-2)p} \right) = \left(\frac{12 \times 12}{24} \right) \left(\frac{24-2-1}{(24-2)2} \right) = 2,863636$$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

A região de confiança é dada por:

$$CR = \{2,86363(y - (-2,34553; 0,23899))^T S_{pool}^{-1}(y - (-2,34553; 0,23899)) \leq F_{(2,21,0,90)}\}$$

Observando a Figura 7, tem-se que a elipse obtida a partir da região de confiança não está inteiramente contida na região de similaridade, assim conclui-se que os perfis de dissolução não são equivalentes.

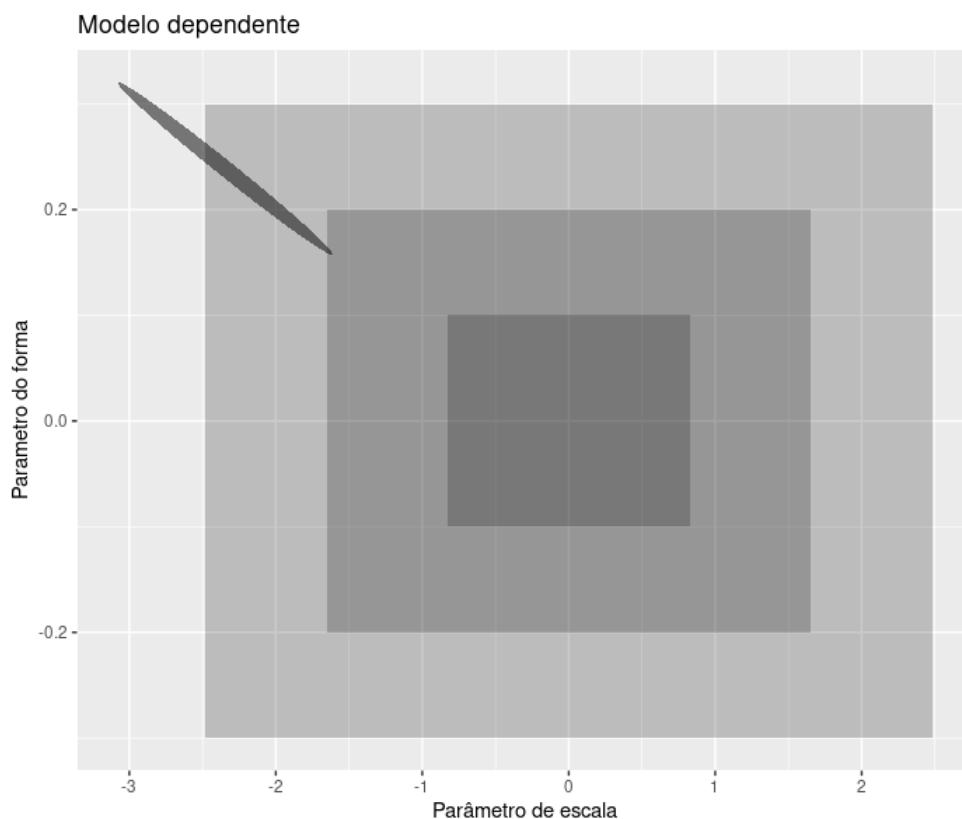


Figura 7: Gráfico da região crítica do modelo dependente.

Os resultados do Action Stat são dados a seguir.

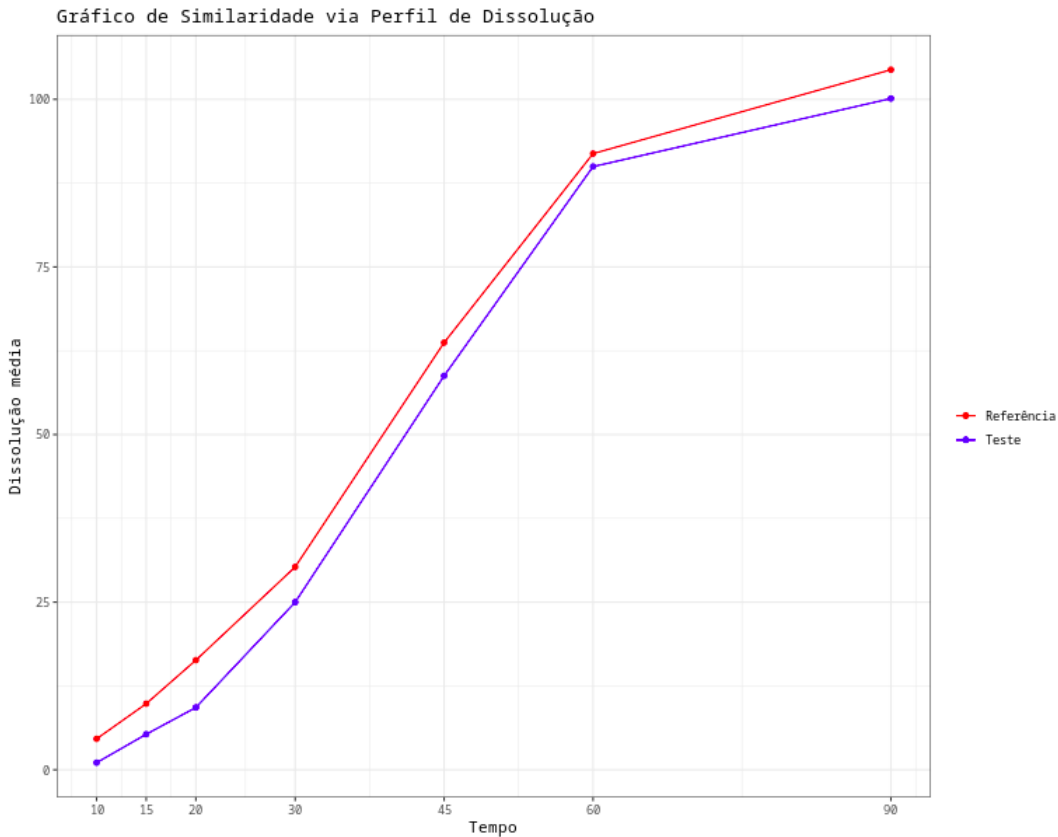
GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

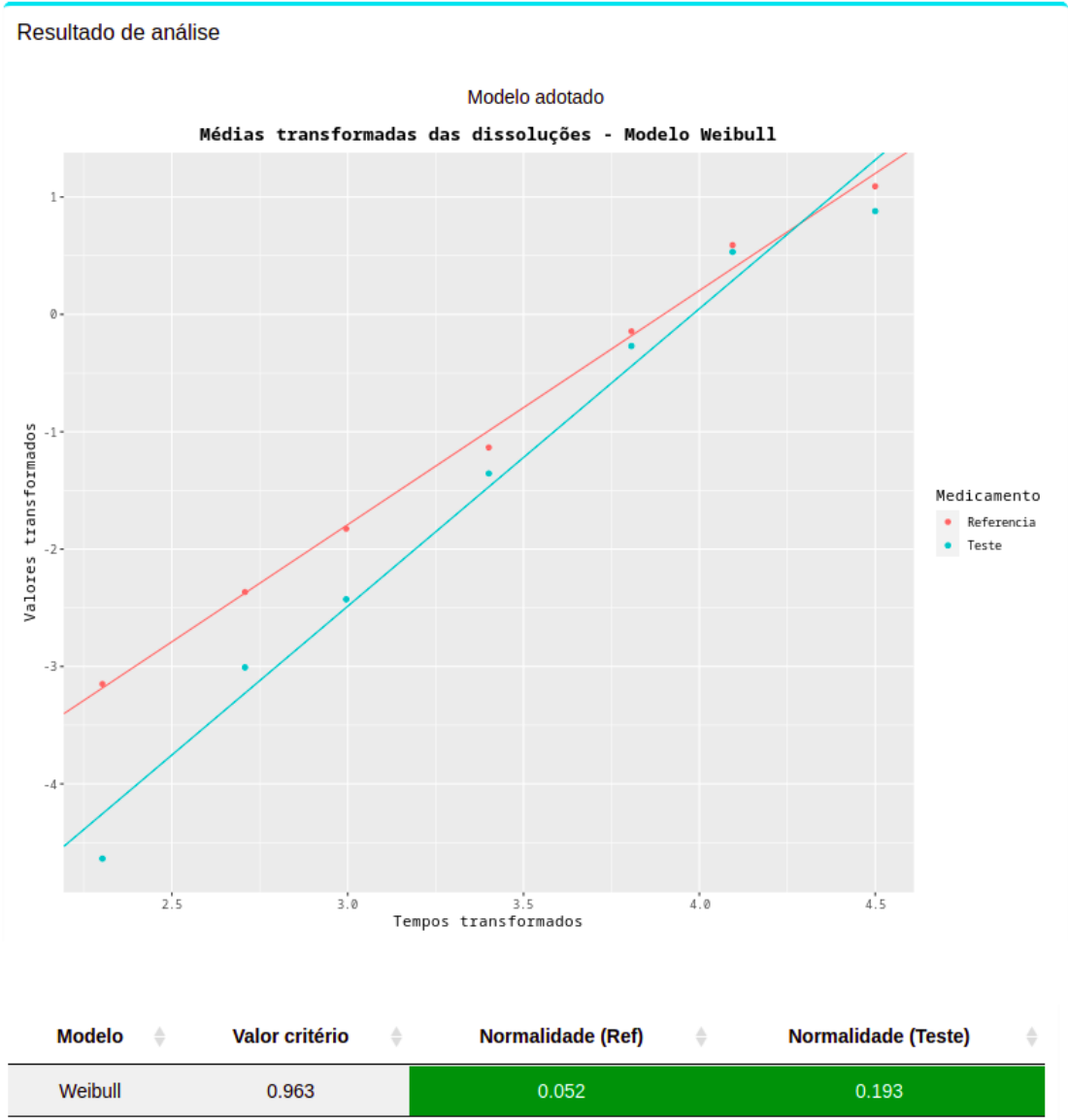
Resumo Descritivo para Medicamento Referência							
	10	15	20	30	45	60	90
Média	4.617	9.859	16.351	30.252	63.709	91.899	104.409
Desvio-padrão	2.391	1.819	3.587	5.52	4.169	2.319	0.755
RSD (%)	51.787	18.45	21.937	18.247	6.544	2.523	0.723

Resumo Descritivo para Medicamento Teste							
	10	15	20	30	45	60	90
Média	1.06	5.303	9.291	24.997	58.755	89.962	100.119
Desvio-padrão	0.629	0.864	1.276	2.075	4.754	3.439	1.206
RSD (%)	59.34	16.293	13.734	8.301	8.091	3.823	1.205

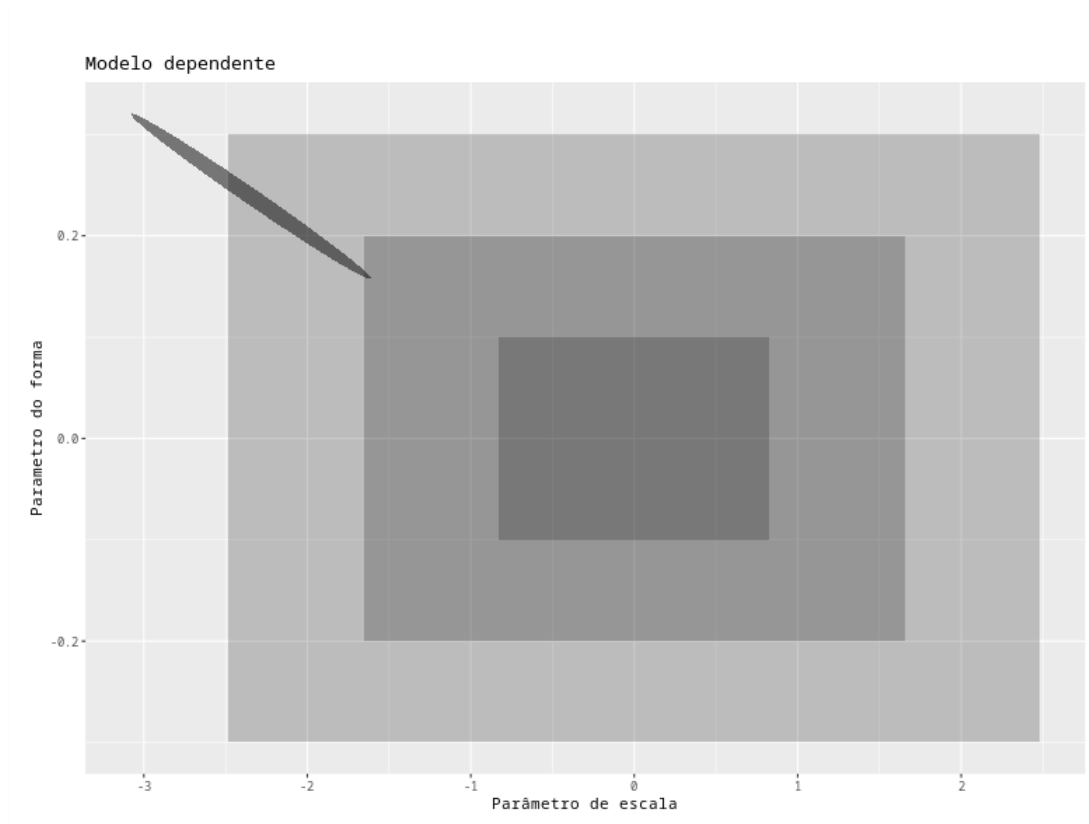
GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão:
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	1 de dezembro de 2023

Gráfico de perfis





GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão:
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	1 de dezembro de 2023



4.5 Cálculo de fator de correção para perfil de dissolução

A seguir, apresentam-se as fórmulas utilizadas na aplicação do fator de correção em dados para a comparação de perfis.

Denotam-se a medição da porcentagem dissolvida antes e após a correção por D e D' , respectivamente. Seja D_0 a medição obtida no primeiro ponto, $D'_0 = D_0$, a medição corrigida no i -ésimo ponto, $i = 1, \dots, n$, é dada por

$$D'_i = \begin{cases} D_i - D'_{i-1} \cdot \frac{V_{\text{coletado}}}{V_{\text{cuba}} - (i \cdot V_{\text{coletado}})}, & \text{se } V_{\text{reposição}} = 0, \\ D_i + D'_{i-1} \cdot \frac{V_{\text{reposição}}}{V_{\text{cuba}}}, & \text{caso contrário,} \end{cases} \quad (15)$$

em que

- V_{coletado} : volume coletado,
- V_{cuba} : volume de cuba,
- $V_{\text{reposição}}$: volume de reposição.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

4.5.1 Aplicação

Considere os seguintes dados:

Tabela 18: Dados antes de correção

Tempo (Min.)	5	10	15	20	30	45	60
% Dissolvida							
Cuba 1	34,67	71,97	83,37	88,10	91,20	94,78	96,23
Cuba 2	40,99	83,32	93,47	92,46	94,44	94,75	95,45
Cuba 3	28,80	65,73	76,63	92,65	93,38	98,22	98,22
Cuba 4	36,99	71,21	82,42	85,55	97,10	94,70	95,59
Cuba 5	36,85	80,88	85,67	90,50	92,60	94,39	95,76
Cuba 6	19,04	59,66	74,31	79,96	84,80	98,36	98,39

Exemplificam-se os cálculos de medição corrigida para a cuba 1:

- $D'_{10} = 71,97 - 34,67 \cdot \frac{10}{890} = 71,58$
- $D'_{15} = 83,37 - 71,58 \cdot \frac{10}{880} = 82,56$
- $D'_{20} = 88,10 - 82,56 \cdot \frac{10}{870} = 87,15$
- $D'_{30} = 91,20 - 87,15 \cdot \frac{10}{860} = 90,19$
- $D'_{45} = 94,78 - 90,19 \cdot \frac{10}{850} = 93,72$
- $D'_{60} = 96,23 - 93,72 \cdot \frac{10}{840} = 95,11$

Os dados depois da aplicação de fator de correção são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Dados após correção

Tempo (Min.)	5	10	15	20	30	45	60
% Dissolvida							
Cuba 1	34,67	71,58	82,56	87,15	90,19	93,72	95,11
Cuba 2	40,99	82,86	92,53	91,40	93,38	93,65	94,34
Cuba 3	28,80	65,41	75,89	91,78	92,31	97,13	97,06
Cuba 4	36,99	70,79	81,62	84,61	96,12	93,57	94,48
Cuba 5	36,85	80,47	84,76	89,53	91,56	93,31	94,65
Cuba 6	19,04	59,45	73,63	79,11	83,88	97,37	97,23

5 Teste de Bioequivalência Populacional *in vitro*

A avaliação clínica de equivalência terapêutica de medicamentos é baseada na suposição de bioequivalência fundamental, que diz quando dois medicamentos são equivalentes em biodisponibilidade, eles atingem o mesmo efeito

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

terapêutico segundo Chow e Liu [21]. O método estatístico proposto por Chow et al. [20] para avaliação dos testes de bioequivalência é apresentado a seguir.

Sejam y_T, y_R e y'_R independentes nas biodisponibilidades *in vitro*, sendo y_T provenientes do medicamento teste e y_R, y'_R provenientes do medicamento de referência. Conforme descrito no guia FDA, diz-se que os dois produtos são bioequivalentes *in vitro* se $\theta < \theta_{BE}$ em que

$$\theta = \frac{E(y_R - y_T)^2 - E(y_R - y'_R)^2}{\max\{\sigma_0^2, E(y_R - y'_R)^2/2\}}, \quad (16)$$

θ_{BE} e σ_0^2 são limite de equivalência e constante, respectivamente, ambos são prefixados.

Suponha que m_T e m_R são o numero de elementos (amostras), dos medicamentos teste e a referencia respectivamente, para testar a bioequivalência *in vitro*. Os dados são descritos pelo seguinte modelo:

$$y_{jk} = \mu_k + \epsilon_{jk}, \quad j = 1, \dots, m_k \quad (17)$$

em que:

- $k = T$ para o medicamento teste;
- $k = R$ para o medicamento referência;
- μ_T e μ_R são efeitos fixos do produto;
- ϵ_{jk} 's são erros aleatórios independentes e identicamente distribuídos $N(0, \sigma_k^2)$, $k = T, R$.

Sob modelo 17, o parâmetro θ na equação 16 é igual a

$$\theta = \frac{(\mu_T - \mu_R)^2 + \sigma_T^2 - \sigma_R^2}{\max\{\sigma_0^2, \sigma_R^2\}}. \quad (18)$$

Tem-se $\theta < \theta_{BE}$ se e somente se $\zeta < 0$, em que

$$\zeta = (\mu_T - \mu_R)^2 + \sigma_T^2 - \sigma_R^2 - \theta_{BE} \max\{\sigma_0^2, \sigma_R^2\}. \quad (19)$$

Sob modelo 17, o melhor estimador não viesado para $\delta = \mu_T - \mu_R$ é dado por

$$\hat{\delta} = \bar{y}_T - \bar{y}_R \sim N\left(0, \frac{\sigma_T^2}{m_T} + \frac{\sigma_R^2}{m_R}\right)$$

em que $\bar{y}_k$ é a media de y_{jk} sobre j para um k fixo. O melhor estimador não viesado para σ_k^2 é

$$s_k^2 = \frac{1}{m_k - 1} \sum_{j=1}^{m_k} (y_{jk} - \bar{y}_k)^2 \sim \frac{\sigma_k^2 \chi_{m_k-1}^2}{m_k - 1}, \quad k = T, R,$$

onde χ_t^2 denota a distribuição Qui-quadrado com t graus de liberdade. Pode-se obter um limite superior de confiança de 95% aproximado para ζ expresso na equação 19 por:

$$\tilde{\zeta}_U = \hat{\delta}^2 + s_T^2 - s_R^2 - \theta_{BE} \max\{\sigma_0^2, s_R^2\} + \sqrt{U}, \quad (20)$$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

em que U é a soma dos seguintes três quantis

$$q_1 = \left[\left(|\hat{\delta}| + z_{0,95} \sqrt{\left\{ \frac{s_T^2}{m_T} + \frac{s_R^2}{m_R} \right\}} \right)^2 - \hat{\delta}^2 \right]^2,$$

$$q_2 = s_T^4 \left(\frac{m_T - 1}{\chi_{0,05;m_T-1}^2} - 1 \right)^2$$

e

$$q_3 = (1 + c\theta_{BE})^2 s_R^4 \left(\frac{m_R - 1}{\chi_{0,95;m_R-1}^2} - 1 \right)^2$$

$c = 1$ se $s_R^2 \geq \sigma_0^2$, $c = 0$ se $s_R^2 < \sigma_0^2$, z_a é o a -ésimo quantil de uma distribuição normal padrão e $\chi_{t;a}^2$ é o a -ésimo quantil de uma distribuição Qui-quadrado com t graus de liberdade.

Se $\tilde{\zeta}_U < 0$, então, conclui-se que é bioequivalente *in vitro*.

5.1 Teste por bioequivalência *in vitro* via métricas convencionais

Para a distribuição de perfil determinada pelas descritivas convencionais - D10, D50, D90 e Span, a bioequivalência populacional é avaliada a partir do cálculo de $\tilde{\zeta}_U$ (20) e das médias geométricas entre produto teste e referência. Conforme descrito no ANEXO 2 [22], pode-se concluir os medicamentos teste e de referência são bioequivalentes *in vitro* se:

- (a) $\tilde{\zeta}_U < 0$;
- (b) O limite superior de confiança de 95% do critério é menor que $\theta_{BE} = 1,11$;
- (c) A razão das médias geométricas entre os produtos de teste e referência estiver dentro do intervalo de 90% a 111%.

Ressalta que o cumprimento do item (a) implica o item (b), como foi demonstrada na derivação da estatística $\tilde{\zeta}_U$.

5.2 Aplicação

Considera-se os seguintes dados:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 20: Dados de Entrada

Medicamento Referência					Medicamento Teste				
Lote	D10	D50	D90	Span	Lote	D10	D50	D90	Span
2B429A	2,77	12,80	57,20	4,260	096/22	6,85	22,20	91,20	3,797
2B429A	4,80	21,40	77,50	3,394	096/22	7,13	22,50	73,90	2,970
2B429A	4,05	17,10	75,60	4,179	096/22	5,75	19,80	84,90	3,996
2B429A	3,95	17,80	67,80	3,584	096/22	6,77	21,00	90,00	3,963
2B429A	4,08	16,80	65,20	3,636	096/22	6,88	22,60	94,10	3,856
2B429A	4,51	19,80	75,00	3,564	096/22	6,57	20,90	89,60	3,967
2B429A	4,22	19,10	73,30	3,625	096/22	6,13	19,50	80,10	3,799
2B429A	3,52	16,20	63,10	3,674	096/22	6,23	19,50	75,90	3,573
2B429A	3,78	19,20	91,50	4,580	096/22	5,34	17,50	70,90	3,749
2B429A	3,48	17,00	71,60	4,003	096/22	6,51	21,10	78,30	3,404
2B429A	4,12	17,10	57,80	3,130	097/22	4,54	15,90	50,70	2,901
2B429A	3,85	16,60	73,00	4,174	097/22	5,02	17,50	57,70	3,015
2B429A	3,81	16,30	71,90	4,167	097/22	4,74	16,60	54,70	3,010
2B429A	4,35	19,00	82,40	4,106	097/22	5,33	17,70	58,70	3,020
2B429A	3,26	13,80	60,30	4,124	097/22	5,32	19,30	59,10	2,788
2H442A	3,92	16,90	75,80	4,259	097/22	5,54	18,60	56,90	2,769
2H442A	4,80	21,40	94,80	4,211	097/22	5,98	22,50	80,30	3,304
2H442A	5,53	23,90	97,70	3,863	097/22	4,85	17,00	58,20	3,145
2H442A	4,61	18,40	84,00	4,322	097/22	5,45	18,10	59,20	2,964
2H442A	5,02	20,20	97,30	4,567	097/22	5,58	21,80	76,10	3,232
2H442A	4,54	18,40	82,10	4,208	098/22	6,38	21,80	81,20	3,427
2H442A	4,70	18,00	80,20	4,203	098/22	3,95	16,10	61,20	3,548
2H442A	4,87	18,70	84,80	4,264	098/22	5,26	18,30	61,30	3,060
2H442A	5,56	21,40	87,40	3,823	098/22	5,31	18,80	61,00	2,968
2H442A	4,79	19,00	83,40	4,135	098/22	6,30	22,20	84,30	3,509
2H442A	4,48	17,70	77,70	4,148	098/22	7,21	24,80	94,90	3,532
2H442A	4,12	16,60	85,20	4,887	098/22	7,12	24,00	94,40	3,642
2H442A	4,42	17,90	81,60	4,309	098/22	6,56	20,70	72,70	3,188
2H442A	4,44	17,60	77,30	4,149	098/22	5,27	19,70	71,30	3,346
2H442A	4,13	16,30	82,30	4,788	098/22	4,50	15,70	53,80	3,146

Demonstra-se a seguir a obtenção da estatísticas para a métrica D10 na escala original.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

$$\begin{aligned}\bar{y}_R &= \frac{1}{30} \sum_{j=1}^{30} y_{jR} = \frac{1}{30} (2,77 + 4,80 + \dots + 4,44 + 4,13) \\ &= 4,2827\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}S_R^2 &= \frac{1}{30-1} \sum_{j=1}^{30} (y_{jR} - \bar{y}_R)^2 = \frac{1}{30-1} \left((2,77 - 4,2827)^2 + \dots + (4,13 - 4,2827)^2 \right) \\ &= 0,3792\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\bar{y}_T &= \frac{1}{30} \sum_{j=1}^{30} y_{jT} = \frac{1}{30} (6,85 + 7,13 + \dots + 5,27 + 4,5) \\ &= 5,8123\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}S_T^2 &= \frac{1}{30-1} \sum_{j=1}^{30} (y_{jT} - \bar{y}_T)^2 = \frac{1}{30-1} \left((6,85 - 5,8123)^2 + \dots + (4,5 - 5,8123)^2 \right) \\ &= 0,7704\end{aligned}$$

$$\hat{\delta} = 5,8123 - 4,2827 = 1,5297$$

$$\begin{aligned}q_1 &= \left[\left(|\hat{\delta}| + z_{0,95} \sqrt{\left\{ \frac{s_T^2}{m_T} + \frac{s_R^2}{m_R} \right\}} \right)^2 - \hat{\delta}^2 \right]^2 \\ &= \left[\left(1,5297 + 1,96 \sqrt{\left\{ \frac{0,7704}{30} + \frac{0,3792}{30} \right\}} \right)^2 - 1,5297^2 \right]^2 \\ &= 1,1854\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}q_2 &= s_T^4 \left(\frac{m_T - 1}{\chi_{0,05;m_T-1}^2} - 1 \right)^2 = 0,7704^2 \left(\frac{29}{17,7084} - 1 \right)^2 \\ &= 0,2143\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}q_3 &= (1 + c\theta_{BE})^2 s_R^4 \left(\frac{m_R - 1}{\chi_{0,95;m_R-1}^2} - 1 \right)^2 = (1 + 1,11)^2 0,3791^2 \left(\frac{29}{42,557} - 1 \right)^2 \\ &= 0,06495\end{aligned}$$

$$U = 1,4917$$

$$\tilde{\zeta}_U = \hat{\delta}^2 + s_T^2 - s_R^2 - \theta_{BE} \max \{ \sigma_0^2, s_R^2 \} + \sqrt{U} = 3,5316$$

Por fim, as estatísticas e o resultado para todas as métricas são apresentados na Tabela 21.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 21: Resultados

	Sem logaritmo				Com logaritmo			
	D10	D50	D90	Span	D10	D50	D90	Span
$\bar{y}_R$	4,2827	18,0800	77,8267	4,0779	1,4441	2,8873	4,3450	1,4009
S_R^2	0,3792	5,0354	115,0958	0,1556	0,0223	0,0158	0,0201	0,0099
$\bar{y}_T$	5,8123	19,7900	72,5533	3,3529	1,7486	2,9776	4,2660	1,2038
S_T^2	0,7704	6,0871	196,1577	0,1404	0,0241	0,0158	0,0382	0,0124
$\hat{\delta}$	1,5297	1,7100	-5,2733	0,7249	0,3044	0,0903	0,0789	0,1971
σ_0^2		0,0100				0,0100		
θ_{BE}		1,1100				1,1100		
c		1,0000				1,0000		
$quantil_1$	1,1854	19,6104	7047,2832	0,0695	0,0019	0,0002	0,0003	0,0004
$quantil_2$	0,2413	15,0655	15644,7099	0,0080	0,0002	0,0001	0,0006	0,0001
$quantil_3$	0,0650	11,4558	5985,0497	0,0109	0,0002	0,0001	0,0002	0,0000
U	1,4917	46,1317	28677,0427	0,0884	0,0024	0,0004	0,0011	0,0005
$\hat{\zeta}$	3,5316	5,1785	150,4566	0,6351	0,1184	0,0099	0,0345	0,0517
São bioequivalentes?	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não

O valor da estatística, em ambas as escalas, é maior que zero para os parâmetros D10, D50, D90 e Span. Assim, a condição estabelecida para zeta não é satisfeita.

5.3 Teste de bioequivalência populacional *in vitro* via EMD

Em caso de distribuição de perfil se mostra complexa (bimodal ou multimodal), o percentil 50 (D50) pode não representar com precisão o pico da distribuição, uma vez que nesses casos, por haver mais de um pico. Neste caso, percentil 50 poderia estar localizado na planície entre duas modas, o que representaria uma medida menos importante para o teste de equivalência. Logo, os testes de equivalência usualmente utilizados nas análises de perfil seriam inadequados para comparação de distribuições.

Hu et al. [23] fizeram proposta do uso de *Earth Movers's Distance* (EMD) como métrica alternativa. A distância EMD, é oriunda de uma clássica questão de transporte, considera duas distribuições (ou histogramas) como se fossem dois ‘montes de terra’, em que o objetivo seria encontrar o trabalho mínimo para transferir terra de um monte (ou estado) para outro, no qual o “trabalho” se refere a transportar uma unidade de terra por uma unidade de distância entre os locais das pilhas. Portanto, o EMD é um algoritmo de otimização que considera tanto a quantidade quanto a distância do movimento do solo, permitindo o cálculo em vários histogramas de comprimento sem suposições sobre a distribuição dos dados. Este método mostra um melhor desempenho se comparado à distância euclideana ou à distância de Kolmogorov-Smirnov.

Nas subseções a seguir, apresenta-se primeiro a definição matemática da distância EMD e, em seguida, um procedimento passo a passo para a avaliação da bioequivalência populacional *in vitro*.

5.3.1 Distância EMD

Sejam $P = \{(x_1, p_1), \dots, (x_m, p_m)\}$ e $Q = \{(y_1, q_1), \dots, (y_n, q_n)\}$ os dois histogramas de interesse em que x_i e y_j representam a i -ésima e j -ésima informação de locação do respectivo histograma P e Q , e p_i e q_j representam a quantidade de solo na locação correspondente para $i = 1, \dots, m$ e $j = 1, \dots, n$. A matriz de distâncias das distribuições $D = [d_{ij}]$ é definida de forma que d_{ij} é a distância do solo entre x_i e y_j que é calculada por alguma medida de dissimilaridade, por exemplo, a distância euclideana. A distância EMD é definida com intuito de encontrar

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

um fluxo de trabalho ótimo $F = [f_{ij}]$, o qual minimiza o custo total:

$$WORK(P, Q, F) = \sum_i^m \sum_j^n d_{ij} f_{ij}$$

o fluxo de trabalho f_{ij} deve atender às seguintes restrições:

$$\begin{aligned} f_{ij} &\geq 0, \quad 1 \leq i \leq m, 1 \leq j \leq n \\ \sum_j^n f_{ij} &\leq p_i, \quad 1 \leq i \leq m \\ \sum_i^m f_{ij} &\leq q_j, \quad 1 \leq j \leq n \\ \sum_i^m \sum_j^n f_{ij} &= \min\left(\sum_i^m p_i, \sum_j^n q_j\right) \end{aligned}$$

Uma vez que o fluxo ótimo f_{ij}^* é encontrado, o EMD entre P e Q é definido como:

$$EMD(P, Q) = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n f_{ij}^* d_{ij}}{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n f_{ij}^*}.$$

5.3.2 Passos para a análise de bioequivalência via distância EMD

A seguir, apresenta-se o procedimento para avaliação de bioequivalência populacional.

1. Primeiramente, calcula-se o perfil médio da referência a partir das n amostras ou colunas dos dados:

$$\overline{C}_j = \frac{\sum_{k=1}^n R_{jk}}{n}, j = 1, \dots, m.$$

Ao termino do cálculo de cada $\overline{C}_j$, obtém-se os m elementos da distribuição média.

2. Calcula-se a distância EMD das n amostras de distribuição da referência contra a distribuição média da referência. Ao termino do cálculo, obtém-se o vetor d_R .
3. Calcula-se a distância EMD das n amostras de distribuição do teste contra a distribuição média da referência. Ao término do cálculo, obtém-se o vetor d_T .
4. Calcula-se as média e variância dos d_R e d_T conforme apresentado na Tabela 22, $N_R = N_T = n$.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 22: Cálculo das distâncias EMD.

	Refêrencia	Teste
Distâncias	$d_R = EMD(R, C)$	$d_T = EMD(T, C)$
Médias	$\bar{d}_R = \frac{\sum_{k=1}^n d_{Rk}}{N_R}$	$\bar{d}_T = \frac{\sum_{k=1}^n d_{Tk}}{N_T}$
Variâncias	$S_{d_R}^2 = \frac{\sum_{k=1}^n (d_{Rk} - \bar{d}_R)^2}{N_R - 1}$	$S_{d_T}^2 = \frac{\sum_{k=1}^n (d_{Tk} - \bar{d}_T)^2}{N_T - 1}$

5. Avalia-se o teste de bioequivalência populacional utilizando os dois vetores calculados anteriormente d_R e d_T . Para isso, realizam-se os seguintes cálculos:

$$\begin{aligned}\hat{\delta} &= \bar{d}_T - \bar{d}_R \\ \sigma_0^2 &= 0,01 \\ c &= \begin{cases} 1, & \text{se } S_{d_R}^2 \geq \sigma_0^2 \\ 0, & \text{se } S_{d_R}^2 < \sigma_0^2 \end{cases} \\ \theta_{BE} &= 1,11 \\ q_1 &= \left[\left(|\hat{\delta}| + z_{0,95} \sqrt{\frac{S_{d_T}^2}{N_T} + \frac{S_{d_R}^2}{N_R}} \right)^2 - \hat{\delta}^2 \right]^2 \\ q_2 &= S_{d_T}^4 \left(\frac{N_T - 1}{\chi_{0,05;N_T-1}^2} - 1 \right)^2 \\ q_3 &= (1 + c\theta_{BE})^2 S_{d_R}^4 \left(\frac{N_R - 1}{\chi_{0,95;N_R-1}^2} - 1 \right)^2 \\ U &= q_1 + q_2 + q_3\end{aligned}$$

critério linearizado para a bioequivalência populacional:

$$\hat{\zeta}_U = \hat{\delta}^2 + S_{d_T}^2 - S_{d_R}^2 - \theta_{BE} \max\{\sigma_0^2, S_{d_R}^2\} + \sqrt{U}$$

Se $\hat{\zeta}_U < 0$, então, conclui-se que é bioequivalente.

5.4 Aplicação

Considera-se os seguintes dados para as distribuições de tamanho de partículas por difração laser:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 23: Dados de Entrada

Índice	Tamanho de partícula	Medicamento	1	...	15	...	30
1	0,01	Referência	0	...	0	...	0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
50	5,21	Referência	2,28	...	2,62	...	3,05
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
100	3080	Referência	0	...	0	...	0
1	0,01	Teste	0	...	0	...	0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
50	5,21	Teste	2,32	...	3,18	...	2,95
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
100	3080	Teste	0	...	0	...	0

Para avaliar a equivalência do perfil de tamanho de partícula, Tabela 24 mostra as distâncias EMD calculadas para os medicamentos referência e teste.

Tabela 24: Distância EMD calculados

EMD's					
d_R (Referência)			d_T (Teste)		
2,093109	2,337115	2,818208	14,418553	4,796648	4,580293
3,87895	3,717428	2,607222	5,497742	5,265463	4,254381
1,117434	1,903784	6,830528	5,937078	5,45421	5,7604
6,320301	5,423095	9,149072	3,269956	5,569994	3,91271
2,725224	1,21108	12,392149	5,705298	3,949853	7,621028
4,3159	5,978318	6,143369	5,88497	4,735369	4,001975
5,405943	5,303656	6,842933	7,196766	8,713321	6,442094
2,469715	1,375943	6,543788	7,391297	5,73825	4,755903
2,011985	5,417694	2,733615	4,583299	3,773956	4,961739
3,747156	5,417694	5,904762	4,224528	4,140892	4,550365

Por fim, as estatísticas e o resultado são apresentados na Tabela 25.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 25: Teste da bioequivalência populacional *in vitro*

		Sem logaritmo	Com logaritmo
médias	$\hat{d}_R$	4,47	1,33
	$\hat{d}_T$	5,57	1,67
variâncias	$S_{d_R}^2$	6,45	0,37
	$S_{d_T}^2$	4,37	0,09
$\hat{\delta}$		1,098	0,34
σ_0^2			0,01
θ_{BE}			1,11
c		1	1
$quantil_1$		9,89	0,03
$quantil_2$		7,77	0
$quantil_3$		18,78	0,06
U		36,44	0,09
$\hat{\zeta}$		-1,99	-0,26
São bioequivalentes?		Sim	Sim

Como o valor da estatística do teste, em ambas as escalas, é menor que zero, conclui-se que os medicamentos são bioequivalentes.

6 Teste de Dissolução (USP três estágios)

A USP-NF recomenda um plano de amostragem de três estágios e um critério de aceitação para o teste de dissolução. Para o primeiro estágio (S_1), seis unidades de dosagem são testadas. O requerimento para o primeiro estágio é saber se cada unidade não é menor que $Q + 5\%$. Se o produto falha ao passar de S_1 , seis unidades adicionais são testadas no segundo estágio (S_2). Considera-se que o produto passou de S_2 se a média das 12 unidades de S_1 e S_2 é igual ou maior que Q e se nenhuma unidade é menor que $Q - 15\%$. Se o produto falha ao passar de ambas S_1 e S_2 , 12 unidades adicionais são testadas num terceiro estágio S_3 . Se a média de todas as 24 unidades de S_1 , S_2 e S_3 for igual ou maior que Q , não mais que duas unidades são menores que $Q - 15\%$, e nenhuma unidade é menor que $Q - 25\%$, o produto passa dessa forma no teste de dissolução da USP-NF. Para prover um melhor entendimento, a regra de aceitação do teste de três estágios está resumida no fluxograma da Figura [8].

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

6.1 Liberação Imediata

Tabela 26: Tabela com critérios de aceitação.

Nível	Nº de amostras testadas	Critério de Aceitação
E_1	6	Cada unidade apresenta resultado maior ou igual a $Q + 5\%$.
E_2	6	Média de 12 unidades ($E_1 + E_2$) é igual ou maior que Q e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 15\%$.
E_3	12	Média de 24 unidades ($E_1 + E_2 + E_3$) é igual ou maior do que Q , não mais que duas unidades apresentam resultados inferiores a $Q - 15\%$ e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 25\%$

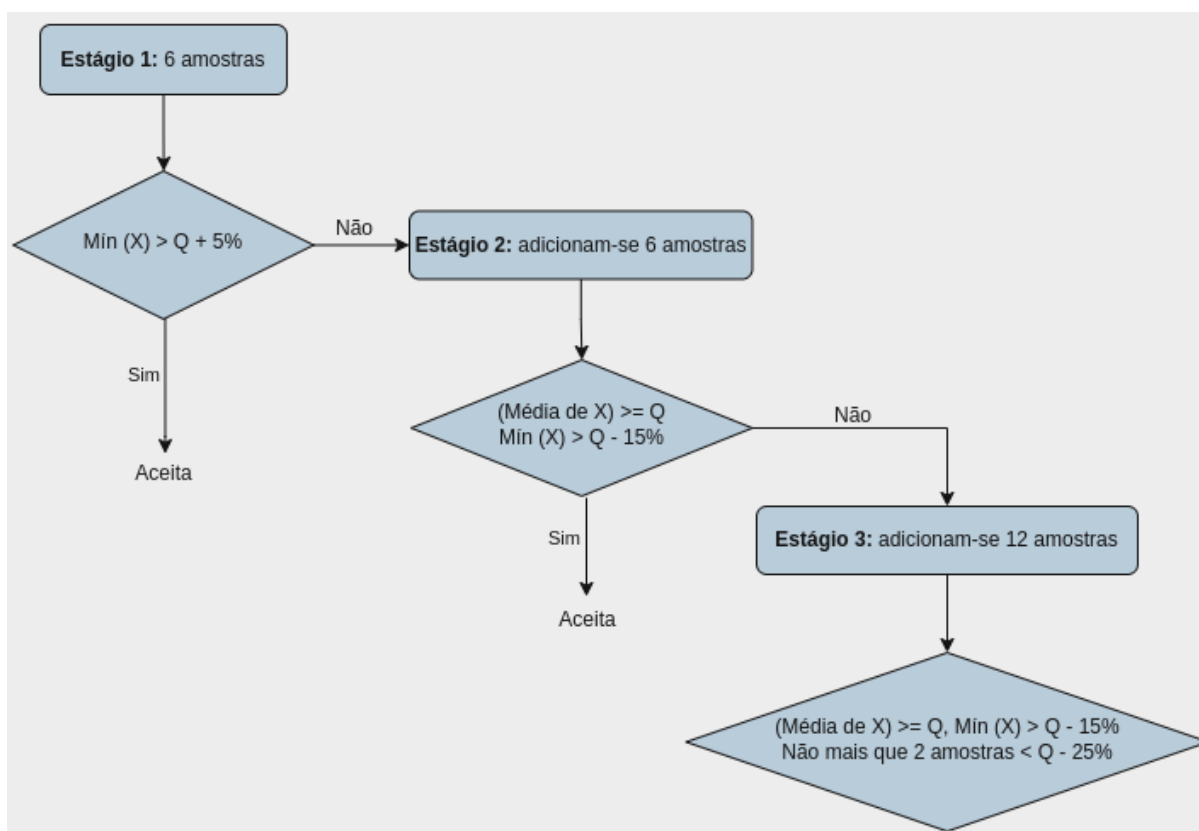


Figura 8: Fluxograma do teste de três estágios da USP para Liberação Imediata.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

6.2 Liberação Prolongada

O produto cumpre o teste se os resultados preencherem as exigências apresentadas na Tabela 27, salvo especificação em contrário na monografia individual. Os termos Q_1 e Q_2 correspondem à quantidade mínima e máxima de fármaco dissolvido em cada intervalo de tempo especificado na monografia, expressos como porcentagem da quantidade declarada. No último tempo a especificação pode ser apresentada apenas com um valor de Q mínimo. Os termos L_1 , L_2 e L_3 referem-se aos três possíveis estágios de avaliação da liberação (L).

Tabela 27: Tabela com critérios de aceitação para Liberação Prolongada.

Nível	Nº de amostras testadas	Critério de Aceitação
L_1	6	Cada resultado individual se insere no intervalo estabelecido (Q_1 e Q_2) para cada determinado tempo e nenhum resultado individual é inferior ao Q do último tempo.
L_2	6	A média de 12 unidades ($E_1 + E_2$) se insere no intervalo estabelecido (Q_1 e Q_2) para cada determinado tempo e não é inferior ao Q do último tempo. Nenhuma unidade individual apresenta resultado que supera os limites de Q_1 e Q_2 em 10% da quantidade declarada, para cada determinado tempo, e nenhum resultado individual fornece valor inferior ao Q do último tempo que supera em 10% a quantidade declarada.
L_3	12	A média de 24 unidades ($E_1 + E_2 + E_3$) se insere no intervalo estabelecido (Q_1 e Q_2) para cada determinado tempo e não é inferior ao Q do último tempo. Não mais que 2 unidades das 24 testadas apresentam resultados que superam os limites de Q_1 e Q_2 em 10% da quantidade declarada, para cada determinado tempo, e não mais que 2 unidades das 24 testadas apresentam resultados com valor inferior ao Q do último tempo que superem em 10% a quantidade declarada. Nenhuma unidade individual apresenta resultado que supera os limites de Q_1 e Q_2 em 20% da quantidade declarada, para cada determinado tempo, e nenhum resultado individual fornece valor inferior ao Q do último tempo que supera em 20% a quantidade declarada.

6.3 Liberação Retardada

6.3.1 Estágio Ácido

Os requerimentos para esta porção do teste são conhecidos se as quantidades baseadas na porcentagem do conteúdo do rótulo de ingrediente ativo dissolvido das unidades testadas conforme o Critério de Aceitação da tabela [28]

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 28: Tabela com critérios de aceitação do Estágio ácido.

Nível	Nº de amostras testadas	Critério de Aceitação
A_1	6	Nenhuma unidade individual apresenta quantidade dissolvida superior a 10% do declarado.
A_2	6	A média de 12 unidades não é superior a 10% do declarado e nenhuma unidade individual apresenta quantidade dissolvida superior a 25% do declarado.
A_3	12	A média de 24 unidades não é superior a 10% do declarado e nenhuma unidade individual apresenta quantidade dissolvida superior a 25% do declarado.

6.3.2 Estágio Tampão

O produto cumpre o teste se os resultados preencherem as exigências apresentadas no Estágio ácido (Métodos A ou B) e, também, as exigências indicadas na Tabela 29 no Estágio tampão pH 6,8 (Métodos A ou B), salvo especificação em contrário na monografia individual. Empregar o valor de Q indicado na monografia do produto e, quando não especificado, empregar 75% como valor de Q no Estágio tampão pH 6,8. Os termos A_1 , A_2 e A_3 referem-se aos três possíveis estágios de avaliação no Estágio ácido (A) e os termos B_1 , B_2 e B_3 referem-se aos três possíveis estágios de avaliação no Estágio tampão pH 6,8 (B).

Tabela 29: Tabela com critérios de aceitação do Estágio Tampão.

Nível	Nº de amostras testadas	Critério de Aceitação
B_1	6	Cada unidade apresenta resultado maior ou igual a $Q + 5\%$.
B_2	6	Média de 12 unidades ($B_1 + B_2$) é igual ou maior que Q e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 15\%$.
B_3	12	Média de 24 unidades ($B_1 + B_2 + B_3$) é igual ou maior do que Q, não mais que duas unidades apresentam resultados inferiores a $Q - 15\%$ e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 25\%$.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

6.4 Aplicação 1: Liberação imediata

A seguir, apresenta-se na Tabela 30 um exemplo para o teste de dissolução para formas farmacêuticas de liberação imediata.

Tabela 30: Dados de entrada

Etapa	Resposta
1	98,54045
1	85,80910
1	85,80921
1	100,49393
1	101,62157
1	102,57270
2	98,54045
2	69,80910
2	85,80921
2	70,49393
2	80,62157
2	102,57270
3	98,54045
3	76,80910
3	85,80921
3	70,49393
3	80,62157
3	102,57270
3	98,54045
3	76,80910
3	85,80921
3	90,49393
3	80,62157
3	102,57270

Na avaliação do estágio 1, verifica-se se cada unidade não é inferior a $Q + 5\%$, considerando $Q = 85\%$. Foram observadas duas unidades que não atendem a essa condição conforme ilustrado na Tabela 31, logo, procede-se para o segundo estágio.

Tabela 31: Avaliação no estágio 1

Etapa	Resultado	Atende à especificação
1	98,5404	Sim
1	85,8091	Não
1	85,8092	Não
1	100,4939	Sim
1	101,6216	Sim
1	102,5727	Sim

No estágio 2, seis unidades foram adicionadas. A Tabela 32 mostra que a média das 12 unidades não é inferior a Q (90,2245); entretanto, uma unidade apresenta um resultado menor que $Q - 15\%$ conforme ilustrado na Tabela 33. Logo, será necessário uma avaliação de terceiro estágio.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 32: Avaliar se a média é maior ou igual a $Q\%$

Média	Atende à especificação
90,2245	Sim

Tabela 33: Avaliar se se nenhuma unidade é menor que $Q - 15\%$

Etapa	Resultado	Atende à especificação
2	69,8091	Não

Avaliam-se no estágio 3 as seguintes condições: se a média de 24 unidades é maior ou igual a Q , se não mais que duas unidades inferiores a $Q - 15\%$ e se nenhuma unidade é inferior a $Q - 25\%$. Os resultados estão apresentados nas Tabela [34-37](#).

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 34: Avaliar se a média é maior ou igual a $Q\%$

Média	Atende à especificação
88,8495	Sim

Tabela 35: Avaliar se não mais que duas unidades são menores que $Q - 15\%$

Número de unidades reprovados	Atende à especificação
1	Sim

Tabela 36: Unidades que são menores que $Q - 15\%$

Etapas	Resultado
2	69,8091

Tabela 37: Avaliar se nenhuma unidade é menor que $Q - 25\%$

Etapas	Resultado	Atende à especificação
1	98,5404	Sim
1	85,8091	Sim
1	85,8092	Sim
1	100,4939	Sim
1	101,6216	Sim
1	102,5727	Sim
2	98,5404	Sim
2	69,8091	Sim
2	85,8092	Sim
2	70,4939	Sim
2	80,6216	Sim
2	102,5727	Sim
3	98,5404	Sim
3	76,8091	Sim
3	85,8092	Sim
3	70,4939	Sim
3	80,6216	Sim
3	102,5727	Sim
3	98,5404	Sim
3	76,8091	Sim
3	85,8092	Sim
3	90,4939	Sim
3	80,6216	Sim
3	102,5727	Sim

Dado que as condições estabelecidas são satisfeitas, conclui-se que o teste está aprovado.

6.5 Aplicação 2: Liberação prolongada

A seguir, apresenta-se na Tabela 38 dados coletados para o teste de dissolução para formas farmacêuticas de liberação prolongada.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 38: Dados de entrada

Etapa	1h	3h	6h
1	25	54	98
1	20	52	86
1	22	42	75
1	27	60	100
1	19	62	101
1	51	66	102
2	22	59	99
2	29	55	97
2	10	20	68
2	21	76	99
2	29	63	100
2	30	56	92
3	17	60	92
3	13	59	109
3	52	74	94
3	24	58	101
3	54	59	88
3	12	45	98
3	14	48	89
3	10	60	82
3	11	24	93
3	15	65	97
3	14	57	94
3	11	22	102
Média	23	54	94

As especificações para cada tempo são:

Tempo	Especificação
1h	$\leq 30\%$
3h	45% - 75%
6h	$\geq 80\%$

No estágio 1, verifica-se se cada resultado individual atende à especificação estabelecida. Foram identificadas observações que não atendem às condições, conforme ilustrado na Tabela 39. Em seguida, procede-se com a avaliação do estágio 2.

Tabela 39: Avaliação no estágio 1

Etapa	Tempo	Resultado	Limites	Atende à especificação
1	1 h	51	$\leq 30\%$	Não
1	3 h	42	45% – 75%	Não
1	6 h	75	$\geq 80\%$	Não

O primeiro teste no estágio 2 avalia se a média das 12 unidades (6 em cada estágio) atende à especificação estabelecida. Percebe-se que os resultados estão em conformidade com esta condição. No entanto, ao avaliar se nenhuma

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

unidade individual apresenta um resultado que ultrapassa as especificações em 10% da quantidade declarada, foram identificadas observações que não atendem a essas condições. Consulte as Tabelas 40 e 41.

Tabela 40: Avaliar se as médias se encontram dentro do intervalo

Tempo	Média	Limites	Atende à especificação
1h	25,4167	$\leq 30\%$	Sim
3h	55,4167	45% – 75%	Sim
6h	93,0833	$\geq 80\%$	Sim

Tabela 41: Avaliar se alguma unidade está mais que 10% fora do intervalo

Etapa	Tempo	Resultado	Limites	Atende à especificação
1	1 h	51	$\leq 40\%$	Não
2	3 h	20	35% – 85%	Não
2	6 h	68	$\geq 70\%$	Não

No estágio 3, avalia inicialmente se a média das 24 unidades (6 em cada estágio) atende à especificação estabelecida. Percebe-se que os resultados estão em conformidade com esta condição. Em seguida, verifica-se há mais que 2 unidades apresentam resultados que superam os limites em 10% da quantidade declarada para o tempo de 1h e 3h. Por fim, foram detectadas observações que apresentam resultado que supera as especificações em 20% da quantidade declarada. Consulte as Tabelas 42- 45.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 42: Avaliar se as médias se encontram dentro do intervalo

Tempo	Média	Limites	Atende à especificação
1 h	23	$\leq 30\%$	Sim
3h	54	$45\% - 75\%$	Sim
6h	94	$\geq 80\%$	Sim

Tabela 43: Avaliar se alguma unidade está mais que 10% fora do intervalo

Etapa	Tempo	Resultado	Limites	Atende à especificação
1	1 h	51	$\leq 40\%$	Não
3	1 h	52	$\leq 40\%$	Não
3	1 h	54	$\leq 40\%$	Não
2	3 h	20	$35\% - 85\%$	Não
3	3 h	24	$35\% - 85\%$	Não
3	3 h	22	$35\% - 85\%$	Não
2	6 h	68	$\geq 70\%$	Não

Tabela 44: Avaliar se existem mais que duas unidades que estão mais que 10% fora do intervalo

Tempo	Número de unidades reprovados	Atende à especificação
1 h	3	Não
3 h	3	Não
6 h	1	Sim

Tabela 45: Avaliar se alguma unidade está mais que 20%

Etapa	Tempo	Resultado	Limites	Atende à especificação
1	1 h	51	$\leq 50\%$	Não
3	1 h	52	$\leq 50\%$	Não
3	1 h	54	$\leq 50\%$	Não
2	3 h	20	$25\% - 95\%$	Não
3	3 h	24	$25\% - 95\%$	Não
3	3 h	22	$25\% - 95\%$	Não

Como as condições estabelecidas não foram satisfeitas, conclui-se que o teste foi reprovado.

6.6 Aplicação 3: Liberação retardada

A seguir, apresenta-se na Tabela 46 um exemplo para o estágio ácido do teste de dissolução para formas farmacêuticas de liberação retardada.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 46: Dados de entrada

Etapa	Resposta
1	11
1	7
1	8
1	9
1	3
1	4
2	15
2	7
2	4
2	9
2	8
2	9
3	8
3	7
3	5
3	5
3	6
3	7
3	3
3	4
3	8
3	9
3	12
3	24

Na avaliação do estágio 1, verifica-se se nenhuma unidade é superior a 10%. Foi observada uma unidade que não atende a essa condição conforme ilustrado na Tabela 47, logo, procede-se para o segundo estágio.

Tabela 47: Avaliar se nenhuma unidade é superior a 10%

Etapa	Resultado	Atende à especificação
1	11	Não
1	7	Sim
1	8	Sim
1	9	Sim
1	3	Sim
1	4	Sim

No estágio 2, seis unidades foram adicionadas. A Tabela 48 mostra que a média das 12 unidades é inferior a 10% (7,8333). A Tabela 49 mostra que todos os resultados apresentam resultado inferior a 25%.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 48: Avaliar se a média não é superior a 10%

Média	Atende à especificação
7,8333	Sim

Tabela 49: Avaliar se nenhuma unidade é superior a 25%

Etapa	Resultado	Atende à especificação
1	11	Sim
1	7	Sim
1	8	Sim
1	9	Sim
1	3	Sim
1	4	Sim
2	15	Sim
2	7	Sim
2	4	Sim
2	9	Sim
2	8	Sim
2	9	Sim

Dado que as condições estabelecidas estão satisfeitas, conclui-se que o teste está aprovado.

7 Alta e Baixa Solubilidade

Segundo a resolução RDC Nº 31 da Anvisa [1], é considerada altamente solúvel a substância ativa cuja quantidade correspondente a sua maior dose posológica disponível no mercado nacional é solúvel em 250mL ou menos de meio aquoso em uma escala de pH de 1, 2 – 6, 8 em uma temperatura de $37 \pm 1^\circ C$.

Para testar se uma substância ativa é de alta solubilidade, aplica-se:

$$\frac{\text{maior dose administrada}}{\text{média das doses}} > 250.$$

Se ao menos um dos volumes necessários para dissolver a dose máxima for superior a 250mL, a substância ativa não será considerada de alta solubilidade.

Nos casos onde a solução não puder ser considerada de altamente solúvel, uma das exigências na determinação do perfil de dissolução *in vitro* de um fármaco é a manutenção das condições *sink*. Segundo Brown et al. [18], o termo 'condições *sink*' pode ser definido como sendo o volume do meio três vezes superior ao necessário para criar uma solução saturada do fármaco. Ditas condições são tidas com o intuito de evitar a saturação do fármaco no meio envolvente, melhorando a velocidade de dissolução das partículas de fármaco.

Calculam-se as condições *sink* da seguinte forma:

$$\text{Volume Mínimo} = \frac{3 \times (\text{Dose nominal})}{\text{Maior Concentração de Saturação}}$$

7.1 Aplicação

Considera-se os seguintes dados para um determinado ativo, com resultados individuais das doses coletadas a cada 48 horas. A maior dose administrada é de 600mg:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Meio de Dissolução	48 (mg/mL)
Tampão Fosfato pH 3,0	2,3525
	2,3216
	2,3377
Tampão Aetato pH 4,8	1,7060
	1,6792
	1,7214
Tampão Fosfato pH 6,8	0,9249
	0,9184
	0,9289

Tabela 50: Dados de Solubilidade.

Primeiramente, calcula-se a média dos resultados das doses administradas para cada meio de produção:

- Média (Fosfato pH 3,0) = $\frac{2,3525+2,3216+2,3377}{3} = 2,3373$
- Média(Aetato pH 4,8) = $\frac{1,7060+1,6792+1,7214}{3} = 1,7022$
- Média(Fosfato pH 6,8) = $\frac{0,9249+0,9184+0,9289}{3} = 0,9240$

Agora, divide-se o valor da maior dose administrada (600mL) pela média das doses administradas:

$$D/S(mL) = \frac{\text{maior dose administrada}}{\text{média das doses}} > 250$$

- D/S (mL) → Tampão Fosfato pH 3,0 = $\frac{600}{2,3373} = 257 > 250 \text{ mL}$
- D/S (mL) → Tampão Aetato pH 4,5 = $\frac{600}{1,7022} = 352 > 250 \text{ mL}$
- D/S (mL) → Tampão Fosfato pH 6,8 = $\frac{600}{0,9240} = 649 > 250 \text{ mL}$

Como ao menos um dos valores acima é maior que 250mL, então nossa solução não pode ser considerada de altamente solúvel. Calculamos então a condição *sink*.

$$Volume \text{ Mínimo} = \frac{3 \times (Dose \text{ nominal})}{Maior \text{ Concentração de Saturação}}$$

- Volume Mínimo (Tampão Fosfato pH 3,0) = $\frac{3 \times 600}{2,3373} = 770,1194$
- Volume Mínimo (Tampão Aetato pH 4,5) = $\frac{3 \times 600}{1,7022} = 1057,4550$
- Volume Mínimo (Tampão Fosfato pH 6,8) = $\frac{3 \times 600}{0,9240} = 1948,0519$

8 Estabilidade da Amostra

Para a análise da Estabilidade da Amostra procede-se conforme os passos abaixo.

1. Converter os tempos em período (horas);

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

2. Calcular a recuperação a partir da Área registrada em cada tempo;
3. Comparar a recuperação com os limites de especificação;
4. Determinar o tempo de estabilidade, que é o intervalo até a primeira ultrapassagem da especificação.

A fórmula para o cálculo de recuperação:

$$\frac{a_i}{a_0} \times 100, i = 1, \dots, n$$

onde a_i representa a área obtida no i -ésimo período e a_0 a área obtida no tempo inicial.

8.1 Aplicação

Considera-se os seguintes dados:

Tabela 51: Dados de entrada			
Tempo	Área	LIE	LSE
19/02/21 22:53	11696856	95	105
20/02/21 06:59	11707766	95	105
20/02/21 19:09	11701877	95	105
21/02/21 09:22	11704803	95	105
21/02/21 23:35	11680913	95	105
23/02/21 02:35	11624883	95	105

Tabela 52: Dados de estabilidade na amostra					
Tempo	Área	Recuperação	LIE	LSE	Período (horas)
19/02/21 22:53	11696856	100,0000	95	105	0,00
20/02/21 06:59	11707766	100,0933	95	105	8,10
20/02/21 19:09	11701877	100,0429	95	105	20,27
21/02/21 09:22	11704803	100,0679	95	105	34,48
21/02/21 23:35	11680913	99,8637	95	105	48,70
23/02/21 02:35	11624883	99,3847	95	105	75,70

No tempo inicial, a recuperação é 100%. Têm-se nos tempos sucessivos as recuperações:

- 8,10 horas: $\frac{11707766}{11696856} \times 100 = 100,0933$
- 20,27 horas: $\frac{11701877}{11696856} \times 100 = 100,0429$
- 34,48 horas: $\frac{11704803}{11696856} \times 100 = 100,0679$
- 48,70 horas: $\frac{11680913}{11696856} \times 100 = 99,8637$

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

- 75,70 horas: $\frac{11624883}{11696856} \times 100 = 99,3847$

Como todos as recuperações estão contidas nos limites de especificação, conclui-se que a amostra mantém-se estável até 75 horas, conforme ilustrado na Figura 9.

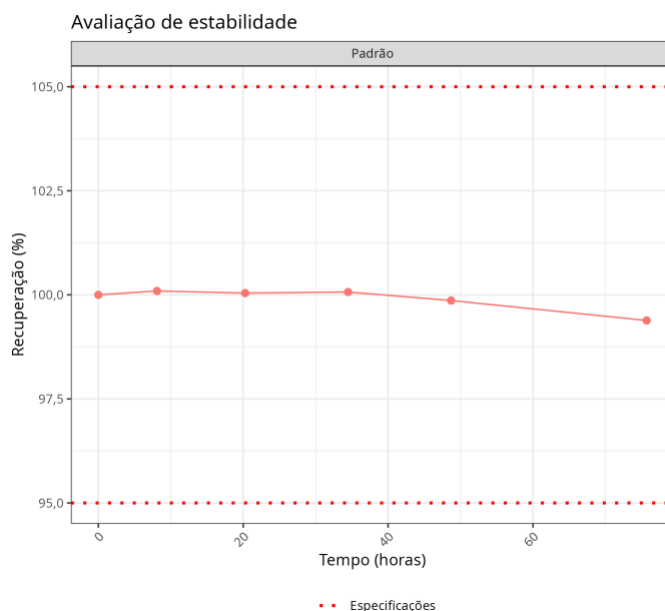


Figura 9: Resultado

9 Filtro

O objetivo da avaliação de filtro é comparar os resultados de um material de referência (sem filtro) com os resultados de outros materiais filtrantes, a fim de determinar se houve uma perda significativa de ativo na solução.

Para a análise do filtro, seguem-se os passos abaixo.

1. Calcular a recuperação de cada material filtrante em relação à referência.
2. Comparar a recuperação com os limites de especificação.

A fórmula para o cálculo de recuperação:

$$\frac{a_F}{a_R} \times 100$$

onde a_F representa a área obtida no material filtrante f e a_R a área obtida no material de referência.

9.1 Aplicação

Considera-se os seguintes dados:

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Tabela 53: Dados de entrada

Solução	Condição	Área	LIE	LSE
Padrão	Sem Filtrar	5374583	95	105
Padrão	PVDF 0,45 cm	5371319	95	105
Amostra	Centrifugada	1754786	95	105
Amostra	Filtro PVDF 0,45 cm	1745036	95	105

Tabela 54: Dados para avaliação de filtro

Solução	Condição	Área	Recuperação	LIE	LSE
Padrão	Sem Filtrar	5374583	100,0000	95	105
Padrão	PVDF 0,45 cm	5371319	99,9393	95	105
Amostra	Centrifugada	1754786	100,0000	95	105
Amostra	Filtro PVDF 0,45 cm	1745036	99,4444	95	105

A recuperação obtida em cada material filtrante é calculada a partir da condição referenciada:

- Padrão - PVDF 0,45 cm: $\frac{5371319}{5374583} \times 100 = 99,9393$
- Amostra - Filtro PVDF 0,45 cm: $\frac{1745036}{1754786} \times 100 = 99,4444$

Como todas as medidas estão inseridas dentro dos limites de especificação, conclui-se que os tipos de filtro testados atendem ao critério de aceitação, conforme ilustrado na Figura 10.

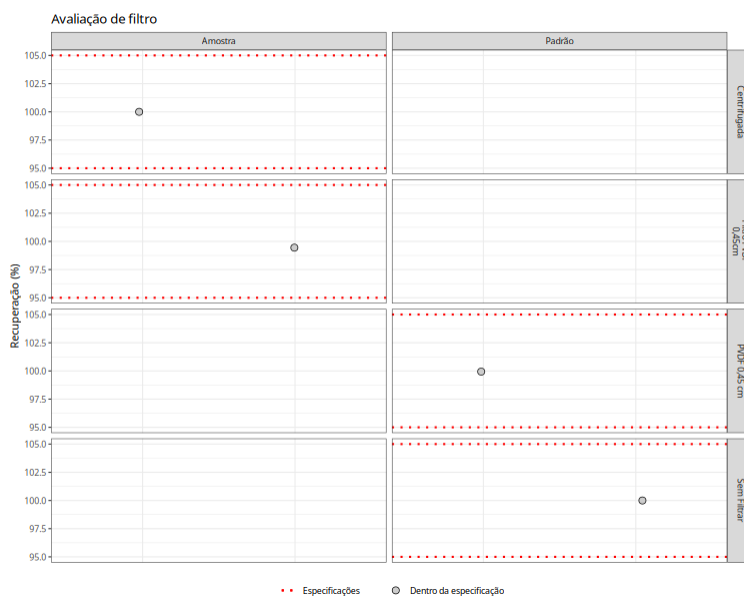


Figura 10: Resultado

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

Referências

- [1] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N 31, de 11 de Agosto de 2010.
- [2] Guidance for industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, CDER, Food and Drug Administration and others, USA, 1997.
- [3] Gómez Mantilla, José David. "Statistical approaches to perform dissolution profile comparisons."(2013).
- [4] Moore, J.W., Flanner, H.H., 1996. Mathematical comparison of dissolution profiles. Pharm. Tech. 20.
- [5] Tsong, Yi, Sathe, Pradeep M. and Shah, Vinod P., 2003, In Vitro Dissolution Profile Comparison ,Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics,1:1, 456 – 462.
- [6] Sathe, P. M., Tsong, Y., & Shah, V. P. (1996). In-vitro dissolution profile comparison: statistics and analysis, model dependent approach. Pharmaceutical research, 13(12), 1799-1803.
- [7] John Neter, William Wasserman and Michael H. Kutner (1985) - Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, and experimental designs, 2nd ed., Homewood, Ill. : R.D. Irwin.
- [8] Royston, J. P. Some techniques for assessing multivariate normality based on the Shapiro-Wilk W. Applied Statistics, p. 121-133, 1983.
- [9] Conover, William Jay, and William Jay Conover. "Practical nonparametric statistics."(1980).
- [10] S. S. Shapiro & R. S. Francia (1972) An Approximate Analysis of Variance Test for Normality, Journal of the American Statistical Association, 67:337, 215-216
- [11] G. J. S. Ross. MLP, Maximum Likelihood Program. Harpenden: Rothamsted Experimental Station, 1980. [p153]
- [12] J.P. Royston, "An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples," Applied Statistics, vol. 31, no. 2, pp. 115-124, 1982.
- [13] DJ Schuirmann. A comparison of the two one-sided tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability (1987).
- [14] Chen, James J., Yi Tsong, and Seung-Ho Kang. "Tests for equivalence or noninferiority between two proportions."Drug Information Journal 34.2 (2000): 569-578.
- [15] Wellek, Stefan. Testing statistical hypotheses of equivalence and noninferiority. Chapman and Hall/CRC, 2010.
- [16] da Farmacopeia, Comissão Permanente de Revisão. Brasileira. Farmacopeia Brasileira 5 ed. Primeiro Suplemento (2016).
- [17] Shein-Chung Chow and Jen-Pei Liu. Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies. CRC press, 2000.
- [18] Brown, C. K., Chokshi, H. P., Nickerson B. (2004). Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. Pharmaceutical Technology, pp. 5665.
- [19] Mardia k. v. (1970). "Measures of multivariate skewness and kurtosis with applications". Biometrika, Volume 57, Issue 3, December 1970, 519-530.

GRUPO ESTATCAMP	Perfil de Dissolução Comparativo e Estudo de Bioequivalência Populacional		
	EC.PRO.007-01	Action Stat Dissolução Versão 4.2	Data de Emissão: 1 de dezembro de 2023
		PROTOCOLO ESTATÍSTICO	

- [20] Chow, S.-C., Shao, J. and Wang, H. (2003), In vitro bioequivalence testing. Statist. Med., 22: 55-68.
- [21] Chow SC, Liu JP. Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies. 2nd edn. Marcel Dekker: New York, 1999.
- [22] Anexo II Anvisa. Avaliação Estatística de Bioequivalência Populacional. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013).
- [23] Hu, M., Jiang, X., Absar, M. et al. Equivalence Testing of Complex Particle Size Distribution Profiles Based on Earth Mover's Distance. AAPS J 20, 62 (2018).
- [24] Box, G.E.P.. "A General Distribution Theory for a Class of Likelihood Criteria". Biometrika. 36 (3-4): 317-346 (1949).