


PAULO APARECIDO VARGAS SALOMÃO

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE DUAS FORMULAÇÕES DE  
AZITROMICINA UTILIZANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTÔMETRO DE MASSA (LC-MS-MS)**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado,  
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -  
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do  
Farmacêutico - Paulo Aparecido Vargas Salomão.*

*Campinas, 10 de janeiro de 2005.*

  
*Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno*  
*- Orientador -*

CAMPINAS – SP  
2005

PAULO APARECIDO VARGAS SALOMÃO

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA ENTRE DUAS FORMULAÇÕES DE AZITROMICINA UTILIZANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTÔMETRO DE MASSA (LC-MS-MS)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em farmacologia.

Orientador: **Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno**

CAMPINAS – SP  
2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP  
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa36e

Salomão, Paulo Aparecido Vargas

Estudo de bioequivalência entre duas formulações de azitromicina utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS-MS) / Paulo Aparecido Vargas Salomão. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Ronilson Agnaldo Moreno  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Espectrometria de massa . 2. Farmacocinética. 3. Azitromicina. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Moreno, Ronilson Agnaldo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
Sa 36e  
V          EX           
TOMBO BCI 64800  
PROC 16.1.00026-05  
C          X           
PREÇO 11,00  
DATA 20/07/05  
Nº CPD         

Bibid 358341



UNICAMP

---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

---

### Orientador:

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

---

---

### Membros:

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Prof. Dr. Francisco Hideo Aoki

Prof. Dr. José Luis Donato

---

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 10/01/2005

---

200514903

## *SUMÁRIO*

Lista de Figuras .....	vi
Lista de Quadros.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii
Resumo .....	09
Abstract.....	10
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
Medicamento Genérico .....	13
Testes de Bioequivalência .....	16
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>CASUÍSTICA</b> .....	28
<b>MÉTODOLOGIA</b> .....	29
Aspectos éticos .....	29
Aprovação do Estudo.....	29
Termo de Consentimento Livre Esclarecido .....	29
Confidencialidade .....	30
Protocolo clínico .....	31
Projeto de Estudo .....	31
Programação do Estudo.....	33
Seleção de Voluntários.....	34
Critério de Inclusão .....	34
Critério de Exclusão.....	35
Registro dos Voluntários.....	36
Dosagem.....	36
Restrições aos Voluntários .....	36
Critério de Retirada.....	37
Efeitos Adversos.....	37
Produtos Estudados.....	38

Materiais e reagentes.....	40
Equipamentos .....	40
Padrões.....	41
Reagentes.....	41
Coleta das Amostras Sangüíneas.....	42
Quantificação do Fármaco nas Amostras de Plasma.....	43
Extração do Fármaco .....	43
Condições do Cromatógrafo.....	44
Farmacocinética e Análise Estatística.....	51
Validação da metodologia analítica.....	52
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
<b>DISCUSSÕES</b> .....	<b>83</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>86</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>87</b>

## ***LISTA DE FIGURAS***

Figura 2: Espectrômetro de massa: Micromass Quatro II .....	44
Figura 3: Espectrômetro de massa: Z SPREY .....	45
Figura 4: Curvas dos brancos de diferentes plasma humanos submetidos às condições analíticas .....	46
Figura 5: Tempo de retenção da azitromicina nas condições analíticas .....	48
Figura 1: Esquema de quebra da azitromicina e roxitromicina.....	49

## ***LISTA DE QUADROS***

Quadro 1: Randomização da formulação administrada .....	31
Quadro 2: Quadro comparativo entre produto teste e a referência .....	38



## ***ABREVIATURAS***

<b>EMEA</b>	The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2000).
<b>O.M.S.</b>	Organização Mundial da Saúde;
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration Agency.
<b>C<sub>max</sub></b>	Concentração plasmática máxima;
<b>T<sub>max</sub></b>	Tempo para obtenção de <b>C<sub>max</sub></b> ;
<b>A.S.C.</b>	Área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo;
<b>V<sub>d</sub></b>	Volume de distribuição;
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Meia vida de eliminação;
<b>C.L.A.E.</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência;
<b>A.S.C.<sub>0-t</sub></b>	Área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo, desde a administração do fármaco até a última coleta sanguínea;
<b>C<sub>t</sub></b>	Última concentração plasmática do fármaco determinada experimentalmente;
<b>k<sub>e</sub></b>	Constante de eliminação da fase terminal, estimada pela regressão linear dos pontos que descrevem a fase de eliminação da curva de concentração plasmática pelo tempo, em um gráfico mono logarítmico;
<b>A.S.C.O-inf.</b>	Área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo, tendendo ao infinito;
<b>A.N.O.V.A.</b>	Análise de variância;
<b>I.C.</b>	Intervalo de confiança;

## ***RESUMO***

O objetivo desse estudo foi avaliar, em voluntários humanos sadios, a farmacocinética de uma formulação de Azitromicina comprimidos (Azitromicina 500 mg comprimidos da EMS Indústria Farmacêutica, Brasil, como formulação de teste ) em comparação com a formulação referência, Azitromicina 500 mg (Zitromax® 500 mg comprimidos dos Laboratórios Pfizer, Brasil). O estudo foi aberto, cruzado, randomizado com dois períodos abertos com intervalo de 3 semanas entre eles, onde vinte e cinco voluntários sadios de ambos os sexos receberam uma dose única de cada medicamento. Foram coletadas amostras de plasma em tempos regulares para a quantificação do fármaco. As amostras de plasma da Azitromicina foram obtidas por um período de 336 hs. As concentrações plasmáticas totais foram quantificadas, pelo método validado usando, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS-MS). O limite de quantificação foi de 5,0 ng/ml para a análise da azitromicina, a média geométrica e o CI de 90% teste/referência foi de 105,3 (92,4 – 120,0%) para AUC<sub>last</sub>, 106,4 (94,0 – 120,3%) para AUC<sub>0-inf</sub> e 92,7 (81,8 – 105,1%) para C<sub>max</sub>. Através da análise estatística e dos parâmetros propostos pelo FDA (80-125%) concluiu-se que a formulação da Azitromicina 500 mg comprimidos produzido pela EMS Indústria Farmacêutica é bioequivalente em relação à Azitromicina 500 mg comprimidos (Zitromax® 500 mg comprimidos), medicamento referência, produzido pela Pfizer Laboratórios, Brasil.

## ***ABSTRACT***

*Objective:* To assess the bioequivalence of two azithromycin tablet formulations (Azitromicina 500 mg tablet from EMS Indústria Farmacêutica, Brazil as test formulation and Zitromax<sup>®</sup> 500 mg tablet from Laboratórios Pfizer, Brazil as reference formulation) in 25 healthy volunteers of both sexes.

The study was conducted using an open, randomized two-period crossover design with a 3-week washout interval. Plasma samples were obtained over a 336 h period. Plasma azithromycin concentrations were analyzed by combined liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with positive ion electrospray ionization using Multiple Reaction Monitoring (MRM). From the azithromycin plasma concentration vs. time curves the following pharmacokinetic parameters were obtained:  $AUC_{last}$ ,  $AUC_{0-inf}$  and  $C_{max}$ . The statistical interval proposed was 80-125% according to the US Food and Drug Administration Agency.

The limit of quantification was 5.0 ng/mL for plasma azithromycin analysis. The geometric mean and the 90% CI test/reference ratios were 105.3 (92.4 - 120.0%) for  $AUC_{last}$ , 106.4 (94.0 - 120.3%) for  $AUC_{0-inf}$  and 92.7 (81.8 - 105.1%) for  $C_{max}$ .

Since the 90% CI for  $AUC_{last}$ ,  $AUC_{0-inf}$  and  $C_{max}$  ratios were within in the 80-125% interval proposed by the US FDA, it was concluded that Azitromicina 500 mg tablet (test formulation) was bioequivalent to Zitromax<sup>®</sup> 500 mg tablet, in terms of both rate and extent of absorption.

## INTRODUÇÃO

A azitromicina [2R-(2R\*,3S\*,4R\*,5R\*,8R\*,10R\*,11R\*,12S\*,13S\*,14R\*)]-13-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- $\alpha$ -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)- $\beta$ -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one é um antibiótico derivado dos macrolídeos pela inserção de um átomo de nitrogênio no anel lactônico.

A azitromicina tem demonstrado ser ativa “*in vitro*” contra uma grande variedade de patógenos incluindo-se “*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter sp* e *Haemophilus ducreyi*”. O mecanismo de ação da azitromicina é idêntico ao da eritromicina, já que inibe a síntese proteica através da ligação da subunidade ribossomal 50 S dos microorganismos suscetíveis. A síntese do ácido nucléico não é afetada.

Após a administração oral em humanos, a azitromicina é amplamente distribuída pelo organismo. A absorção é diminuída na presença de alimentos.

A biodisponibilidade é de aproximadamente 37%. A azitromicina concentra-se nos fagócitos e fibroblastos. A taxa de ligação protéica é variável de acordo com a concentração (entre 0,02 e 0,05 mcg/ml). A biotransformação é hepática. A concentração

plasmática máxima é atingida entre 2,5 e 3,2 horas em pacientes jovens e entre 3,8 a 4,4 horas em pacientes idosos.

A excreção é 50% biliar e 4% renal na forma inalterada. A meia vida plasmática está entre 11 a 68 horas (8 a 24 horas após dose única); a meia vida tecidual está entre 2 a 4 dias (NAHATA MC, KORANYI KI, LUKE DR, FOULDS G., 1995).

A azitromicina está indicada nas infecções por microorganismos sensíveis nos seguintes quadros:

- Infecções do trato respiratório superior incluindo otite média, sinusite, faringite/tonsilite.
- Infecções do trato respiratório inferior, incluindo bronquite e pneumonia.
- Nas doenças sexualmente transmissíveis no homem e na mulher, a azitromicina é indicada no tratamento de infecções genitais não complicadas devido à *Chlamydia trachomatis* e infecções não complicadas devido à *Neisseria gonorrhoeae* sem resistência múltipla.
- Tratamento de erradicação do *Helicobacter pylori* em esquemas de terapia múltipla.
- Infecções concomitantes com *Treponema pallidum* devem ser excluídas.

## Medicamento Genérico

Os produtos farmacêuticos são classificados em medicamentos patenteados ou éticos. Existe uma outra classe de medicamento que não necessita de prescrição médica. Os éticos são, na sua maioria, vendidos com receita médica, o que não é necessário para outra classe. O primeiro grupo é formado por produtos patenteados e genéricos (TUCKER, 1984; KIRIM, 1985; SAPIENZA, 1989).

Os produtos patenteados são a força motriz, do ponto de vista econômico, para que as empresas farmacêuticas de ponta assumam riscos no desenvolvimento de novos fármacos. A patente impede a imitação e possibilita o monopólio total ou parcial sobre esses produtos por um determinado período de tempo, bem como o recebimento de "royalties" (KIRIM, 1985; SAPIENZA, 1989; BRAGA, 1990).

Os produtos genéricos representam a menor parcela do mercado, em relação aos patenteados (30% nos Estados Unidos da América), e constituem a última etapa na vida de um fármaco, após a criação e realização dos estudos pré-clínicos para a aprovação da nova molécula, seguida pela utilização desta como produto patentado. Após a patente ou exclusividade expirar, outros produtores poderão fabricar um equivalente farmacêutico ao original patentado (ORMSBY, 1994).

Devido ao importante papel da indústria farmacêutica no âmbito da saúde pública, a atuação desta não é regida simples e independentemente pelas regras do mercado, mas sim permeada pela intervenção do Estado. Esta intervenção ocorre no

desenvolvimento, produção e comercialização de fármacos, regulamentando o acesso da população a estes (TUCKER, 1984; KIRIM, 1985; SAPIENZA, 1989).

Em muitos países a existência de medicamentos genéricos é possível após vários estágios a serem seguidos pelos produtores, frente às exigências dos órgãos locais para a aprovação da produção e comercialização. São avaliadas, segundo as boas normas de produção, a obtenção de formulações de qualidade e a reprodutibilidade do processo. A etapa *sine qua non* é a da determinação da bioequivalência entre uma substância referência e uma teste, ou seja, aquela candidata a equivalente de um padrão já aprovado (produto patenteado). A determinação feita *in vitro* ou *in vivo* inclui a mensuração do princípio ativo das diferentes formulações em fluídos biológicos, efeito farmacológico, testes de dissolução *in vitro*, estudos em animais e outros métodos (ORSMBY, 1994; CHUNG, 1996; HU, 1996; IGA, 1996; LU, 1996; POUND, 1996; PRAKONGPAN, 1996; BLUME, 1996; SALMONSON, 1996; WALTERS, 1996; WILLIAMS.a, 1996; WILLIAMS.b, 1996).

O termo genérico é derivado da palavra latina *genus*, que significa classe geral. A razão do grande sucesso dos medicamentos genéricos, em vista da sua participação no mercado mundial, é a econômica, pela ausência dos mesmos encargos da produção de medicamentos patenteados, além de envolver um processo mais curto e menos trabalhoso na sua aprovação. Estes fatores traduzem-se na comprovação da produção de um fármaco de qualidade, com características equivalentes ao produto original, determinadas por processos analíticos de alta precisão e exatidão, nos quais os fármacos e seus metabólitos

são identificados e quantificados em diferentes fluídos orgânicos. Deve-se salientar, porém, que duas formulações equivalentes podem não ser idênticas, o importante é que o comportamento destas não difira significativamente (ORMSBY, 1994).

A determinação de diferentes substâncias em fluídos biológicos é realizada através de testes de biodisponibilidade, que começaram a se estabelecer como ferramenta *per se*, no início da década de 70. A biodisponibilidade é a presença da substância ativa no sítio de ação ou fluído considerado, em decorrência da taxa e extensão da disposição de uma forma farmacêutica com a qual o organismo entra em contato; não é necessariamente um conceito paralelo ao efeito farmacológico decorrente da presença do princípio ativo.

A comparação da biodisponibilidade de diferentes formulações resultou no termo bioequivalência. Este é definido como taxa e extensão de absorção de princípios ativos similares na mesma dose molar quando estudados sob as mesmas condições experimentais, em tal nível que eficácia e segurança sejam essencialmente as mesmas. Alguns produtos tidos como bioequivalentes não necessariamente apresentam a mesma taxa de absorção, quando esta não tem significado clínico importante.



## Testes de Bioequivalência

Os testes de bioequivalência podem ser aplicados na avaliação de qualquer parâmetro farmacocinético ou farmacodinâmico. O parâmetro avaliado é considerado bioequivalente caso os valores da preparação teste estejam dentro do intervalo de equivalência estabelecido em relação à preparação de referência.

As razões pelas quais se conduz um teste de bioequivalência são: caracterizar uma nova formulação escolhida para substituir ou competir com uma mais antiga; avaliar uma nova forma farmacêutica que substitui uma mais antiga ou quando se aumenta a linha de produtos; verificar as novas características físicas de um produto; comparar dois lotes de um mesmo fármaco, dois métodos de produção, dois locais diferentes de produção ou quando um novo fabricante deseja constatar se o novo produto é semelhante a um padrão (pode ser um produtor de genéricos ou um novo fornecedor de um produto patentado).

Há três diferentes tipos de estudo que abordam aspectos característicos da bioequivalência, uns menos e outros mais abrangentes. São os testes de equivalência terapêutica, farmacocinética e farmacodinâmica. O mais amplo de todos é o de equivalência terapêutica, que além de avaliar o resultado final do fármaco sobre o organismo, também verifica os efeitos adversos. Este não é o primeiro teste a ser utilizado, pois há o problema ético de se administrar um medicamento cuja eficácia é questionada em relação ao padrão e a dificuldade de detectar equivalência frente aos efeitos adversos pouco comuns que podem surgir devido às enormes variáveis que este estudo envolve. Deve ser normalmente

precedido pelo de equivalência farmacocinética, que, caso seja positivo, indicará fortemente a equivalência terapêutica. Características farmacodinâmicas podem ser usadas como parâmetros para avaliar a equivalência, ao invés das farmacocinéticas, como quando da avaliação de duas formulações de hipoglicemiantes verificando os níveis glicêmicos após a utilização dos fármacos. As limitações deste processo baseiam-se na força do parâmetro farmacodinâmico em traduzir a resposta terapêutica e a manipulação desses parâmetros na constatação da equivalência (FDA, 1993; HOLFORD, 1994; FDA, 1998).

A legislação brasileira (BRASIL, 1999) exige, para aceitar a equivalência de fármacos, a existência de bioequivalência farmacocinética. Esta é obtida através do estudo de características específicas.

A especificação e a condução adequadas de um estudo de bioequivalência dá-se pela ação cooperada de farmacologistas, estatísticos, médicos, bioquímicos e outros. Esta caracterização está na dependência do medicamento em estudo, forma farmacêutica e objetivos. No estudo para genéricos, ambas formulações contêm o mesmo princípio ativo, dose e forma, sendo administradas pela mesma via.

Ainda na definição das características do estudo é que se estipula se o número e a frequência da dosagem será um estudo de dose única ou múltipla. A primeira opção é regra, sendo indicada para medicamentos com baixa solubilidade, que exibem transporte saturável, efeito de primeira passagem saturável e ausência de interação entre os metabólitos e o fármaco. Geralmente, este é o modo adequado em predizer o estado de

equilíbrio advindo de múltiplas doses para fármacos que exibem distribuição e eliminação saturáveis. Estudos de múltipla dose estão indicados quando:

- há diferença na taxa, mas não na extensão de absorção dos fármacos em questão;
- há excessiva variabilidade na biodisponibilidade dos componentes de cada grupo;
- a concentração analisada do fármaco ou metabólito presente, após dose única, é muito baixa para ser detectada
- a forma farmacêutica é de liberação lenta.

Antes do início do estudo, o conselho de ética da instituição na qual este se realizará – formado por profissionais de diferentes áreas com experiência em estudos clínicos, aspectos éticos e atitudes características da comunidade dos voluntários participantes – deve avaliar e aprovar ou não o estudo, salvaguardando os direitos e bem estar dos participantes (FDA, 1998; FDA, 1993; JACKSON, 1994; ORMSBY, 1994; BRASIL, 1999).

A seleção dos participantes é realizada entre indivíduos saudáveis, com idade entre 18 e 55 anos, pois faixas etárias restritas não têm importância em testes de bioequivalência, que normalmente não procura diferenças na resposta em diferentes idades.

A maioria dos estudos seleciona indivíduos do sexo masculino, porém há uma corrente que tende a realizá-lo com ambos os sexos. A participação de mulheres, porém,

implica em alguns problemas de ordem analítica e ética, como a permissão do uso concomitante de contraceptivos orais, as diferenças das características corporais entre os sexos e menstruação. Estes problemas podem alterar bioquimicamente a resposta feminina às diferentes substâncias e a necessidade de comprovada ausência de gravidez no transcorrer do estudo.

Os critérios de inclusão visam reduzir as variações interpessoais ao máximo. O peso corpóreo deve estar dentro de uma faixa previamente estabelecida, o uso de outros fármacos, ingestão de determinadas substâncias, fumo, dieta, estados patológicos e exames prévios aos estudos devem ser controlados, procurando-se a homogeneidade da amostra.

O número de participantes depende da variação do erro associada com a característica estudada, do nível de significância desejado e do desvio padrão compatível com a bioequivalência, segurança e eficácia deve ser calculado por métodos adequados e nunca ser menor do que doze.

O tempo de confinamento não deve exceder três meias vidas do medicamento e o tempo total de estudo deve ser de três a cinco meias vidas. Tal procedimento permite que o valor da A.S.C. da concentração plasmática em relação ao tempo, obtida após a administração do fármaco até a última coleta, seja um retrato fiel da absorção e eliminação do fármaco do organismo, podendo ser extrapolado para o infinito, contanto que não exceda em vinte por cento da área total. O confinamento parcial é aceitável, em casos de

fármacos com meias vidas longas, quando o período de coleta de amostras sanguíneas dura vários dias ou semanas.

O estudo deve ser coberto por seguro, a participação necessariamente ser voluntária e no máximo de quatro vezes ao ano, com intervalo mínimo de três meses (FDA, 1993; JACKSON, 1994; ORMSBY, 1994; FDA, 1998; BRASIL, 1999).

Durante estudos de bioequivalência, os parâmetros farmacocinéticos que avaliam a biodisponibilidade de cada fármaco analisado são obtidos a partir das curvas de concentração plasmática do fármaco em relação ao tempo e analisados estatisticamente para determinação de bioequivalência. São elas (BAUER, 1989; FDA, 1993; JACKSON, 1994; ORMSBY, 1994; FDA, 1998; BRASIL, 1999):

- a **A.S.C.0-t** é útil na mensuração da quantidade total do princípio ativo inalterado que atinge a circulação sistêmica, proporcional a quantidade de fármaco administrado (relação linear ou não linear, num comportamento do tipo Michaelis Menten). É calculada pela integração da área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo desde a administração do fármaco até a última coleta sanguínea, obtida pela aplicação da regra trapezoidal. Caso tenha adicionado ao seu valor a fração  $C_t/k_e$ , ter-se-á o valor de **A.S.C.** tendendo ao infinito (**A.S.C.0-inf.**), no qual  $C_t$  é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente e  $k_e$  é a constante de eliminação da fase terminal, estimada pela regressão linear

dos pontos que descrevem a fase de eliminação da curva de concentração plasmática pelo tempo, em um gráfico mono logarítmico;

- **C<sub>max</sub>**, concentração plasmática máxima, é o pico da concentração plasmática que se registra após a administração de um fármaco, sendo possível para a maioria dos medicamentos demonstrar a correlação entre concentração plasmática e efeito terapêutico, fornecendo uma indicação da suficiência entre absorção sistêmica e a possível resposta terapêutica. É um parâmetro importante para se avaliar possível risco de reações tóxicas;
- **T<sub>max</sub>**, tempo em que se atinge a concentração plasmática máxima, é o ponto de equilíbrio entre absorção e eliminação e representa a velocidade de absorção do fármaco, após a administração oral, ambos dados obtidos diretamente das curvas.

Deve-se realizar análise de variância (**A.N.O.V.A.**) dos parâmetros farmacocinéticos **A.S.C.0-t** e **C<sub>max</sub>** para avaliar os efeitos de seqüência (grupo), de voluntários, de período e de tratamento.

Para um estudo que emprega dose única dos medicamentos teste e de referência, a **A.N.O.V.A.** é geralmente realizada com as razões de **A.S.C.0-t** e **C<sub>max</sub>**, entre as formulações, transformadas logaritmicamente. A distribuição dos dados transformados se aproxima mais a uma distribuição normal em relação aos dados não transformados. O poder esperado para o teste é acima de 80% e o nível de significância de 5%, construindo-se um intervalo de confiança (I.C.) de 90% para a razão entre as médias dos valores obtidos

com os medicamentos teste e referência, para cada um destes parâmetros, utilizando-se dados transformados logaritmicamente. **T<sub>max</sub>** será analisado como diferença individual: teste–referência, construindo-se um intervalo de confiança (I.C.) de 90%, utilizando-se teste não paramétrico.

Dois medicamentos serão considerados bioequivalentes quando o I.C. de 90% para a razão entre as médias de **A.S.C.0–t** e de **C<sub>max</sub>** estiver compreendido entre 80% e 125%. Outros limites de I.C. de 90% poderão ser aceitos mediante justificativas científicas. Quando clinicamente relevante, **T<sub>max</sub>** deverá também ser considerado (BRASIL, 1999; FDA, 2001).

O método analítico aplicado a testes de bioequivalência, na mensuração da concentração de diferentes fármacos em matrizes biológicas deve ser exato, preciso e específico. Não há um consenso quanto ao melhor método, porém, o formado pela C.L.A.E. acoplada à espectrometria de massa, mostra-se de grande valor na análise de fármacos e seus metabólitos, substâncias endógenas polares e macromoléculas (LESLIE, 1994; USP, 1995; HOFFMANN, 1996).

A C.L.A.E. é um método de separação química, normalmente utilizado para a análise de fármacos em fluídos biológicos, em testes de bioequivalência, servindo como purificador inicial do fluído biológico avaliado e como introdutor das diferentes substâncias separadas para o dispositivo de análise que, neste caso, é o espectrômetro de massas. A técnica da C.L.A.E. acoplada à espectrometria de massas alia o poder de separação da

C.L.A.E. à especificidade e sensibilidade do espectrômetro de massas como detector (LESLIE, 1994; USP, 1995; HOFFMANN, 1996).

As amostras biológicas são previamente tratadas antes de serem injetadas na C.L.A.E., por precipitação de proteínas do soro ou plasma, extração líquido-líquido e líquido-sólido. O método extrativo do analisado pode ter importante impacto sobre a exatidão, precisão e seletividade do processo, conseqüentemente, um padrão interno é adicionado a amostra no início do processo para compensar perdas por transferência e variações de volume nas diferentes etapas. A recuperação do analisado não precisa ser necessariamente de 100%, mas a extensão da recuperação do analisado e do padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutiva (LESLIE, 1994; USP, 1995; FDA, 2001).

A C.L.A.E. é uma técnica baseada numa fase líquida móvel que elui através de uma fase sólida estacionária. As separações das diferentes substâncias presentes no fluido biológico analisado na fase móvel, dá-se por interação com a fase estacionária, através de processos de partição, adsorção ou troca iônica. Os dados obtidos são alturas ou áreas de picos da substância eluída, em diferentes tempos, saindo da coluna primeiramente àquela com menor interação e por fim aquela com maior interação com a fase estacionária. A concentração de cada substância é obtida pela relação entre o analisado e o padrão interno (LESLIE, 1994; USP, 1995).

Diferentes interfaces são utilizadas no acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa, o que pode ser um problema, pois o espectrômetro



requer íons em fase gasosa e as substâncias normalmente analisadas pela C.L.A.E. são compostos não voláteis (USP, 1995; HOFFMANN, 1996). Aquele que parece ser o método ideal de ionização entre a C.L.A.E. e a espectrometria de massa é o *eletrospray*. A fase móvel é borrifada após deixar o capilar, na extremidade do qual existe uma diferença de potencial de vários quilovolts. A natureza da fase móvel, a velocidade do fluxo e a diferença de potencial são parâmetros que influenciam no tamanho das gotículas, bem como a carga de cada uma delas (USP, 1995; HOFFMANN, 1996). As gotículas caminham contra um fluxo de nitrogênio, que as faz diminuir de tamanho por evaporação do solvente, restando várias moléculas do analisado, que, carregadas eletricamente, vão se separando até praticamente sobrarem íons isolados, cuja carga dependerá do número de sítios de ionização de cada molécula em questão ou agregados eletricamente carregados (*clusters*) (HOFFMANN, 1996).

Os analisadores dos espectrômetros de massa separam as espécies carregadas eletricamente, de acordo com a relação massa/carga de cada uma, a partir do que determinará a abundância e massa de cada espécie iônica. Um dos quatro tipos mais comuns de analisadores é o quadrupolo. É formado por quatro hastes dispostas de tal forma que configuram um quadrado, pelo centro do qual passam as espécies carregadas eletricamente. Assim, todos os íons formados no *eletrospray* entram no primeiro quadrupolo do espectrômetro, onde será separada, por potencial elétrico e rádio frequência, apenas a molécula com a relação massa/carga desejada. No quadrupolo seguinte do espectrômetro, o íon colide com um gás inerte (argônio) e produz fragmentos também

carregados. Estes são denominados íons produto e são característicos para cada substância. Os íons produto são separados no terceiro quadrupolo do espectrômetro, para serem analisados e quantificados no detector. Para cada potencial elétrico, íons de determinada relação massa/carga são selecionados, pois só eles atravessarão o quadrupolo, atingindo o detector eletrônico no final do aparelho. Todos os demais são refletidos e perdidos nas laterais do aparelho (USP, 1995; HOFFMANN, 1996).

Este método analítico tem a característica de ser altamente seletivo. Quando se tem uma mistura de substâncias eluídas e advindas do cromatógrafo, o primeiro quadrupolo irá separar somente a de massa/carga desejada, porém, caso haja mais de uma com a mesma relação, a colisão que se dá no segundo quadrupolo irá formar novas espécies, que serão definitivamente separadas no terceiro, restando somente o íon desejado para o analisador.

O processo analítico citado inicia-se com a infusão da mistura em análise no sistema, pelo *electrospray*, sem a operação do segundo e terceiro quadrupolo (modo *scan*), gerando espectros de massa totais que registram todas as moléculas. Ajustes são feitos para que o sinal da molécula em estudo seja máximo (energia do cone). Após os ajustes, o gás de colisão é ligado e os espectros de massa por dissociação induzida por colisão ("*collision induced dissociation*" - C.I.D.) são registrados (modo produto). Novos ajustes são realizados posteriormente para que o sinal do íon produto selecionado seja o máximo, principalmente pela energia de colisão.

Há muitas aplicações para a espectrometria de massa na área farmacêutica, seja para obter informações qualitativas do fármaco, identificar impurezas e contaminadores e características estruturais de determinada molécula, bem como quantitativas de determinadas substâncias em matrizes biológicas. Este método é muito favorecido quando se usa concomitantemente um dispositivo cromatográfico (USP, 1995; HOFFMANN, 1996).

## ***OBJETIVOS***

O objetivo deste estudo foi avaliar em voluntários humanos sadios, a equivalência entre uma formulação de Azitromicina 500 mg, comprimidos, produzido pela EMS Indústria Farmacêutica, Brasil), e uma formulação referência de Azitromicina 500 mg, comprimidos (Zitromax® 500 mg), produzidos pela Laboratórios Pfizer Ltda, Brasil. Vinte e cinco voluntários saudáveis, conforme avaliação clínica e laboratorial, participaram do estudo. O estudo consistiu na administração de uma dose única, em dois sentidos aleatórios cruzados que compara a formulação da Azitromicina 500 mg comprimidos (EMS Industria Farmacêutica Ltda, Brasil) com uma formulação referência de azitromicina 500 mg comprimidos (Zitromax® 500 mg comprimidos , fabricado por Laboratórios Pfizer Ltda, Brasil).

## *CASUÍSTICA*

Vinte e cinco voluntários sadios de ambos os sexos, adultos, com idade entre 18 e 50 anos, entre os 15% do peso corporal ideal, foram selecionados para o estudo. O grupo masculino foi composto por 13 voluntários com idade entre:  $25,1 \pm 8,4$  anos. [18 - 42], altura:  $170,4 \pm 7,4$  cm [155,0 - 178,0], peso:  $69,7 \pm 10,7$  kg [53,5 - 85,5]. O grupo feminino foi composto por 12 voluntárias com idade entre:  $26,6 \pm 10,0$  anos. [19 - 45], altura:  $157,2 \pm 4,4$  cm [151,0 - 166,0], peso:  $59,4 \pm 10,5$  kg [48,5 - 82,5].

# ***MÉTODOLOGIA***

## ***ASPECTOS ÉTICOS***

### **Aprovação do Estudo**

O protocolo foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade de São Paulo para aprovação. Qualquer mudança principal requereu aprovação do Comitê.

O estudo foi administrado conforme as providências da Declaração de Helsinki (1965) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983) e África do Sul (1996).

### **Termo de Consentimento Livre Esclarecido**

Os voluntários receberam uma explicação completa da natureza e o que se propõem na investigação do estudo. Foi compreendido que o estudo só serviria para propósitos de pesquisa e não se esperava que provesse qualquer benefício terapêutico aos indivíduos. O voluntário também entendeu que ele poderia se retirar a qualquer hora do estudo sem nenhum constrangimento. A cada voluntário foi exigido informar seu consentimento por escrito para a participação no estudo. O investigador principal manteve uma cópia do consentimento livre esclarecido de cada voluntário.

## **Confidencialidade**

Os resultados dos testes de laboratório e exames médicos foram registrados nas folhas clínicas dos voluntários e no arquivo de pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Toda a informação obtida durante a condução do estudo em cumprimento ao estatuto de voluntários da saúde estava disponível para o pessoal médico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Uma cópia dos exames de laboratoriais executadas para o estudo pós-clínico foi dada aos voluntários.

## PROTOCOLO CLÍNICO

### Projeto de Estudo

O estudo clínico consistiu em um estudo aberto, delineamento aleatório, aberto, cruzado de dois períodos com 25 (vinte e cinco) voluntários saudáveis de ambos os sexos (13 masculinos e 12 femininos). Após o período de seleção, os voluntários que se qualificaram foram hospitalizados por dois períodos de aproximadamente 24 horas. Cada hospitalização teve um intervalo de uma semana. Em cada período, os voluntários foram hospitalizados às 22 horas da noite anterior ao início do estudo, já tendo recebido dieta a que estavam habituados, quando iniciaram jejum de no mínimo 8 horas. O jejum foi mantido por mais duas horas após a administração de uma dose de 500 mg de Azitromicina, com 200 ml de água potável, por via oral, o que ocorreu por volta das 6 horas da manhã seguinte.

A seqüência randômica de administração das diferentes formulações está descrita no Quadro 1. Às oito horas, todos os voluntários receberam café da manhã padrão. Almoço e jantar foram fornecidos 5 e 10 horas após a medicação, respectivamente. Nenhum outro alimento foi permitido durante a permanência no hospital. Líquidos foram liberados à vontade, sendo evitados aqueles contendo xantinas, como chás, café e bebidas à base de cola.



**Quadro 1:** Randomização da formulação administrada

Voluntários		Seqüência de administração	
Número	Inicial	1	2
I	MLCM	R	T
II	REFL	R	T
III	FSAS	T	R
IV	FTSV	T	R
V	DAFQ	R	T
VI	JBB	T	R
VII	JAS	T	R
VIII	OSS	R	T
IX	LQF	R	T
X	LBT	T	R
XI	MBT	T	R
XII	NAC	R	T
XIII	FGS	R	T
XIV	LCFS	R	T
XV	FFS	T	R
XVI	EMH	T	R
XVII	RMAT	R	T
<b>XVIII*</b>	<b>FJRS</b>	T	R
XIX	FACM	T	R
XX	CAC	R	T
XXI	OBP	R	T
XXII	ORL	T	R
XXIII	MNLF	T	R
XXIV	DAAV	R	T
XXV	FFBF	R	T

**T (Formulação Teste):** *Azitromicina 500 mg comprimidos, EMS Indústria Farmacêutica Ltda*

**R (Formulação de Referência):** *Zitromax<sup>®</sup>, 500 mg comprimidos, Laboratórios Pfizer Ltda., Brasil*

*\*Voluntário XVIII desistiu*

A cada coleta sanguínea, pressões arterial sistólica e diastólica foram medidas não invasivamente pelo uso de esfigmomanômetro, além de serem anotadas também a temperatura axilar corporal e frequência cardíaca.

## **Programação do Estudo**

- Período de Pré-Estudo:**
- História Médica
  - Exame físico geral
  - Eletrocardiograma
  - Exame Clínico Laboratorial
- Período Confinado:**
- Foi coletado antes da administração do medicamento uma amostra de sangue e 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h, 168 h e 336 horas após administração do medicamento.
- Período Pós-estudo:**
- Exame físico geral
  - Eletrocardiograma
  - Exame Clínico Laboratorial
- T-Formulação Teste:**
- Azitromicina 500 mg comprimidos  
Lote 002117  
EMS Indústria Farmacêutica Ltda, Brasil.
- R-Formulação Referencial:**
- Azitromicina 500 mg comprimidos (Zitromax 500 mg

comprimidos)  
Lote 91864038  
Laboratórios Pfizer Ltda, Brasil

## **Seleção de Voluntários**

Os voluntários foram aceitos no estudo somente se eles fossem considerados saudáveis, conforme determinado pela história médica, exame físico e os exames laboratoriais que antecedem ao início do estudo. Os voluntários realizaram eletrocardiograma (ECG) na avaliação inicial, pré-estudo, e após o último estudo de internação (pós-estudo).

Antes do início do estudo os voluntários foram avaliados quanto as suas condições emocionais para participarem da investigação. Foram esclarecidas todas as dúvidas restantes e, com concordância, assinaram o termo de consentimentos para participação no estudo.

## **Critério de Inclusão**

1. Voluntários masculinos saudáveis ou voluntários femininos saudáveis que não estivessem grávidas ou estivessem amamentando.
2. Idade entre 18 e 45 anos.
3. Isento de doença cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica e psiquiátrica significativa como determinada

pela história, exames físicos e psicológicos, eletrocardiograma e as grades laboratoriais.

4. Disponibilidade para terminar o estudo.

### **Critério de Exclusão**

1. Aqueles que participaram em um estudo voluntário dentro dos três meses precedentes.
2. Voluntários receberam regularmente porções de medicamentos durante as quatro semanas anteriores ao estudo.
3. Voluntários que estiveram em hospital por qualquer razão durante as oito semanas antes do estudo.
4. Voluntários que doaram sangue nos três meses precedentes.
5. Voluntários que tiveram uma história de abuso de álcool e/ou de droga.
6. Voluntários que bebem regularmente mais de 2 unidades de álcool por dia (1 unidade = a ½ cerveja / 1 copo de vinho / 1 medida de aguardente).
7. Peso acima 100 quilogramas ou 15% do peso acima do peso ideal.
8. Voluntários que fumam 15 ou mais cigarros/dia.
9. Voluntários com conhecida alergia a penicilina.

## **Registro dos Voluntários**

Os voluntários foram registrados no estudo somente se eram considerados adequados e saudáveis por determinação do histórico médico, exame físico e psiquiátrico e testes de segurança de laboratório desempenhados dentro de oito semanas antes do início do estudo.

## **Dosagem**

Os voluntários foram orientados a estarem presentes na unidade hospitalar aproximadamente às 21h da noite antes de cada dose e permanecer na unidade até 12 horas depois da dosagem.

## **Restrições aos voluntários**

Todos os voluntários chegaram à unidade tendo jantado normalmente e foram obrigados a permanecer em jejum até duas horas após a administração da dose da manhã, quando um desjejum foi servido. Uma refeição completa foi providenciada após cinco horas e outra dez horas após a dose. Nenhuma outra alimentação foi permitida durante o período “em casa”.

O refresco líquido foi permitido depois do almoço, mas outras bebidas (incluindo chá, café, cola) foram evitadas.

Fumar não foi permitido durante o período.

Uma possível medicação concomitante foi evitada durante o estudo. Toda medicação, incluída sobre a medicação contrária, foi registrada.

O consumo do álcool era limitado durante todo o período do estudo e foi evitado completamente durante 48 horas antes de cada dose.

### **Critério de Retirada**

Os seguintes critérios foram usados para a retirada dos voluntários da pesquisa:

1. Voluntários que não desejaram continuar com o estudo por diferentes razões, como por exemplo: indisponibilidade e intolerância para o procedimento de estudo.
2. Quando os efeitos não fossem os desejados da droga em estudo.
3. Quando o teste de laboratório de significado clínico fosse julgado anormal.
4. Quando existisse doença concomitante que requeresse medicação.

### **Efeitos Adversos**

Foi pedido aos voluntários que relatassem todo evento adverso e o momento da sua ocorrência. Também foi pedido que notificassem ao investigador caso fosse necessário levar medicamento adicional.

Qualquer evento adverso que tenha ocorrido durante o período de estudo foi registrado em detalhes, por conclusão, na página pertinente nas Folhas Clínicas Voluntárias. Foram feitas investigações sobre o caso do voluntário ter experimentado qualquer evento adverso. Estas investigações limitaram-se a uma pergunta genérica do tipo: “Como você está?”.

Qualquer voluntário com um evento adverso seria acompanhado clinicamente através de estudos de laboratório apropriado, até que todos os parâmetros voltassem ao normal.

### **Produtos Estudados**

Os produtos do teste que contêm a informação abaixo foram fornecidos por EMS Indústria Farmacêutica Ltda, Brasil. O produto da referência foi adquirido comercialmente pelo investigador principal.

**Quadro 2:** Quadro comparativo entre o produto teste e o de referência.

Nome	Produto em Teste	Produto Referencial
	Azitromicina	Zitromax
Ingrediente Ativo	Azitromicina	Azitromicina
Forma de Dosagem	Comprimido revestido	Comprimidos revestidos
Dosagem	500mg	500mg
Número de lote	002117	91864038
Fabricante	EMS Industria Farmacêutica Ltda	Laboratórios Pfizer Ltda



## MATERIAIS E REAGENTES

### Equipamentos

- Pipetas ajustáveis (100 uL, 200 uL e 1000 uL), obtidas da Gilson "Pipetman", França;
- Vórtex mixer, modelo Fisher Vortex Genie 2, obtido da Fisher Scientific Laboratory Equipment, Estados Unidos da América (E.U.A.);
- Ponteiras de plástico, LabTips, modelos LabTip Yellow (5 a 200 uL), e LabTip Blue (200 a 1000 uL), adquiridos da Unilab, São Paulo, Brasil;
- Coluna analítica 4 mcm (150 x 4,6 mm de diâmetro interno), modelo Genesis C18, lote 9629701, adquirida da Jones Chromatography (FM 15962E), Inglaterra;
- Pré-coluna 4 mcm (10 x 4 mm de diâmetro interno), modelo Genesis C18, lote 9629702, adquirida da Jones Chromatography (FH 1962-2), Inglaterra;
- Tubos de teste de vidro, descartáveis, 120 x 11 mm, adquiridos da Unilab, São Paulo, Brasil;
- Pipetas "Pasteur" (5,75") ou capilares (9");
- Tubos "Eppendorf", adquiridos da Unilab, São Paulo, Brasil;
- Vials de vidro para "Autosampler" (1,1 CTVG) e tampas da Chromacol, E.U.A.;

- Pontenciômetro Quims, número 610874, modelo Q400P, Singapura;
- Centrífuga de várias velocidades, refrigerada, Beckman, número 349702, modelo GPS, E.U.A.;
- Sistema HPLC, modelo Hewlett-Packard 1100 (tabela 6);
- Espectrômetro de massa, modelo Micromass Quattro II, com *electrospray* como fonte, número 6418E;
- o software de análise foi o MassLynx (versão 2,3) executando sobre o Windows NT (versão 4,0) em PC Digital Celeris GL 6200.

## Padrões

Azitromicina	Análise
Roxitromicina	Padrão Interno

## Reagentes

- Acetonitrila - HPLC
- Dichloromethane -PA;
- Acetato de amonia – 98%;
- Diethyleter – PA;
- Ácido Fórmico – 88%;
- Água –Purificada usando sistemas( Mili-Q ou Elga UHQ);

- Plasma humano para as preparações das curvas de calibração e para os controles de qualidade, cedidos pelo Banco de Sangue do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, Brasil.

### **Coleta das Amostras Sangüíneas**

Amostras sangüíneas, para análise da concentração do fármaco no plasma, foram retiradas através de abocate instalado em veia calibrosa do antebraço, previamente à ingestão de um comprimido de 500 mg de Azitromicina 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 96; 168 e 336 horas após a administração do medicamento. Em cada um destes momentos, foram aspirados 10,0 ml de sangue através de uma seringa e acondicionados em tubos de vidro limpos contendo anticoagulante (heparina).

As amostras sangüíneas foram centrifugadas a 4000 rpm por dez minutos, em temperatura ambiente e o plasma decantado, removido e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise.

As concentrações plasmáticas de azitromicina foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa, acoplada a um espectrômetro de massa com ionização por *electrospray* positivo, sob condições de monitoramento de reação múltipla (M.R.M.).

## Quantificação do Fármaco nas Amostras de Plasma

### Extração do Fármaco

Foi realizada uma extração líquida - líquido do fármaco.

A 0,2ml da amostra plasmática armazenada e previamente reconstituída (aquecida até a temperatura ambiente) e homogeneizada (centrifugada a 3500rpm por 5 minutos a 4°C para precipitar solutos) ou ao plasma utilizado para as curvas de calibração (*pool* de plasma humano preparado e obtido do Banco de Sangue do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo).

Para a extração das amostras foram seguidos os seguintes passos:

Foram dispostos tubos de ensaios 10x75 não siliconizados em uma raque. Adicionou-se (200µL) de plasma humano e procedeu-se ao controle de qualidade de amostras, QCs em tubos apropriados.

Cada tubo recebeu (10µg/mL de roxitromicina 70:30 v/v hidroxí acetonitrilo plus 20mM ácido fórmico e 0,15% de solução de acetato de amônia) padrão interno, usando-se um EPPENDORF. Repetiu-se a pipetagem e as amostras foram encaminhadas para o vortex-mix por 40s. Após, adicionou-se 4ml de Diethyl-ether/dichloromethane (70:30), usando-se uma pipeta de vidro calibrada e novamente se encaminhou às amostras para o vortex-mix por 40s.

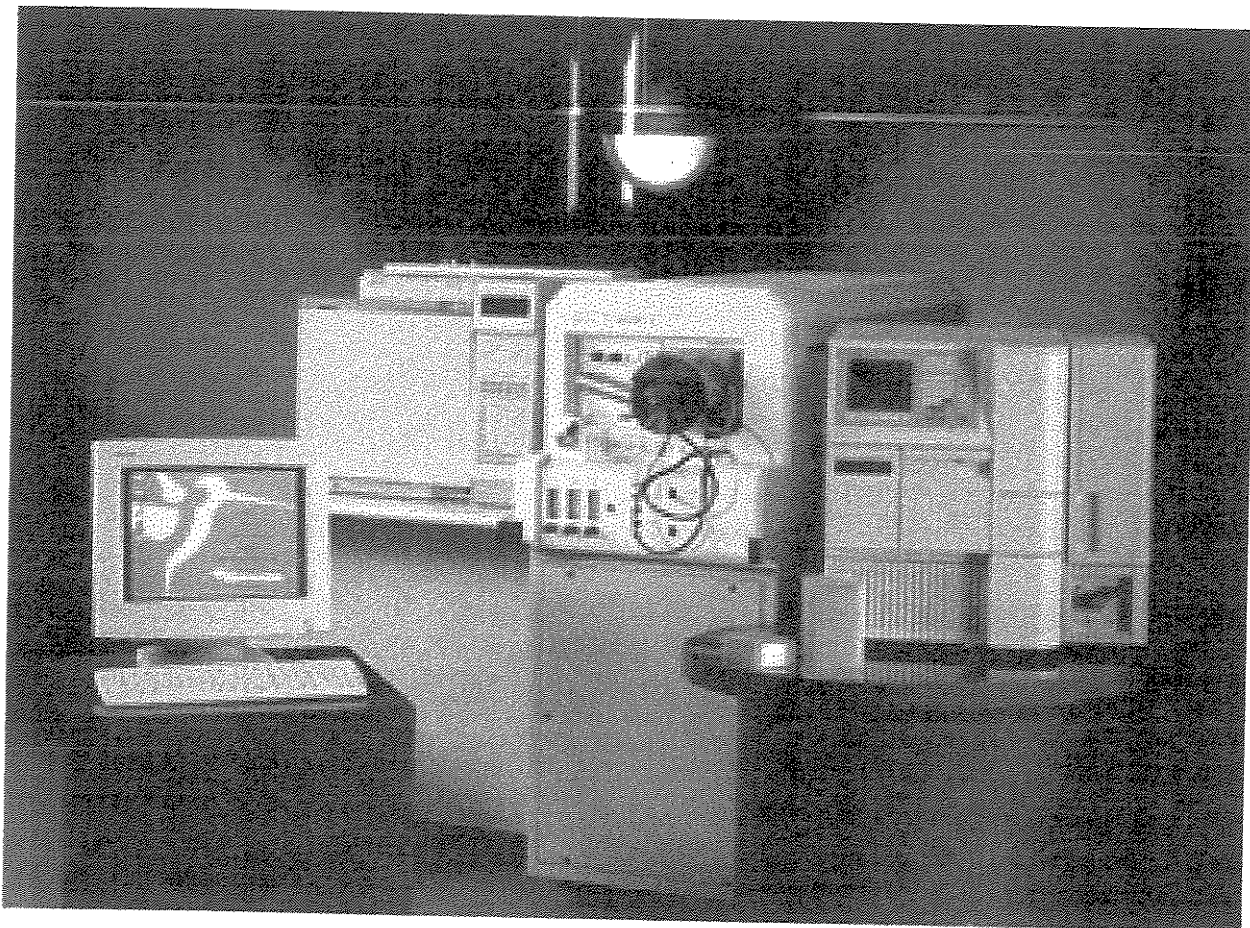
As amostras permaneceram em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos e o conteúdo orgânico foi transferido, utilizando-se pipetas Pasteur, para outro tubo limpo. Na seqüência, foi removido o solvente usando-se fluxo de nitrogênio a 37 °C.

As amostras foram reconstituídas de fase móvel A (70% CH<sub>3</sub>CN, 30% H<sub>2</sub>O 20mM ácido fórmico e 0,15% acetato de amonia) (200µL) e reconstituído os resíduos pelo vórtex-mix durante 15s.

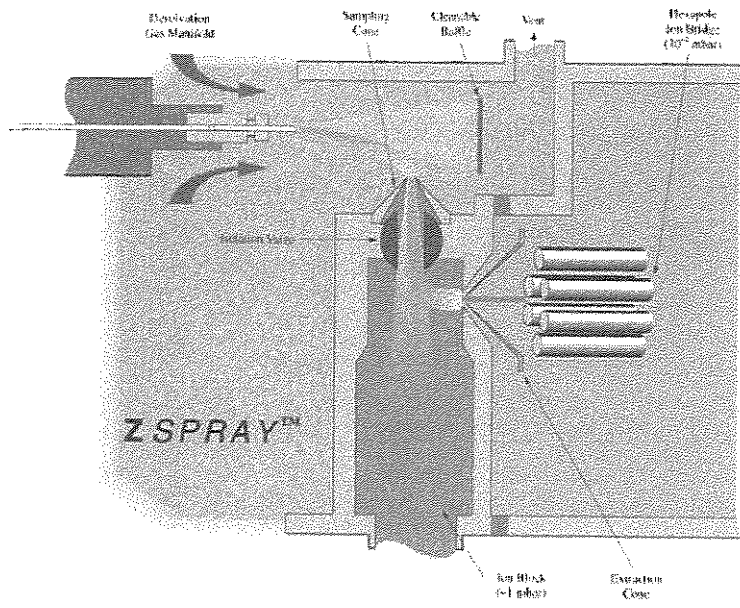
A nova solução foi transferida, com uso de pipetas automáticas de pontas plásticas descartáveis, para *vials* que foram fechados e colocados em bandejas do *autosampler* do H.P. 1100.

### **Condições do Cromatógrafo**

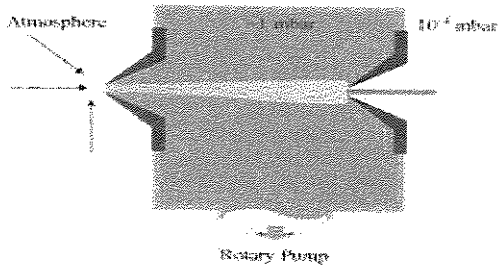
A cromatografia foi realizada com uma coluna Gêneseis C<sub>18</sub> 4µm coluna analítica (150mm x 4,6mm) de diâmetro interno, modelo Genesis C18, adquirido da Jones Chromatography, Thames Valley, (Inglaterra), acoplado a um Mass Spectrometer (Espectrômetro de Massa), modelo Micromass Quatro II. A Cromatografia foi realizada usando uma fase móvel composta (70% CH<sub>3</sub>CN / 30% de água contendo 20mM ácido fórmico mais 0,15% de acetato de amonia) a um fluxo de 0,8 ml/min. O sistema operou a uma temperatura de 26°C. A pressão do sistema esteve entre 50 bar a 70 bar e o tempo total transcorrido de 6.0 min. O tempo de retenção observado foi de 4,6 min para a azitromicina e 4,7 min para o controle interno.



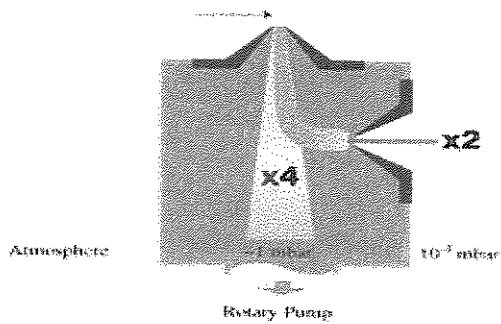
*Figura 2:* Espectrômetro de massa: Micromass Quattro II



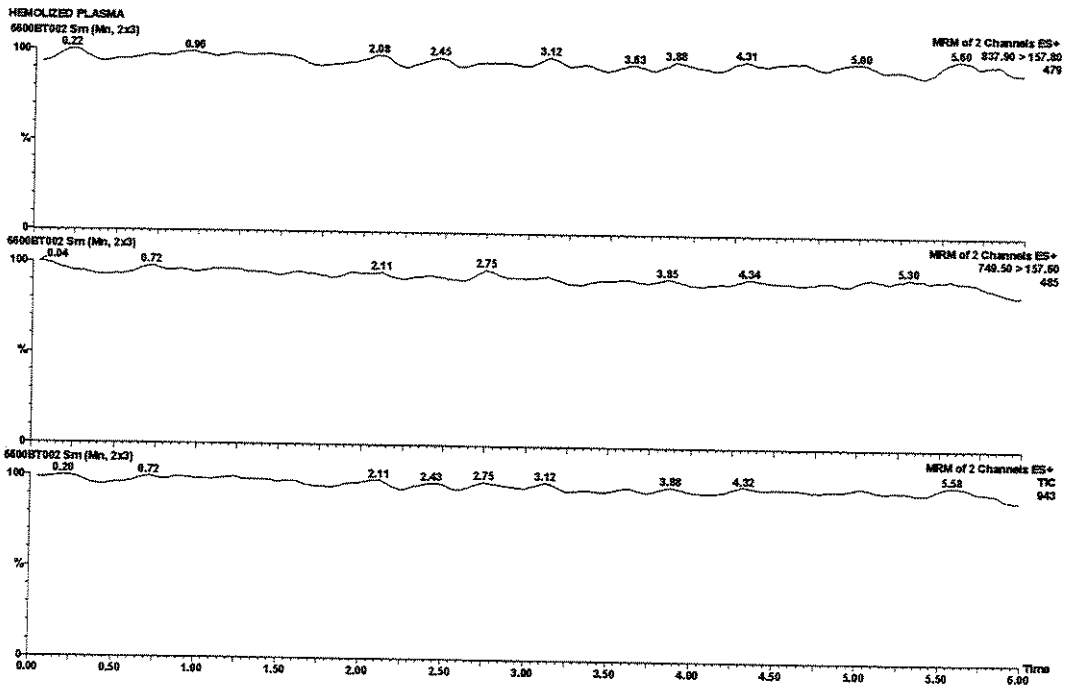
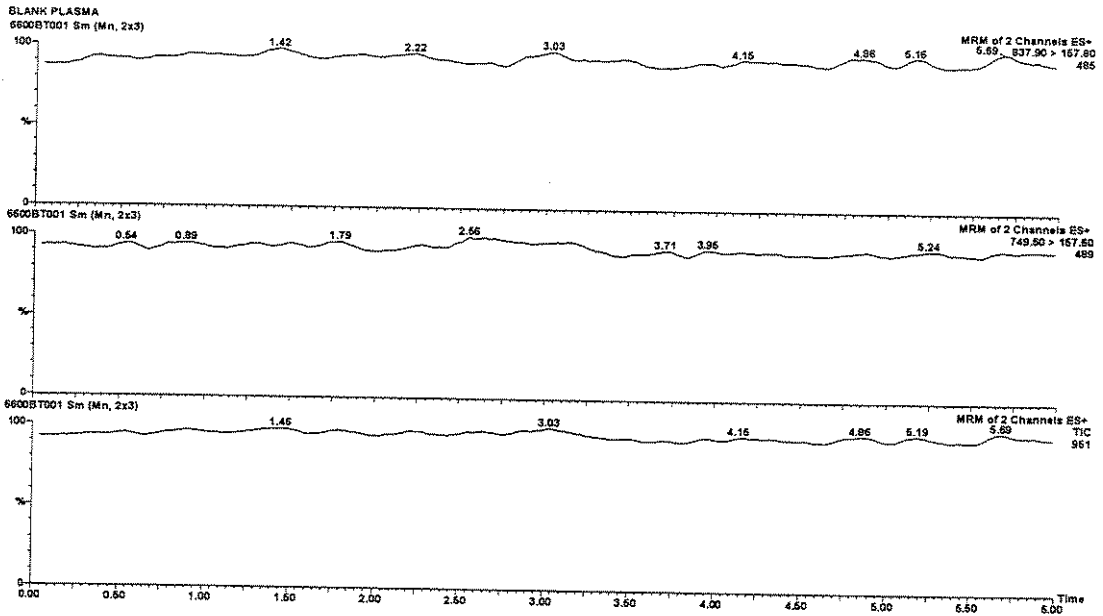
**Conventional Probe System**



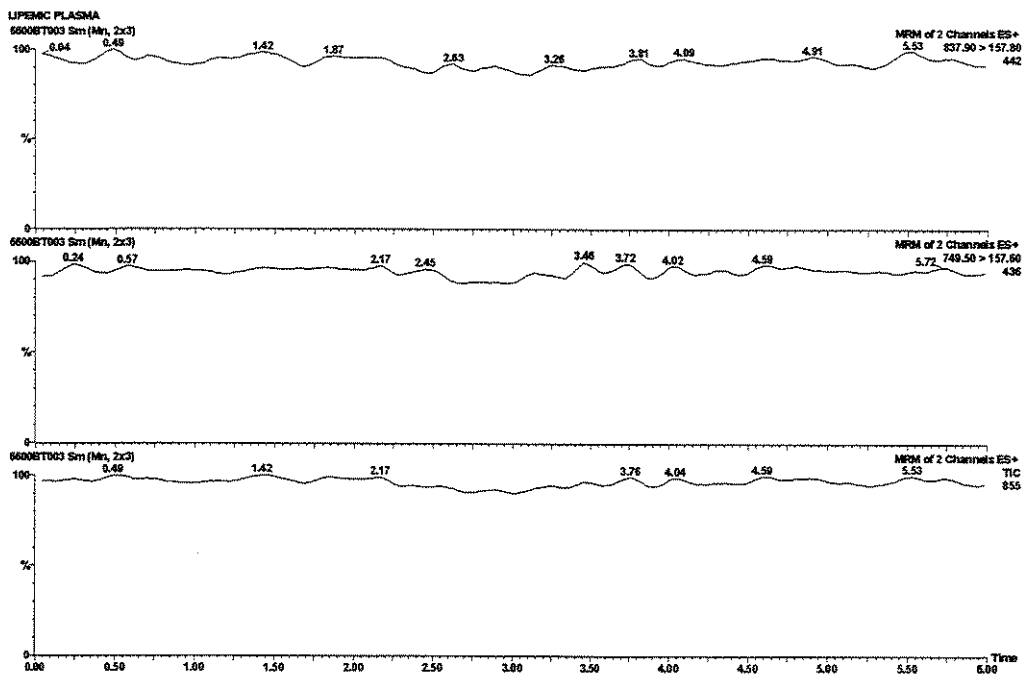
**ZSPRAY™ Cold Spray Ion Source System**



**Figure 3: Mass Spectrometer: Z SPREY**







**Figura 4:** Curvas dos brancos de diferentes plasma humanos submetidos às condições analíticas, nota-se que nos espectrogramas de plasma branco normal, lipêmico e hemolizado, percebe-se a ausência de interferentes em relação ao tempo de retenção do analito e seu padrão interno, nas diversas situações de plasma que podem aparecer durante o estudo.

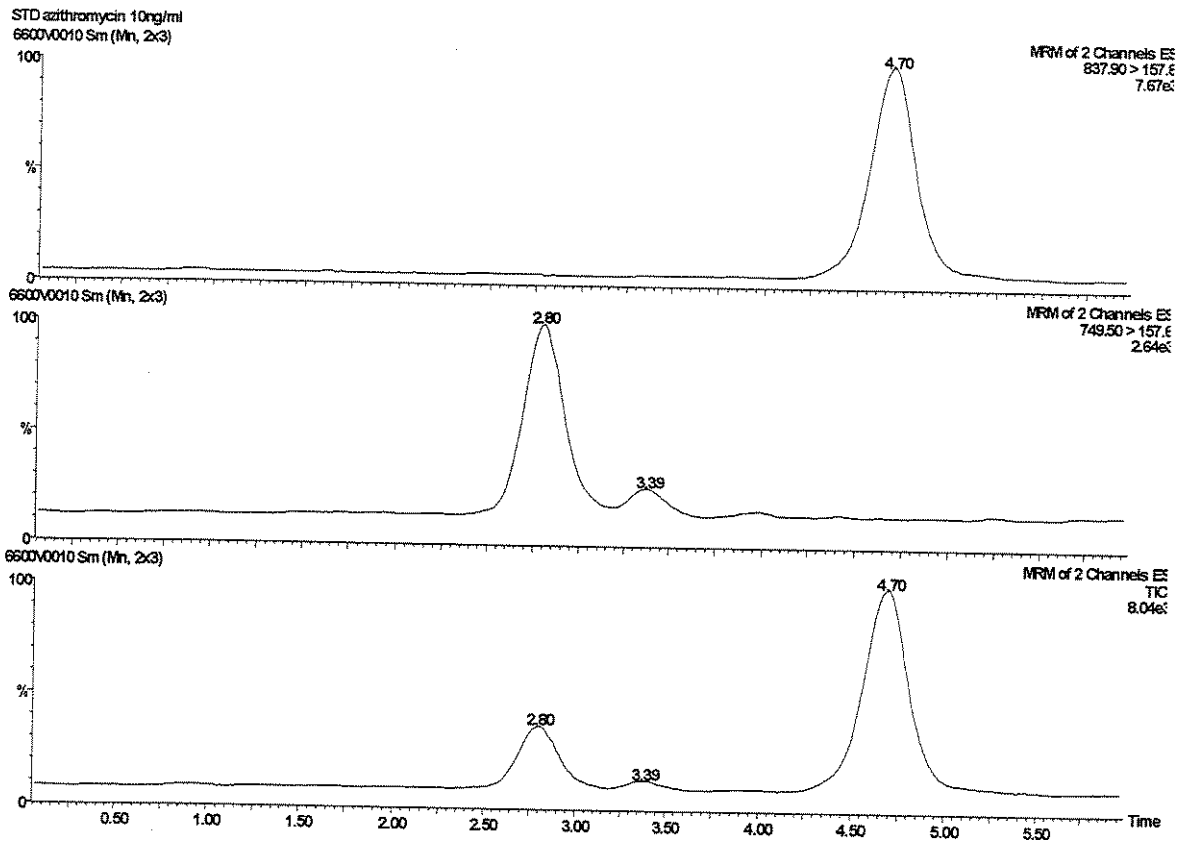
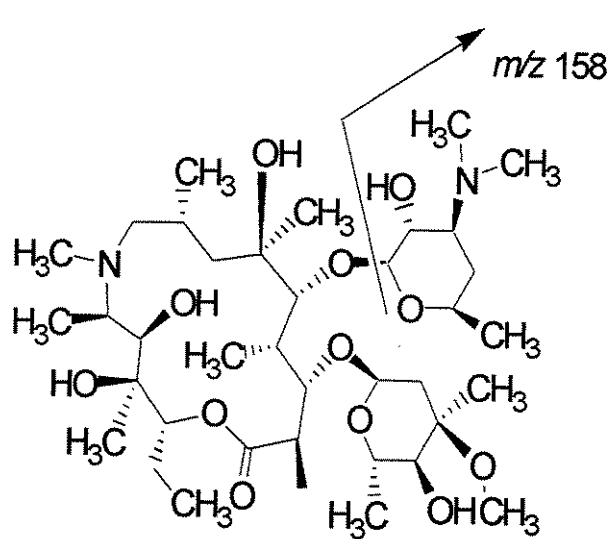
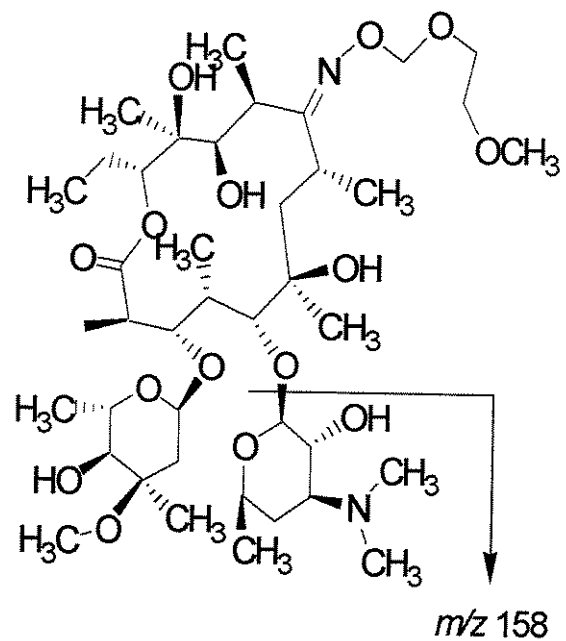


Figura 5: – Espectrogramas analito com padrão interno.

## Esquema de quebra da Azitromicina e Roxitromicina



**AZITROMICINA**



**ROXITROMICINA  
(PADRÃO INTERNO)**

## Farmacocinética e Análise Estatística

A constante de eliminação de primeira ordem (**ke**) foi estimada pela regressão linear dos pontos da fase de eliminação em gráfico linear-log. A meia vida de eliminação (**t<sub>1/2</sub>**) foi obtida pela equação  $t_{1/2} = \ln(2)/ke$ , onde **ln** é o logaritmo neperiano. A concentração plasmática máxima (**Cmax**) e o respectivo tempo para atingir esta concentração (**Tmax**) foram obtidos diretamente das curvas. As áreas sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo, de zero até a última concentração detectada (**A.S.C.0-t**) foram calculadas pela aplicação da regra trapezoidal. Extrapolação dessas áreas para o infinito (**A.S.C.0-inf.**) foi feita pela adição do valor de **Ct/ke** às **A.S.C.0-t** calculadas, onde **Ct** é a última concentração plasmática do fármaco detectada após a administração deste.

A bioequivalência entre as formulações foi calculada através das razões individual teste/referência de **ASC0-t**, **ASC0-inf.**, **Cmax**, **ke** e **t<sub>1/2</sub>** e as diferenças individuais teste-referência para **Tmax**. O intervalo de confiança de 90% para as razões individuais, com uma variação limite dentro do intervalo de 80% a 125% e a inclusão do valor "zero" dentro do intervalo de confiança de 90% para as diferenças de **Tmax**, foram avaliados empregando teste paramétrico (A.N.O.V.A.) e não paramétrico (teste de Wilcoxon). No teste paramétrico foram realizados os cálculos das razões individuais para **Cmax** e **A.S.C.0-t**. Já para **Tmax**, foram realizados os cálculos das diferenças individuais. Os resultados não paramétricos foram estimados pelo intervalo de confiança de 90% das

razões individuais, exceto para **T<sub>max</sub>**, que foi expresso como ponto estimado e intervalo de confiança de 90% das diferenças individuais.

Os critérios para realização desta etapa são determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária

### **Validação da Metodologia Analítica**

A determinação da adequabilidade e confiabilidade de um método analítico para a realização de um estudo de bioequivalência, é realizada através da averiguação de sua sensibilidade, especificidade, linearidade, acurácia, precisão e reprodutibilidade, levando-se ainda em conta a estabilidade dos compostos que estão sendo empregados. Para esta certificação utilizam-se os seguintes parâmetros e respectivos limites de aceitação:

**A. Especificidade** – Busca-se a presença de interferência, utilizando-se o procedimento proposto para a extração de amostras. São utilizados 4 plasmas de diferentes indivíduos colhidos em jejum, 1 plasma hiperlipêmico e 1 plasma hemolizado. A especificidade é comprovada pela determinação de inexistência de interferência significativa, no tempo de retenção da droga, metabólitos ou padrão interno, comparando-se visualmente o cromatogramas obtidos com aquele produzido pela análise de uma solução aquosa do fármaco em análise em concentração próxima ao Limite de Quantificação;

**B. Sensibilidade** – É avaliada através do Limite de Quantificação (LOQ), de forma a considerar não somente a sensibilidade em si, mas também em função dos critérios de precisão e acurácia do método. O LOQ é aprovado se forem satisfeitos os seguintes critérios: a) Inexistência de interferência ou resposta 5 vezes maior que qualquer interferência existente em brancos nos tempos de retenção em uso; b) Pico do analito identificável, claro, discreto com uma precisão de 20%, calculada através do coeficiente de variabilidade do valor quantificado para 5 alíquotas provenientes de um mesmo controle padrão, bem como da correspondente duplicata da curva de calibração em uso. c) Acurácia

de 80% a 120% em relação ao valor nominal da concentração do controle padrão utilizado, bem como da correspondente duplicata da curva de calibração em uso.

**C. Linearidade** – É avaliada em função da linearidade da curva de calibração empregada. E esta, é aprovada se forem satisfeitos os seguintes critérios: a) Pelo menos 4 de 6 padrões de cada concentração nominal, incluindo o padrão correspondente ao LOQ e o padrão de maior concentração, com desvio menor do que 15% da concentração nominal em pelo menos uma das duplicatas; b) Coeficiente de correlação da curva igual ou maior que 0.98.

**D. Precisão e Acurácia** – São avaliadas a partir da quantificação de pelo menos 3 concentrações padrão distintas (controles de qualidade QCA, QCB, QCC), determinadas em função da faixa de concentrações esperadas, tomando-se como base 5 alíquotas de cada concentração quantificadas durante uma única corrida analítica (precisão e acurácia intra-lote).

**E. Reprodutibilidade** – A avaliação se dá a partir da determinação da precisão e acurácia de 3 lotes provenientes de matrizes biológicas distintas (precisão e acurácia inter-lote)

A estabilidade dos compostos é determinada em função do tempo necessário para preparação das amostras e respectiva quantificação, bem como das temperaturas de armazenamento usualmente empregadas. Para sua realização são utilizadas duas concentrações distintas da droga a ser dosada, cujas amostras são submetidas aos seguintes testes:

1. **Estabilidade no autosampler** – Determina a estabilidade da droga e do padrão interno em fase móvel, na temperatura encontrada no autosampler, por período de tempo igual ou superior a uma corrida analítica;
2. **Congelamento e descongelamento** – Determina a estabilidade da droga em plasma após 3 ciclos de congelamento por 24 horas e descongelamento em temperatura ambiente;

3. **Estabilidade de curto período em temperatura ambiente:** Determina a estabilidade da droga em plasma em temperatura ambiente, por período de tempo igual ou superior ao necessário para o preparo de amostras para uma corrida analítica;
4. **Estabilidade de longo período:** Determina a estabilidade da droga em plasma na temperatura de congelamento das amostras, por período de tempo igual ou superior ao primeiro dia de coleta de amostras e o dia da análise da última amostra;
5. **Estabilidade das soluções de trabalho:** Determina a estabilidade da droga e do padrão interno a partir das soluções de trabalho preparadas, na temperatura em que são armazenadas, e por período de tempo equivalente à sua utilização durante a condução do estudo.

### ***Análise Estatística***

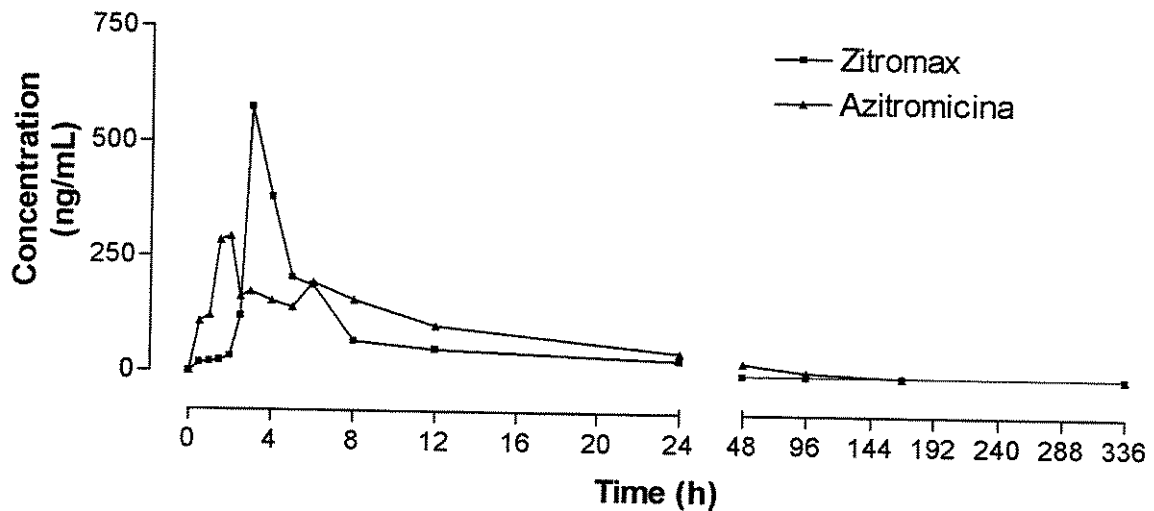
De acordo com as Agências Reguladoras os parâmetros AUC, C<sub>max</sub>, deverão ser analisados como as razões dos logaritmos individuais transformados das drogas teste/referência. T<sub>max</sub> será analisados como diferença individual: teste - referência. Ambos testes paramétricos e não paramétricos serão aplicados para análise das variáveis. Os programas utilizados de computador foram o "*WinNonlin Professional Network Edition*", versão 1.5 (Pharsight, Mountain View, Ca, EUA), "*Bioequivalence Program for Two-Period Crossover Studies*", versão 3.4 (Hreman P., Wijnand, Oss, Holanda), "*Microsoft Excel*", versão 7 (Microsoft, Redmond, WA, EUA), "*GraphPad Prism*", versão 3.00 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA) e WinSTAT, versão 3.1 (Kalmia Co, inc, Kalsruhe, Alemanha).

# RESULTADOS

## CROMATOGRAMAS INDIVIDUAIS

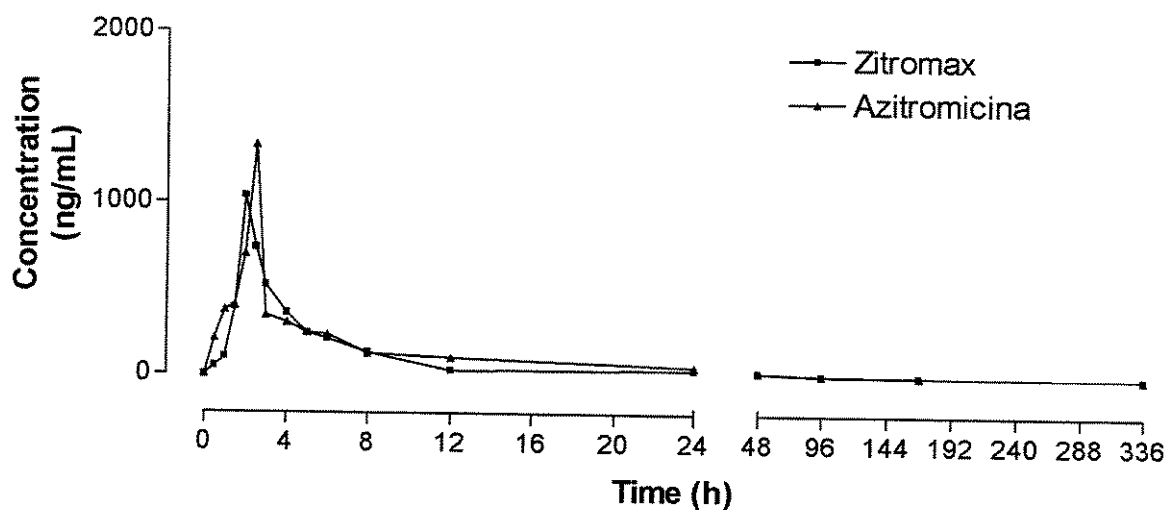
Concentrações individuais da Azitromicina versus tempo (figura) e parâmetros farmacocinéticos (tabela).

Vol I - MLCM

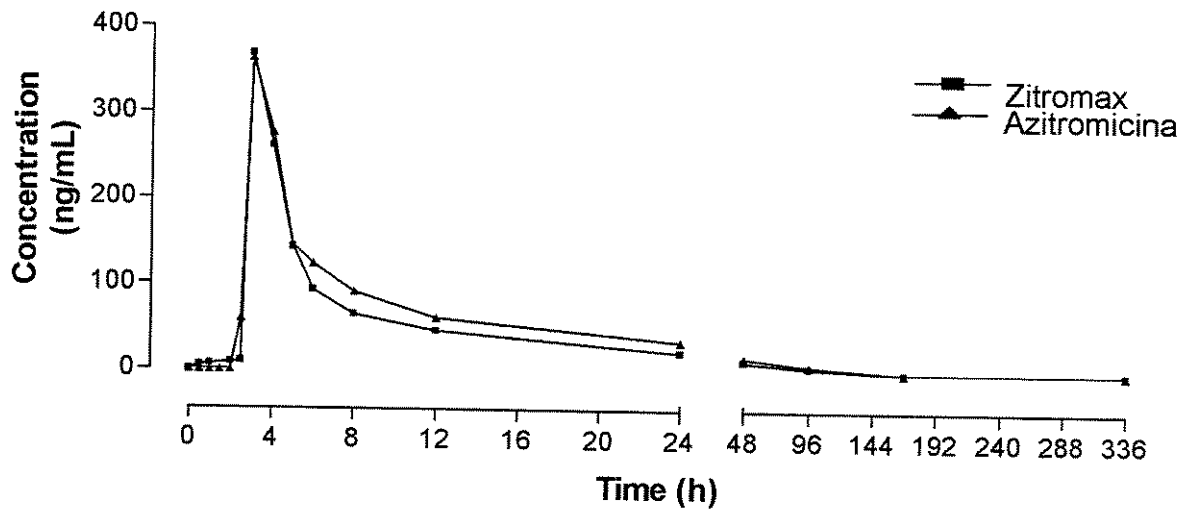


	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	24	96
AUC last ([ng * h]/mL)	2202	4613
AUC last paired ([ng * h]/mL)	2202	2766
AUC Inf ([ng * h]/mL)	2891	5109
AUC last / Inf (%)	76.2	90.3
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	4480	4989
AUCall (0-336h) / Inf (%)	155.0	97.7
Cmax (ng /mL)	575	293
Tmax (h)	3.0	2.0
T <sub>1/2</sub> (h)	15.1	32.8
Ke (1/h)	0.046	0.021

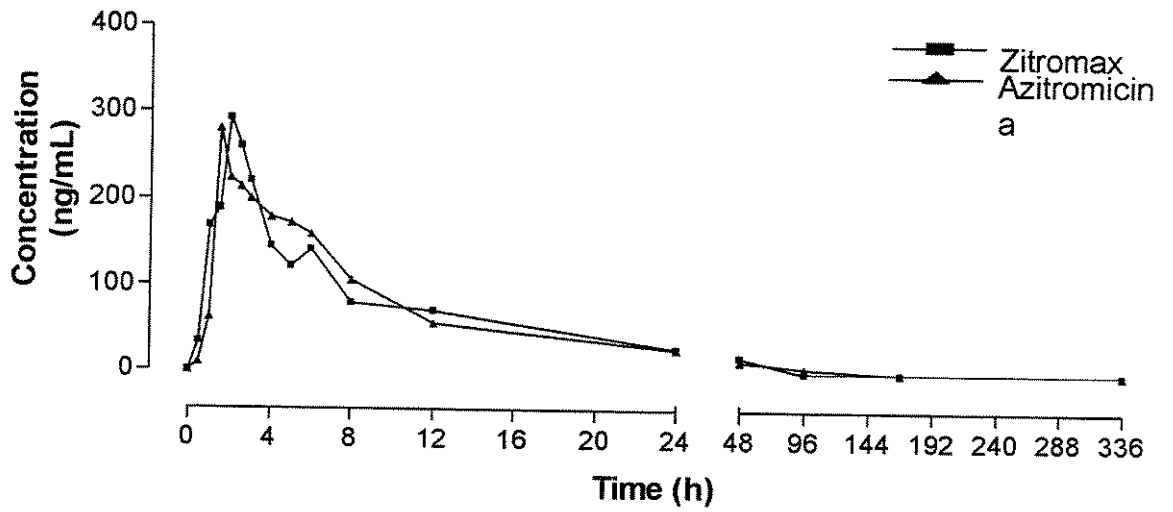




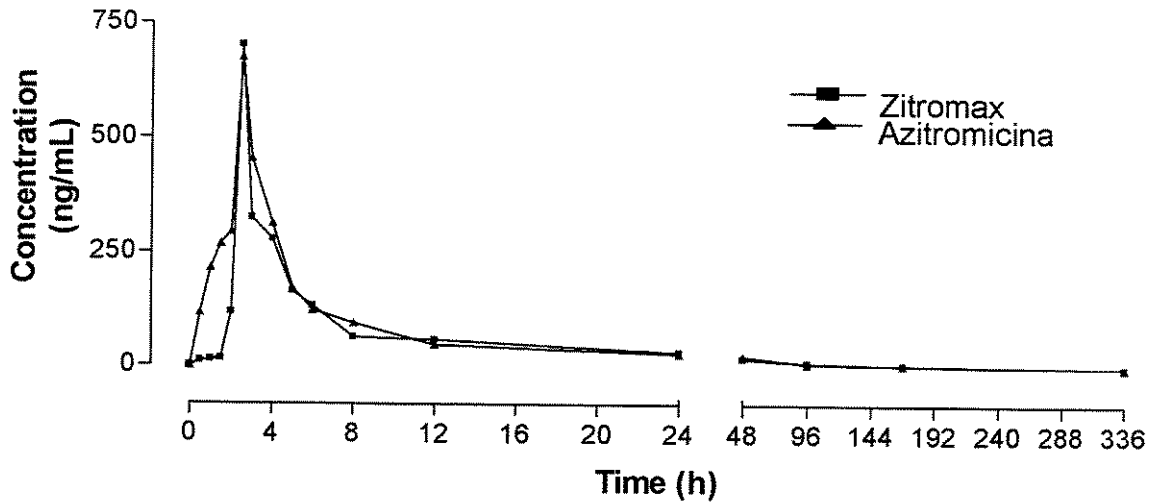
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	168	168
AUC last ([ng * h]/mL)	5613	6967
AUC last paired ([ng * h]/mL)	5613	6967
AUC Inf ([ng * h]/mL)	6215	7749
AUC last / Inf (%)	90.3	89.9
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	6193	7624
AUCall (0-336h) / Inf (%)	99.7	98.4
Cmax (ng /mL)	1037	1336
Tmax (h)	2.0	2.5
T <sub>1/2</sub> (h)	60.4	69.3
Ke (1/h)	0.012	0.010



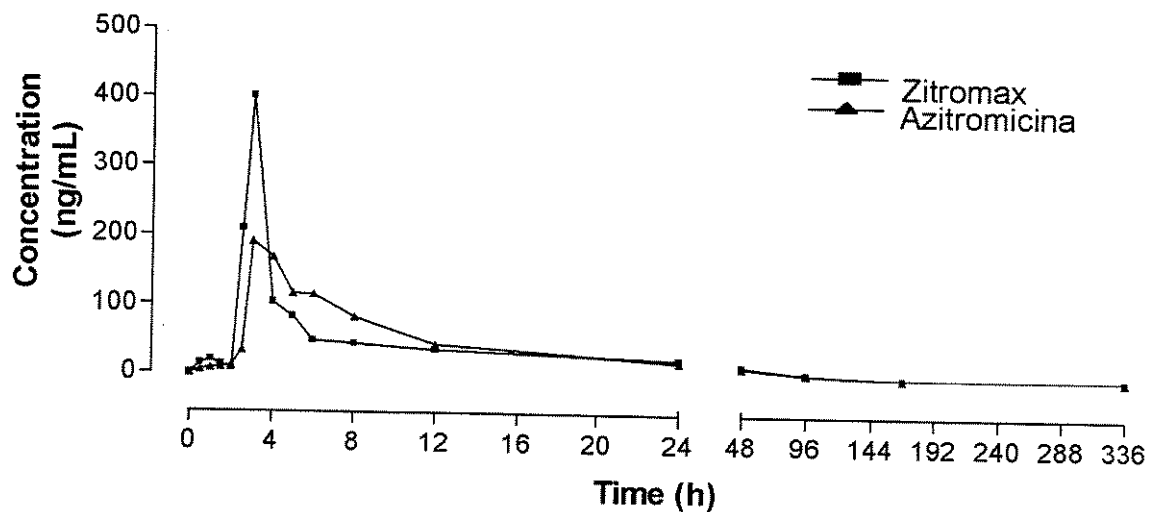
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	96
AUC last ([ng * h]/mL)	2430	3133
AUC last paired ([ng * h]/mL)	2430	3133
AUC Inf ([ng * h]/mL)	2771	3569
AUC last / Inf (%)	87.7	87.8
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	2649	3435
AUCall (0-336h) / Inf (%)	95.6	96.3
Cmax (ng /mL)	368	364
Tmax (h)	3.0	3.0
T <sub>1/2</sub> (h)	38.8	36.0
Ke (1/h)	0.018	0.019



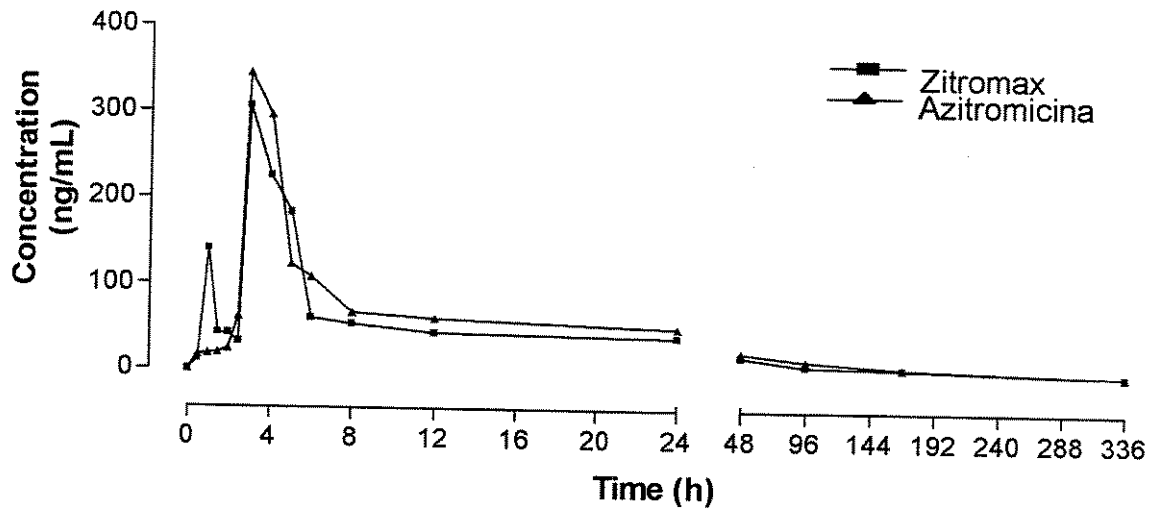
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	48	96
AUC last ([ng * h]/mL)	2646	3057
AUC last paired ([ng * h]/mL)	2646	2562
AUC Inf ([ng * h]/mL)	3026	3403
AUC last / Inf (%)	87.4	89.8
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	3084	3293
AUCall (0-336h) / Inf (%)	101.9	96.8
Cmax (ng /mL)	292	280
Tmax (h)	2.0	1.5
T <sub>1/2</sub> (h)	14.4	36.5
Ke (1/h)	0.048	0.019



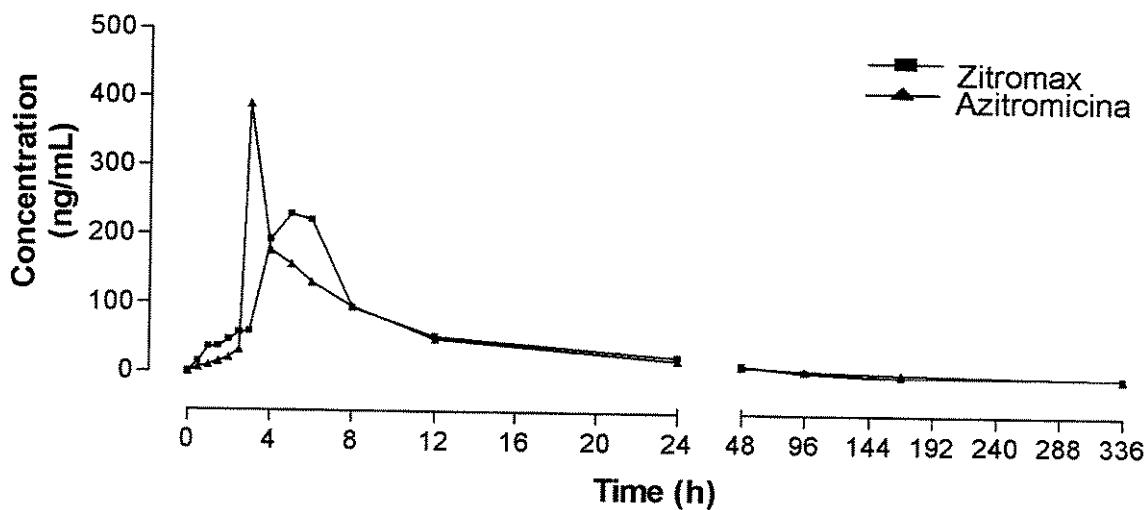
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	168	168
AUC last ([ng * h]/mL)	4008	4557
AUC last paired ([ng * h]/mL)	4008	4557
AUC Inf ([ng * h]/mL)	4473	5011
AUC last / Inf (%)	89.6	90.9
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	4430	5056
AUCall (0-336h) / Inf (%)	99.0	100.9
Cmax (ng /mL)	703	676
Tmax (h)	2.5	2.5
T <sub>1/2</sub> (h)	64.1	52.9
Ke (1/h)	0.011	0.013



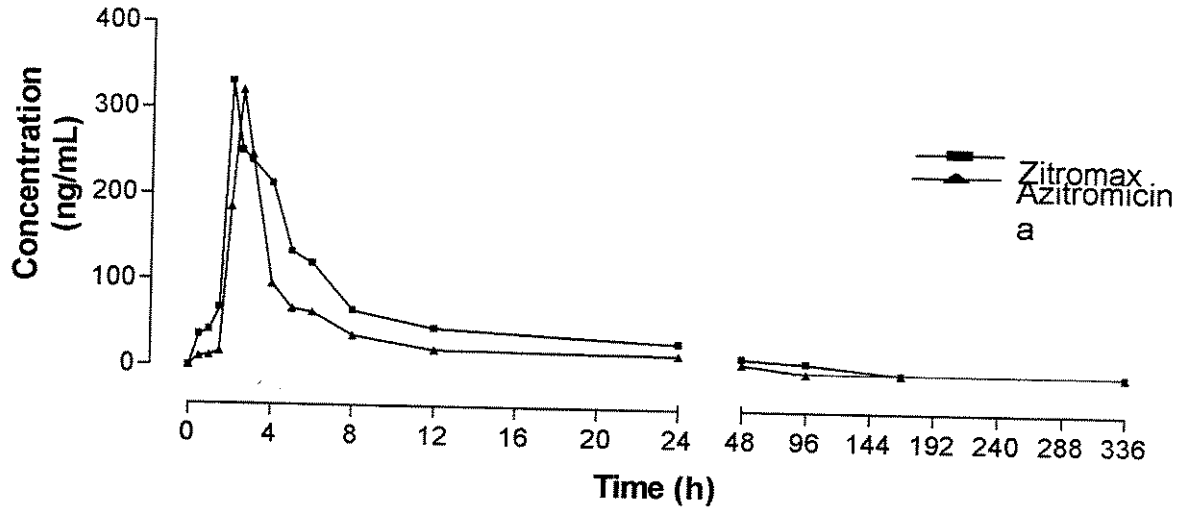
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	96
AUC last ([ng * h]/mL)	2270	2273
AUC last paired ([ng * h]/mL)	2270	2273
AUC Inf ([ng * h]/mL)	2556	2605
AUC last / Inf (%)	88.8	87.3
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	2477	2484
AUCall (0-336h) / Inf (%)	97.0	95.4
Cmax (ng /mL)	401	191
Tmax (h)	3.0	3.0
T <sub>1/2</sub> (h)	34.3	39.2
Ke (1/h)	0.020	0.018



	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	168	168
AUC last ([ng * h]/mL)	3584	4576
AUC last paired ([ng * h]/mL)	3584	4576
AUC Inf ([ng * h]/mL)	4085	5378
AUC last / Inf (%)	87.7	85.1
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	4168	5218
AUCall (0-336h) / Inf (%)	102.0	97.0
Cmax (ng /mL)	306	345
Tmax (h)	3.0	3.0
T <sub>1/2</sub> (h)	49.9	72.7
Ke (1/h)	0.014	0.010

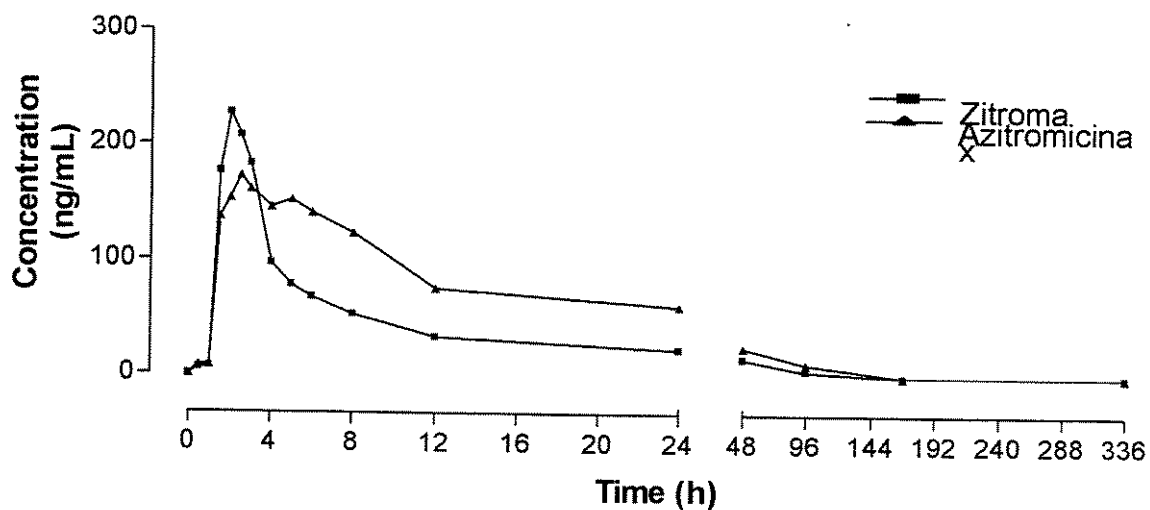


	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	168
AUC last ([ng * h]/mL)	2790	3187
AUC last paired ([ng * h]/mL)	2790	2671
AUC Inf ([ng * h]/mL)	3170	3803
AUC last / Inf (%)	88.0	83.8
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	3038	3618
AUCall (0-336h) / Inf (%)	95.9	95.2
Cmax (ng/mL)	229	390
Tmax (h)	5.0	3.0
T <sub>1/2</sub> (h)	38.1	83.1
Ke (1/h)	0.018	0.008

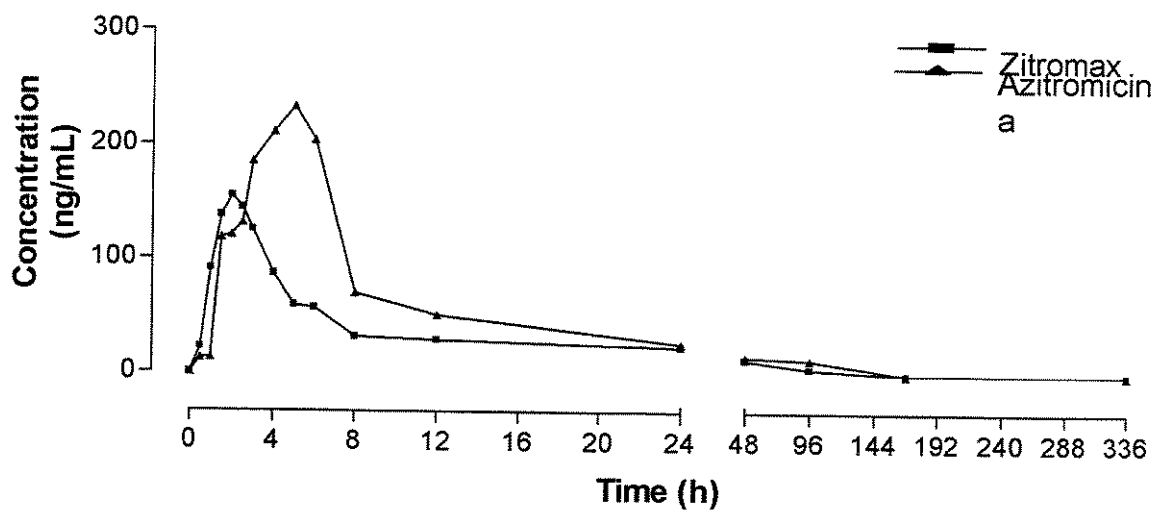


	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	48
AUC last ([ng * h]/mL)	3063	1442
AUC last paired ([ng * h]/mL)	2392	1442
AUC Inf ([ng * h]/mL)	3819	1879
AUC last / Inf (%)	80.2	76.8
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	3486	1674
AUCall (0-336h) / Inf (%)	91.3	89.2
Cmax (ng /mL)	331	321
Tmax (h)	2.0	2.5
T <sub>1/2</sub> (h)	44.5	31.2
Ke (1/h)	0.016	0.022

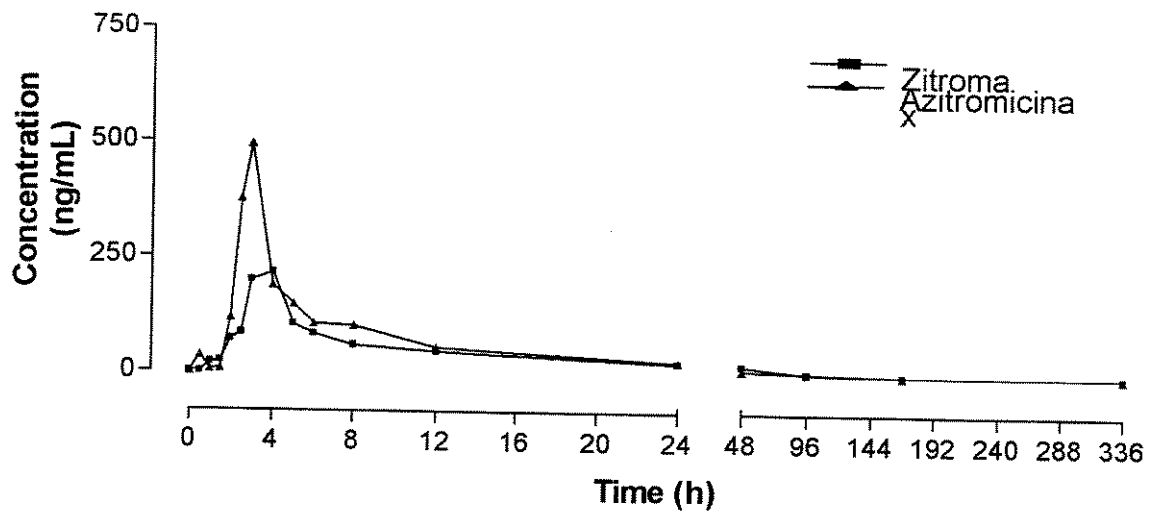




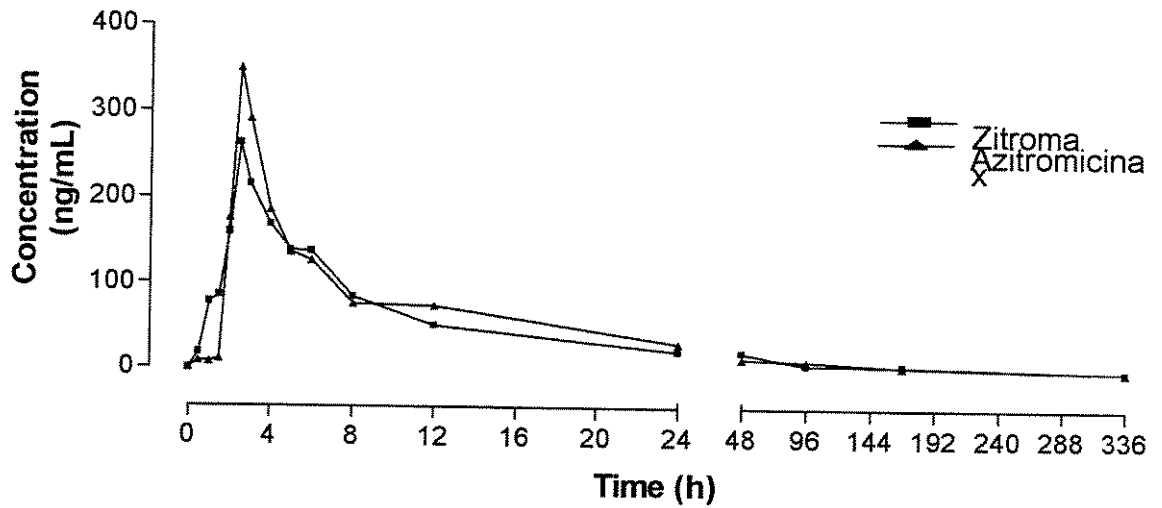
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	96
AUC last ([ng * h]/mL)	2250	4120
AUC last paired ([ng * h]/mL)	2250	4120
AUC Inf ([ng * h]/mL)	2480	4617
AUC last / Inf (%)	90.7	89.2
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	2432	4530
AUCall (0-336h) / Inf (%)	98.1	98.1
Cmax (ng /mL)	227	172
Tmax (h)	2.0	2.5
T <sub>1/2</sub> (h)	31.5	30.2
Ke (1/h)	0.022	0.023



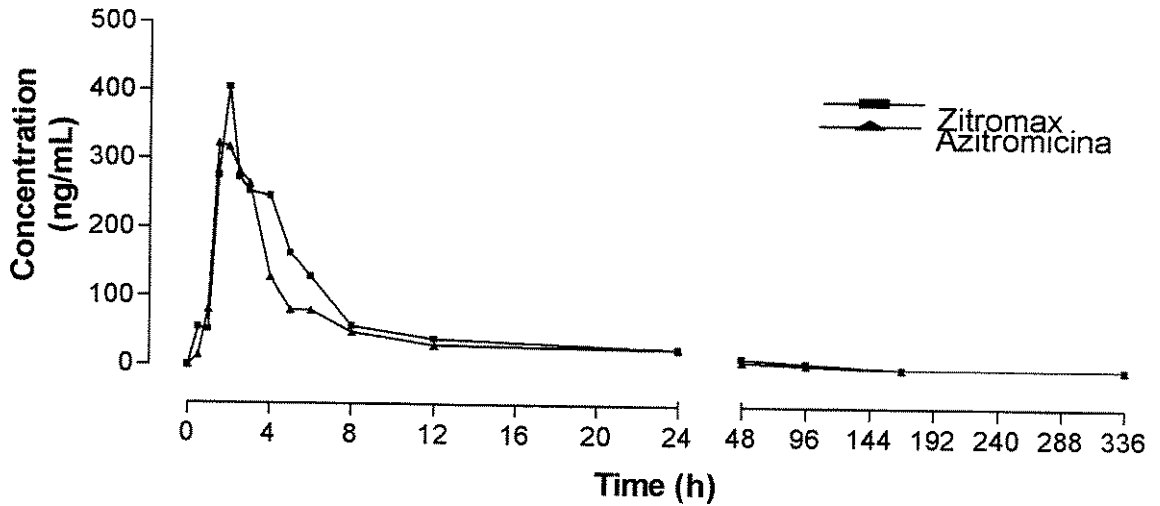
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	96
AUC last ([ng * h]/mL)	1918	3030
AUC last paired ([ng * h]/mL)	1918	3030
AUC Inf ([ng * h]/mL)	2171	3766
AUC last / Inf (%)	88.3	80.4
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	2106	3498
AUCall (0-336h) / Inf (%)	97.0	92.9
Cmax (ng/mL)	155	234
Tmax (h)	2.0	5.0
T <sub>1/2</sub> (h)	33.5	39.2
Ke (1/h)	0.021	0.018



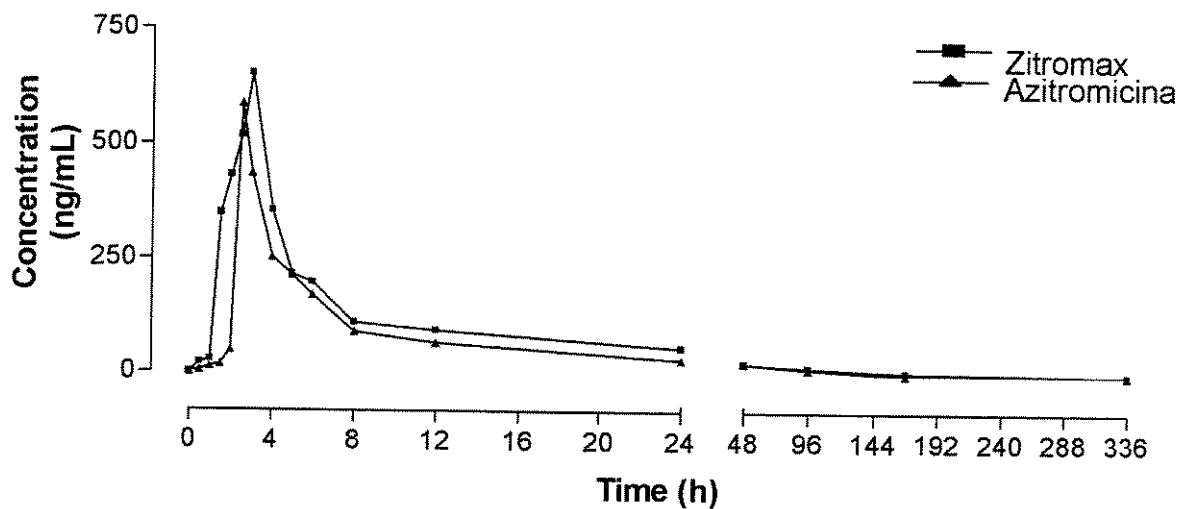
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	96
AUC last ([ng * h]/mL)	2515	2918
AUC last paired ([ng * h]/mL)	2515	2918
AUC Inf ([ng * h]/mL)	2707	3126
AUC last / Inf (%)	92.9	93.3
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	2696	3164
AUCall (0-336h) / Inf (%)	99.6	101.2
Cmax (ng /mL)	215	495
Tmax (h)	4.0	3.0
T <sub>1/2</sub> (h)	26.5	21.1
Ke (1/h)	0.026	0.033



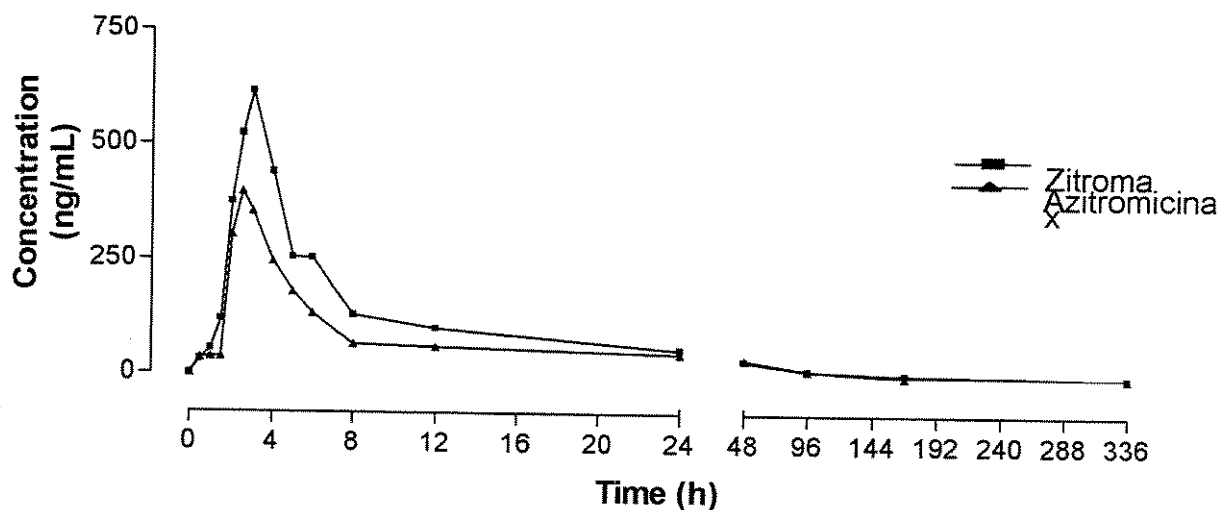
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	168	168
AUC last ([ng * h]/mL)	3475	3809
AUC last paired ([ng * h]/mL)	3475	3809
AUC Inf ([ng * h]/mL)	4026	4615
AUC last / Inf (%)	86.3	82.5
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	4031	4304
AUCall (0-336h) / Inf (%)	100.1	93.3
Cmax (ng /mL)	263	350
Tmax (h)	2.5	2.5
T <sub>1/2</sub> (h)	57.6	94.6
Ke (1/h)	0.012	0.007



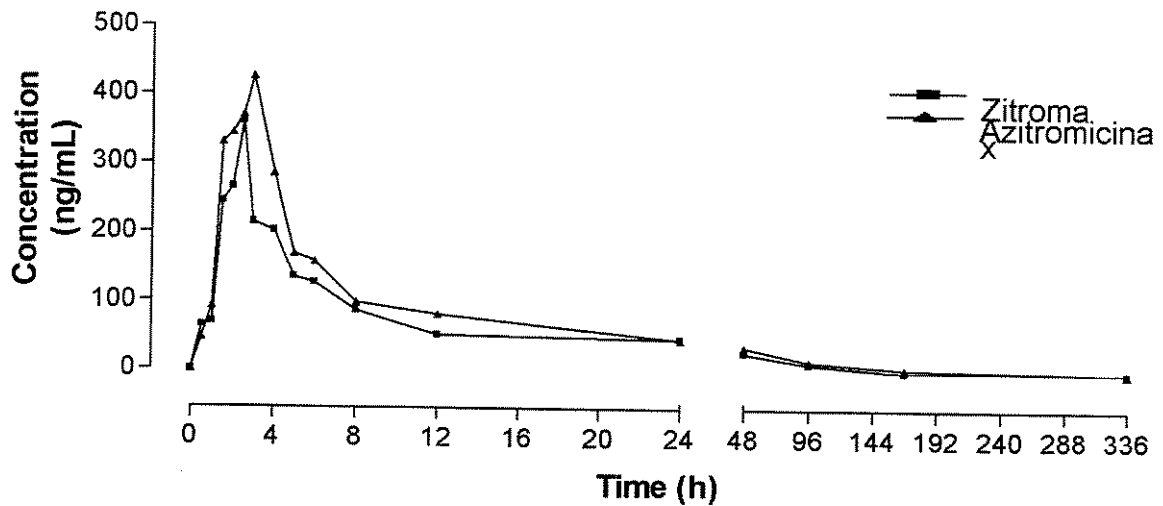
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	96
AUC last ([ng * h]/mL)	2985	2386
AUC last paired ([ng * h]/mL)	2985	2386
AUC Inf ([ng * h]/mL)	3493	2647
AUC last / Inf (%)	85.4	90.1
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	3299	2599
AUCall (0-336h) / Inf (%)	94.5	98.2
Cmax (ng /mL)	405	322
Tmax (h)	2.0	1.5
T <sub>1/2</sub> (h)	40.3	30.5
Ke (1/h)	0.017	0.023



	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	168	96
AUC last ([ng * h]/mL)	6116	3891
AUC last paired ([ng * h]/mL)	5350	3891
AUC Inf ([ng * h]/mL)	6585	4796
AUC last / Inf (%)	92.9	81.1
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	6591	4322
AUCall (0-336h) / Inf (%)	100.1	90.1
Cmax (ng /mL)	652	588
Tmax (h)	3.0	2.5
T <sub>1/2</sub> (h)	57.4	52.3
Ke (1/h)	0.012	0.013

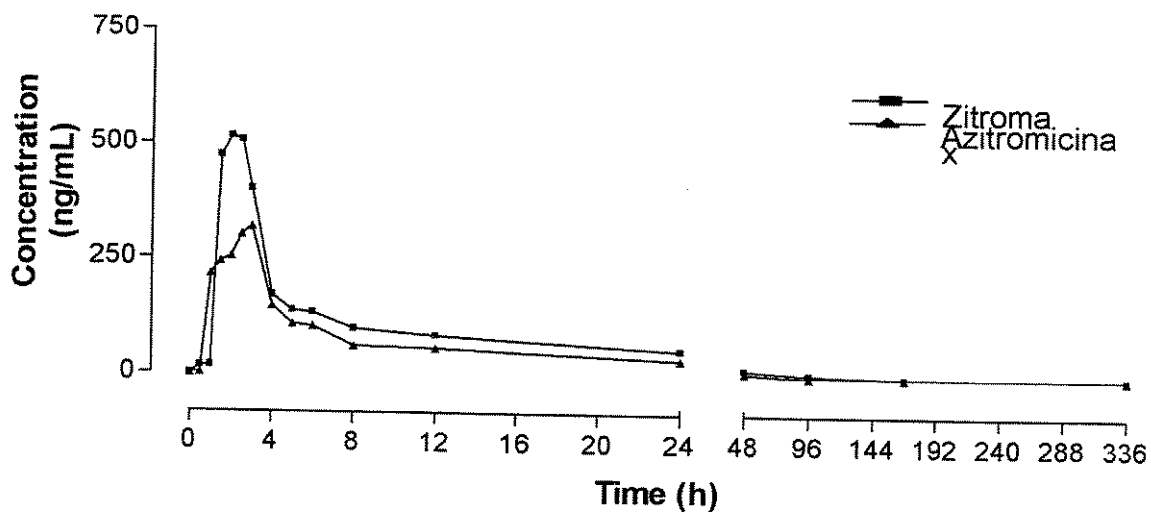


	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	168	96
AUC last ([ng * h]/mL)	6386	4444
AUC last paired ([ng * h]/mL)	5718	4444
AUC Inf ([ng * h]/mL)	6768	5246
AUC last / Inf (%)	94.4	84.7
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	6879	4942
AUCall (0-336h) / Inf (%)	101.6	94.2
Cmax (ng /mL)	615	398
Tmax (h)	3.0	2.5
T <sub>1/2</sub> (h)	45.1	40.2
Ke (1/h)	0.015	0.017

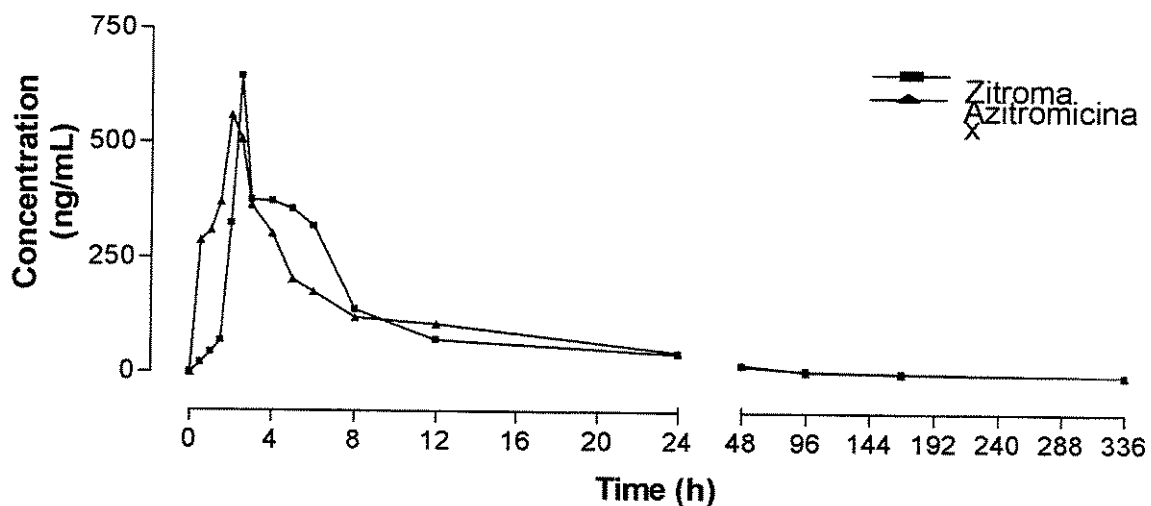


	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	168
AUC last ([ng * h]/mL)	3955	5800
AUC last paired ([ng * h]/mL)	3955	5043
AUC Inf ([ng * h]/mL)	4598	6132
AUC last / Inf (%)	86.0	94.6
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	4377	6244
AUCall (0-336h) / Inf (%)	95.2	101.8
Cmax (ng /mL)	359	426
Tmax (h)	2.5	3.0
T <sub>1/2</sub> (h)	38.0	43.5
Ke (1/h)	0.018	0.016

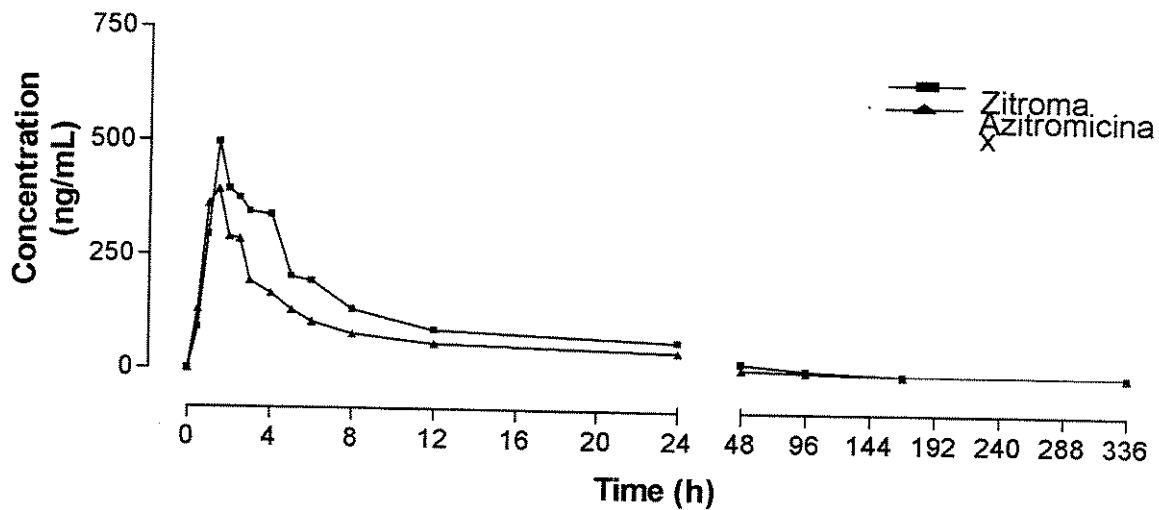




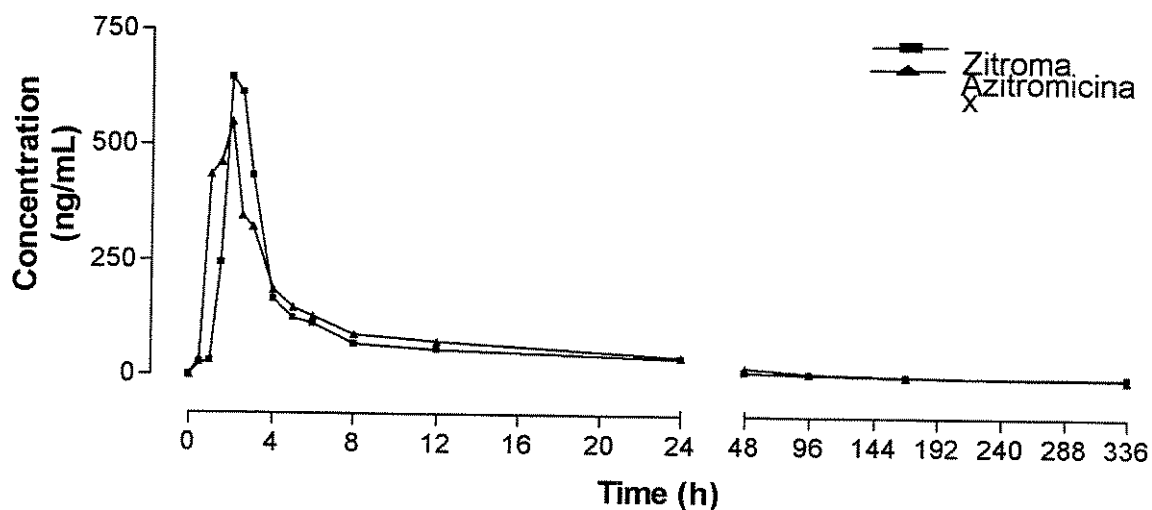
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	48
AUC last ([ng * h]/mL)	4278	2555
AUC last paired ([ng * h]/mL)	3749	2555
AUC Inf ([ng * h]/mL)	4460	2713
AUC last / Inf (%)	95.9	94.2
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	4504	2760
AUCall (0-336h) / Inf (%)	101.0	101.7
Cmax (ng /mL)	516	318
Tmax (h)	2.0	3.0
T <sub>1/2</sub> (h)	20.1	12.8
Ke (1/h)	0.035	0.054



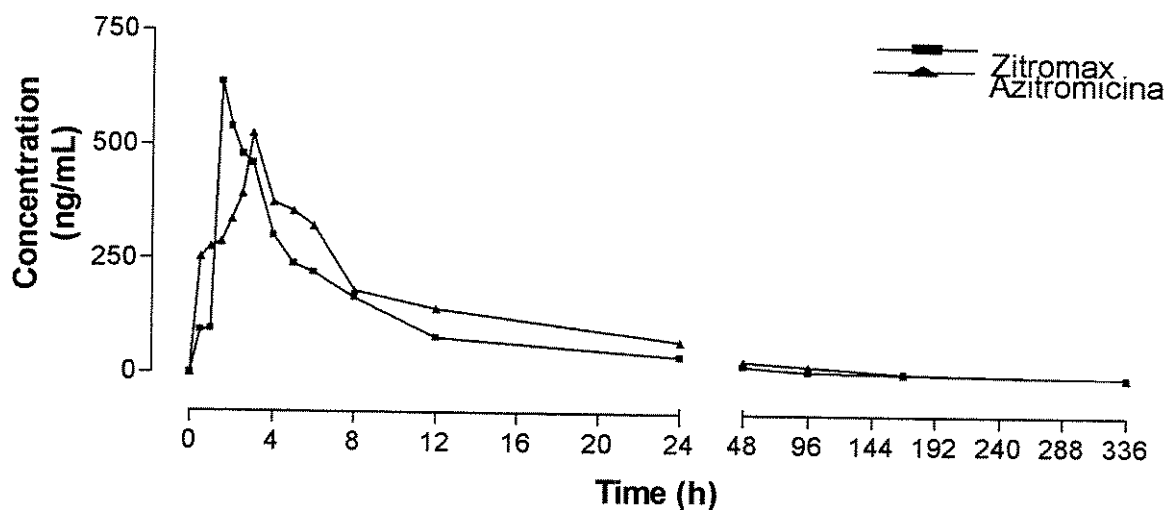
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	168	168
AUC last ([ng * h]/mL)	5291	5620
AUC last paired ([ng * h]/mL)	5291	5620
AUC Inf ([ng * h]/mL)	5873	5955
AUC last / Inf (%)	90.1	94.4
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	5770	6044
AUCall (0-336h) / Inf (%)	98.2	101.5
Cmax (ng /mL)	645	560
Tmax (h)	2.5	2.0
T <sub>1/2</sub> (h)	70.7	46.0
Ke (1/h)	0.010	0.015



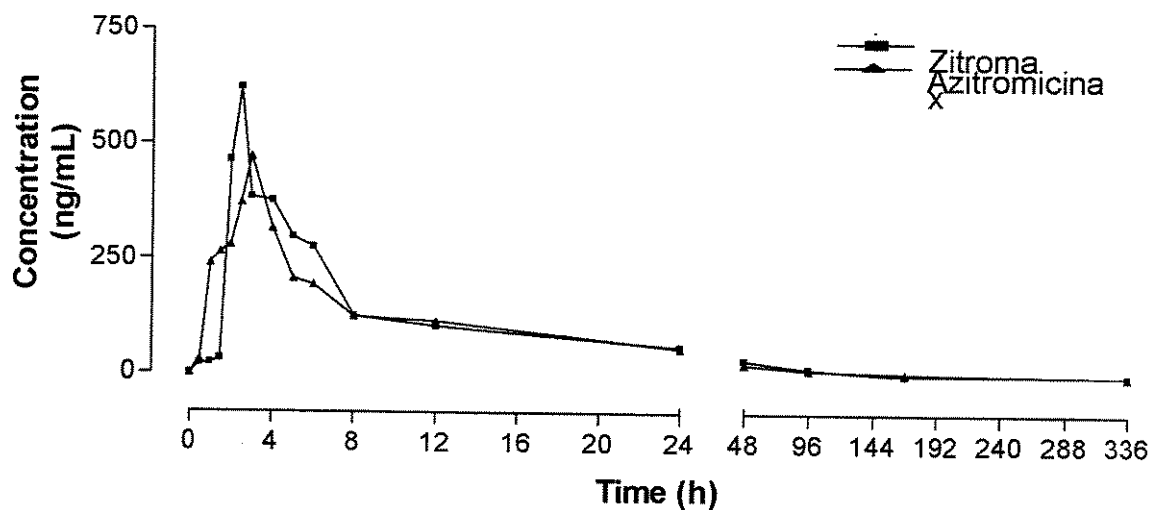
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	96
AUC last ([ng * h]/mL)	5293	3360
AUC last paired ([ng * h]/mL)	5293	3360
AUC Inf ([ng * h]/mL)	5667	3558
AUC last / Inf (%)	93.4	94.4
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	5649	3592
AUCall (0-336h) / Inf (%)	99.7	101.0
Cmax (ng /mL)	497	394
Tmax (h)	1.5	1.5
T <sub>1/2</sub> (h)	26.2	21.2
Ke (1/h)	0.027	0.033



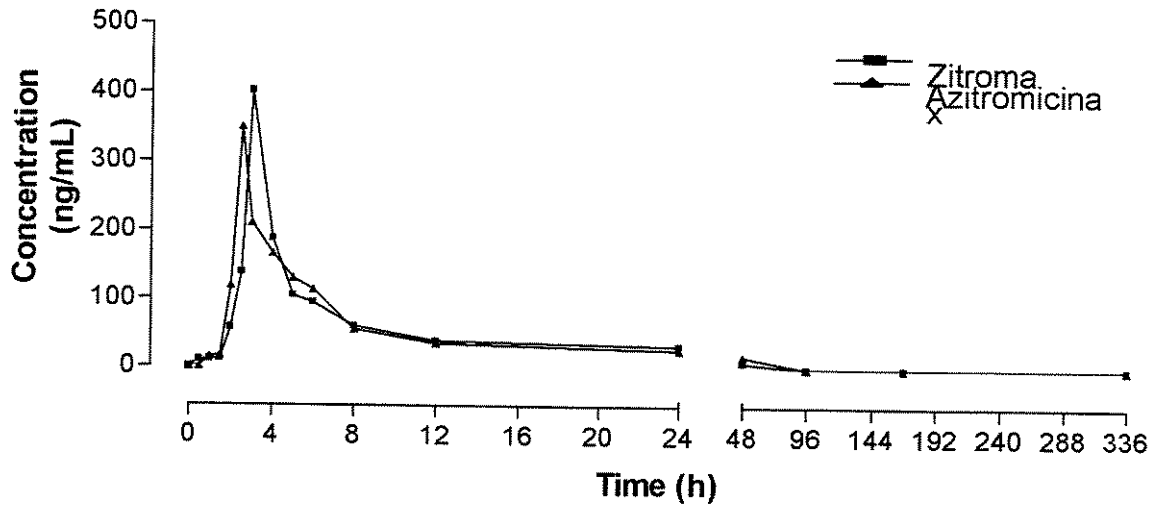
	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	336	168
AUC last ([ng * h]/mL)	5171	5127
AUC last paired ([ng * h]/mL)	4262	5127
AUC Inf ([ng * h]/mL)	6691	5716
AUC last / Inf (%)	77.3	89.7
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	5171	5656
AUCall (0-336h) / Inf (%)	77.3	98.9
Cmax (ng /mL)	646	549
Tmax (h)	2.0	2.0
T <sub>1/2</sub> (h)	209.6	64.9
Ke (1/h)	0.003	0.011



	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	168	168
AUC last ([ng * h]/mL)	5698	8223
AUC last paired ([ng * h]/mL)	5698	8223
AUC Inf ([ng * h]/mL)	6453	8955
AUC last / Inf (%)	88.3	91.8
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	6370	8926
AUCall (0-336h) / Inf (%)	98.7	99.7
Cmax (ng /mL)	637	525
Tmax (h)	1.5	3.0
T <sub>1/2</sub> (h)	65.4	60.6
Ke (1/h)	0.011	0.011



	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	96	168
AUC last ([ng * h]/mL)	5795	5951
AUC last paired ([ng * h]/mL)	5795	5266
AUC Inf ([ng * h]/mL)	6581	6537
AUC last / Inf (%)	88.1	91.0
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	6332	6486
AUCall (0-336h) / Inf (%)	96.2	99.2
Cmax (ng /mL)	622	473
Tmax (h)	2.5	3.0
T <sub>1/2</sub> (h)	36.5	63.8
Ke (1/h)	0.019	0.011



	Azithromycin	
	Zitromax	Azitromicina
T last (h)	48	48
AUC last ([ng * h]/mL)	2035	2021
AUC last paired ([ng * h]/mL)	2035	2021
AUC Inf ([ng * h]/mL)	2218	2983
AUC last / Inf (%)	91.8	67.8
AUC all (0-336h) ([ng * h]/mL)	2238	2450
AUCall (0-336h) / Inf (%)	100.9	82.1
Cmax (ng /mL)	402	350
Tmax (h)	3.0	2.5
T <sub>1/2</sub> (h)	15.0	37.3
Ke (1/h)	0.046	0.019

### Concentrações plasmáticas individuais (tabela)

Subject	1		2		3		4	
	Zitromax	Azitromicina	Zitroma x	Azitromicina	Zitroma x	Azitromicina	Zitromax	Azitromicina
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	17.7	107.1	47.8	211.7	5.5	0.0	33.4	9.8
1	20.5	120.6	100.0	377.4	6.9	0.0	169.1	62.8
1.5	23.4	284.7	390.1	402.3	n.a	0.0	189.1	280.1
2	32.0	292.5	1036.7	702.8	9.1	0.0	292.4	224.4
2.5	119.3	161.5	738.1	1335.6	10.1	60.6	260.2	214.4
3	575.0	172.4	521.9	347.0	368.4	363.7	220.9	200.4
4	379.8	153.0	357.9	306.7	261.2	276.8	145.6	179.5
5	203.1	139.5	246.2	245.4	143.3	145.1	122.1	172.7
6	187.3	193.7	210.2	236.9	93.3	123.7	142.2	159.8
8	68.0	156.8	132.3	126.4	65.5	91.4	79.9	106.4
12	50.8	101.5	28.3	103.7	46.7	61.7	71.1	56.6
24	31.6	48.0	35.9	55.2	22.6	35.4	27.7	26.9
48	0.0	28.3	25.2	26.5	12.9	17.1	18.3	14.0
96	0.0	10.5	12.0	14.1	6.1	8.4	0.0	6.6
168	0.0	0.0	6.9	7.8	0.0	0.0	0.0	0.0
336	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	<b>5</b>		<b>6</b>		<b>7</b>		<b>8</b>	
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	10.7	117.3	14.1	5.1	11.2	16.8	15.2	7.3
1	13.8	215.8	19.5	7.8	140.4	18.6	36.3	10.5
1.5	15.3	268.8	13.1	9.6	42.3	19.4	37.3	15.4
2	118.5	295.6	6.9	11.4	42.1	24.3	47.0	21.3
2.5	702.6	675.7	208.9	34.2	32.3	61.6	57.5	32.8
3	325.3	455.2	401.2	190.8	306.4	344.9	59.7	390.2
4	278.5	313.8	103.6	168.5	225.2	296.0	192.7	176.8
5	163.9	171.5	82.9	116.3	183.0	123.0	229.4	157.1
6	132.0	123.0	48.2	114.9	60.7	108.7	220.9	131.3
8	64.3	94.8	44.7	83.3	53.9	67.1	94.6	96.2
12	59.0	47.5	36.2	44.0	44.4	60.8	53.3	50.0
24	31.3	28.9	24.3	20.7	40.7	51.2	26.1	21.7
48	18.6	23.9	16.1	14.5	18.9	24.0	15.3	14.0
96	10.2	8.3	5.8	5.9	9.0	15.2	6.9	9.2
168	5.0	6.0	0.0	0.0	7.0	7.7	0.0	5.1
336	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0



<b>Subject</b>	<b>9</b>		<b>10</b>		<b>11</b>		<b>12</b>	
<b>Hour</b>	Zitromax	Azitromi cina	Zitromax	Azitromi cina	Zitromax	Azitromi cina	Zitromax	Azitromi cina
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	35.2	10.7	5.4	8.0	21.8	12.6	0.0	35.5
1	41.2	12.0	6.9	8.2	90.7	13.1	20.2	5.9
1.5	67.2	16.5	176.2	137.2	137.8	118.1	24.3	7.7
2	330.9	184.7	227.2	153.1	154.8	120.7	70.8	118.0
2.5	250.4	320.8	207.0	172.5	144.5	131.5	84.2	375.0
3	239.6	246.2	182.7	160.9	125.4	185.4	198.4	494.7
4	212.6	96.2	97.2	145.8	86.5	211.3	215.3	187.5
5	133.3	67.3	78.2	152.2	58.8	233.5	104.3	147.9
6	119.8	63.3	67.6	140.8	56.4	203.9	83.8	106.0
8	65.7	36.8	53.0	123.2	31.6	69.8	59.1	102.0
12	45.6	21.1	33.6	75.5	29.0	50.7	46.7	55.2
24	31.6	18.4	23.2	60.6	23.2	26.3	24.1	26.8
48	16.2	9.7	15.5	25.3	12.5	15.0	19.9	10.8
96	11.8	0.0	5.1	11.4	5.2	13.0	5.0	6.8
168	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
336	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	<b>13</b>		<b>14</b>		<b>15</b>		<b>16</b>	
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	18.5	9.0	54.4	14.3	21.3	5.0	30.5	34.5
1	77.6	7.8	51.3	81.3	27.8	12.6	53.3	37.3
1.5	85.9	11.2	275.2	322.5	348.8	17.6	118.4	37.4
2	160.2	177.3	404.5	317.1	431.8	49.0	374.6	304.0
2.5	263.2	349.7	271.9	281.5	518.3	588.0	522.9	397.5
3	215.7	291.8	252.7	264.2	652.5	436.2	614.9	354.2
4	169.1	186.3	245.8	128.7	355.3	253.0	439.2	246.4
5	138.9	137.1	162.6	80.4	215.5	212.6	255.3	179.9
6	137.9	127.4	128.7	80.0	197.6	169.9	253.9	133.3
8	84.7	76.6	57.0	48.5	109.8	90.1	128.5	65.7
12	51.4	74.4	39.1	30.5	93.7	66.2	100.0	59.9
24	22.1	31.2	26.2	26.1	56.4	30.7	54.9	47.1
48	21.0	13.9	13.9	9.7	23.6	24.1	32.0	35.9
96	7.3	11.6	8.7	5.9	15.6	12.0	12.7	13.8
168	6.6	5.9	0.0	0.0	5.7	0.0	5.9	0.0
336	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

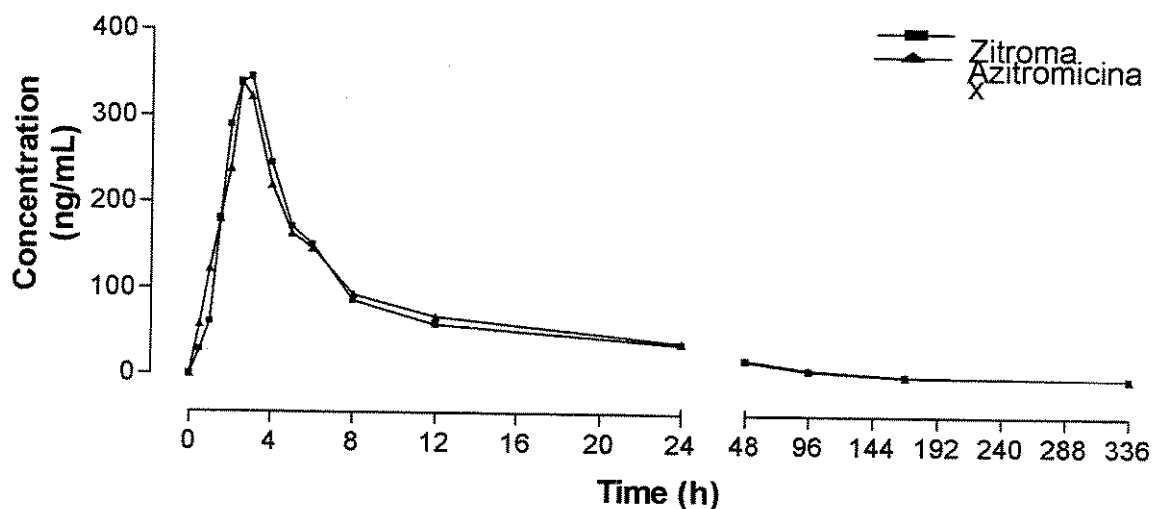
Subject	17		19		20		21	
Hour	Zitromax	Azitromi cina	Zitromax	Azitromi cina	Zitromax	Azitromi cina	Zitromax	Azitromi cina
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	64.1	46.8	16.5	2.3	20.2	286.9	89.0	130.0
1	69.4	92.7	17.4	215.9	44.1	309.2	294.8	361.9
1.5	244.2	330.4	474.1	241.7	69.8	371.2	496.7	393.8
2	264.9	344.2	516.0	253.8	324.9	559.6	394.8	290.2
2.5	359.2	369.9	508.2	302.0	645.4	507.4	376.0	284.9
3	214.2	426.1	400.1	317.9	375.3	364.4	345.4	193.4
4	202.0	285.2	170.4	147.5	372.7	303.3	339.4	165.5
5	135.2	169.2	137.8	108.5	356.0	204.0	203.0	129.8
6	127.3	157.9	133.4	104.4	319.4	176.5	193.7	103.8
8	86.8	98.8	99.5	62.3	138.2	121.5	131.9	78.1
12	51.6	81.7	84.8	58.0	73.2	108.3	87.6	58.6
24	46.5	45.4	56.0	35.7	44.0	47.3	66.7	44.6
48	27.0	36.0	15.8	8.6	19.1	22.4	23.4	10.4
96	11.7	15.7	6.3	0.0	9.4	8.1	9.9	6.5
168	0.0	5.3	0.0	0.0	5.7	5.0	0.0	0.0
336	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	<b>22</b>		<b>23</b>		<b>24</b>		<b>25</b>	
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	26.2	34.8	93.2	254.0	21.5	30.8	9.9	0.0
1	30.0	435.8	96.2	276.5	22.6	241.4	10.9	14.9
1.5	244.7	462.9	637.1	287.9	31.6	264.8	12.0	17.1
2	645.9	549.1	539.1	337.1	464.5	280.9	57.1	118.8
2.5	613.8	347.4	479.7	393.2	621.6	373.2	138.3	349.9
3	433.8	323.2	460.0	525.3	384.4	472.5	401.9	210.7
4	166.3	186.9	301.8	374.5	376.5	317.0	187.7	166.2
5	125.6	148.5	239.6	356.0	298.3	207.8	104.8	130.1
6	113.3	129.6	221.4	323.6	276.6	195.1	94.8	113.6
8	69.2	90.0	165.4	181.8	126.7	125.4	60.5	56.0
12	57.6	75.1	79.5	142.8	104.9	115.3	39.1	35.2
24	40.8	43.8	39.9	73.5	60.5	57.8	32.8	26.8
48	13.7	23.0	21.4	32.1	32.5	23.8	8.5	17.9
96	9.9	12.1	10.8	22.8	14.9	12.7	0.0	0.0
168	5.8	6.3	8.0	8.4	0.0	6.4	0.0	0.0
336	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

\* For statistical analysis, all 'not included' points were extrapolated. Zeros are true zeros or non-quantifiable quantity.

All "not included" points are outliers.

**Mean Azithromycin Concentration data vs. Time (Figure) and Pharmacokinetic Parameters (Table)**

**AZITHROMYCIN MEAN**



	Azithromycin					
	Zitromax			Azitromicina		
	Mean	SD	(Range)	Mean	SD	(Range)
AUClast([ng*h]/ml)	3800	1409		4044	1339	
AUClast paired ([ng*h]/ml)	3652	1294		3865	1321	
AUCINF([ng*h]/ml)	4293	1455		4578	1440	
AUCall(0-12h)([ng*h]/ml)	4239	1462		4455	1450	
Cmax(ng/ml)	459	216		431	250	
Tmax(h) (median)	2.5	1.5	5.0	2.5	1.5	5.0
T <sub>1/2</sub> (h)	47.2	14.4	209.6	46.3	12.8	94.6
Ke(1/h)	0.021	0.003	0.048	0.018	0.007	0.054

## *DISCUSSÕES*

Azitromicina é um antibiótico azalídeo usualmente utilizado no tratamento de infecções do trato respiratório inferior e superior.

A quantificação de azitromicina no plasma e no soro pode ser feita por vários métodos como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica (HPLC-ED).

Riedel et al (1992) usando método HPLC-ED para quantificar os níveis séricos humanos da azitromicina, obtiveram um LOQ de 8,0 ng/ml, mas o tempo de retenção foi de 5,8 min., além disso o método utilizou duas colunas diferentes e o tempo total de corrida foi de 12 minutos.

Outro estudo usando método semelhante foi utilizado para determinar a concentração plasmática humana de azitromicina, o LOQ foi de 10 ng/ml, e o tempo de retenção e o tempo total de corrida foi de 16,4 min. E 25 min., respectivamente.

Fouda e Schneider (1995) já haviam quantificado níveis séricos humanos de azitromicina usando LC\_MS, apesar do LOQ observado ser de 10 ng/ml e o método ser mais rápido, um padrão interno deuterado raramente disponível foi utilizado. O método foi linear apenas até 250 ng/ml.

Outro parâmetro importante para avaliação da bioequivalência é a concentração máxima atingida. Nesse estudo a razão da média geométrica  $C_{max}$  da formulação Azitromicina 500 mg foi 92,7% ( intervalo de confiança de 90%: 81,8% – 105,1%) da formulação Zitromax 500 mg. De acordo com o FDA a razão entre as  $C_{max}$  atingidas (teste/referência) deve estar dentro do intervalo de 80%–125%, o mesmo que aquele exigido para área sob a curva. Entretanto, pela “*The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*” (EMA) foi aumentado o intervalo proposto para 70%–143%. A razão para este aumento é que sabidamente a concentração máxima atingida apresenta uma variabilidade muito maior do que a área sob a curva, quer seja pela dificuldade de determinar corretamente a concentração máxima atingida (devido à limitação do número de amostras no período em que a mesma deve ocorrer), quer seja pela característica do fármaco quando apresenta alta eliminação hepática.

## ***CONCLUSÃO***

Uma vez que o intervalo de confiança de 90% obtido no estudo para a razão **C<sub>max</sub>** encontra-se dentro do intervalo de 80%-125% proposto pela FDA, a formulação Azitromicina 500 mg (EMS) é bioequivalente em relação ao Zitromax 500 mg para a taxa de absorção.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nahata MC, Koranyi KI, Luke DR, Foulds G., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, **39**, 1875-1877 (1995).
2. Riedel KD, Wildfeuer A, Laufen H, Zimmermann T., *Journal of Chromatography*; **576**, 358-362 (1992).
3. Fouda HG, Schneider RP., *Therapeutic Drug Monitoring.*, **17**, 179-183. (1995).
4. Zubata P, Ceresole R, Rosasco MA, Pizzorno MT., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, **27**, 833-836 (2002).
5. Luke DR, Foulds G., *Clinical Pharmacology and Therapeutics.*, **61**, 641-648 (1997).
6. Shepard RM, Duthu GS, Ferraina RA, Mullins MA., *Journal of Chromatography.*, **565**, 321-337 (1991).
7. Najib NM, Idkaidek N, Ghanem IE, Admour I, Alam SM, Zaman Q, Dham R., *Biopharmaceutics and Drug Disposition.*, **22**, 15-21 (2001).
8. Raines AD, Yusuf A, Jabak MJ, Ashmed WS, Karcioğlu ZA, El-Yazigi A., *Therapeutic Drug Monitoring.*, **20**, 680-684 (1998).
9. Food and Drug Administration, *Federal Registry.*, 63 (1998) 64222.
10. BRASIL. Lei 9.787, de 10 fevereiro 1999. Altera a Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências, regulamentada pela Resolução 391, 9 ag. 1999. Diário Oficial, Brasília, n.152, 10 ag. 1999.

## 1. Calibration Curve

To define the relationship between concentration and response a calibration curve containing 9 none zero standards were prepared. The specific values were adjusted in subsequent tests, including first real sample quantification, taking into account the method sensitivity and the anticipated range of analytical values.

The following subsections present the procedures followed to determine the involved parameters as well as validation criteria and results.

### Determination of the Limit of Quantification

Limit of Quantification were defined taking into account the method sensibility and also precision and accuracy. Three low concentration values, around the anticipated LOQ, were tested with duplicate analytes included in the curve. To evaluate precision and accuracy, specific quality control samples were also included in the validation procedure. Measures were taken to guarantee that the lowest possible value was evaluated, by repeating tests with even lower values if the initially chosen values were all easily approved.

The following criteria were met to approve the final value:

- No interference present in blanks at the retention time of the analyte or a response 5 times greater than any interference in blanks at that retention time;
- Analyte peak identifiable, discrete and with a precision of 20% in relation to the nominal standard concentration.
- Accuracy calculated among duplicate standards between 80% - 120%;
- LOQ Quality Control pair with the same nominal concentration as the one in consideration, meeting the above mentioned criteria for precision and accuracy.

As so, the LOQ validated under the condition found during the pre-study validation was of 5 ng/mL. This value should be also validated for each in-study analytical run. Specific data is presented in Table 1.



	<b>Validation List ID</b>	<b>V01</b>
	<b>Sample Code</b>	<b>QL1</b>
<b>Sample ID</b>	<b>Quantified Concentration</b>	<b>Individual Precision</b>
35	5,47	09.47
36	5,25	04.93
37	4,85	07.10
38	4,93	08.53
39	4,66	03.28
40	5,36	07.28
41	5,55	10.91
42	5,68	13.68
	<b>Mean</b>	<b>5.22</b>
	<b>CV</b>	<b>7.00</b>

• Table 1 – LOQ validation data

### Linearity

Calibration Curve linearity was developed in order to meet the following criteria:

- < 20% deviation from nominal concentration at the LOQ, for at least one of the duplicates;
- < 15% deviation of standards other than LOQ from nominal concentrations for at least one of the duplicates;
- at least four out of six non-zero standards of each nominal concentration meeting the above criteria, including the LOQ and the calibration standard at the highest concentration.
- 0.95 or greater correlation coefficient (r)

Specific data is presented on Table 15, as well as the regression curve on Figure 3.

Smpl #	Standard Description	Nominal Concentration	Quantified Concentration	Analyte Approved?	Concentration Approved?
13	Azithromycin	5.0	5.00	Yes	Yes
14			5.04	Yes	
15	Azithromycin	7.0	6.54	Yes	Yes
16			20.25	No	
17	Azithromycin	10.0	11.15	Yes	Yes
18			11.03	Yes	
19	Azithromycin	20.0	17.98	Yes	Yes
20			18.58	Yes	
21	Azithromycin	50.0	51.31	Yes	Yes
22			48.95	Yes	
23	Azithromycin	100.0	98.98	Yes	Yes
24			108.35	Yes	
25	Azithromycin	200.0	191.95	Yes	Yes
26			205.06	Yes	
27	Azithromycin	500.0	493.30	Yes	Yes
28			452.94	Yes	
29	Azithromycin	1000.0	1005.07	Yes	Yes
30			1040.92	Yes	
31	Azithromycin	2000.0	1974.90	Yes	Yes
32			2099.17	Yes	
33	Azithromycin	3000.0	2924.85	Yes	Yes
34			2986.40	Yes	
Correlation Coefficient:				0.999491	

• Table 2 – Calibration Curve Validation Data

List R01

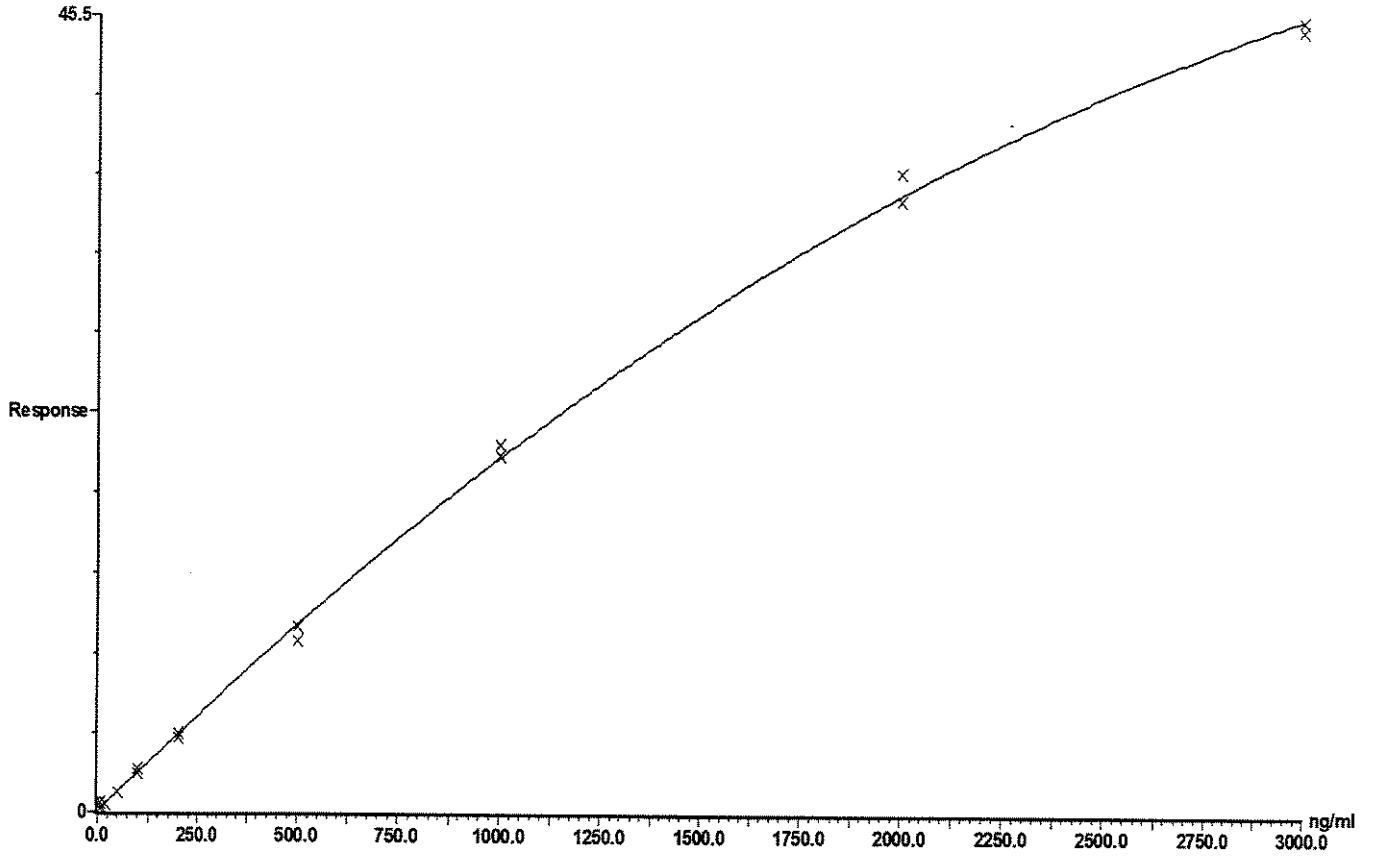
Compound 2 name: AZITROMICINA

Coefficient of Determination: 0.999294

Calibration curve:  $-2.48773e-6 * x^2 + 0.0226049 * x + 0.0343254$

Response type: Internal Std ( Ref 1 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )

Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



• Figure 1 – Calibration Curve Linearity

## 2. Specificity

To test the specificity, blank samples of human plasma were obtained from six individuals under the following conditions:

Indiv	Description	Source	Lot #
1	Normal Human Plasma	Sao Paulo University Hospital	lot-plasma pool
2	Normal Human Plasma	Sao Paulo University Hospital	lot-plasma pool
3	Normal Human Plasma	Sao Paulo University Hospital	lot-plasma pool
4	Normal Human Plasma	Sao Paulo University Hospital	lot-plasma pool
5	Hyperlipemic Human Plasma	Sao Paulo University Hospital	lot-gdn
6	Haemolized Human Plasma	Sao Paulo University Hospital	lot-gdn

• Table 3 - Matrix

## 3. Instrument Settings

Acquisition Experiment Report  
File:n:\new projects\6600.pro\data\6600l0508.raw

Header  
Acquired File Name: 6600L0508  
Acquired Date: 02-Mar-2001  
Acquired Time: 06:53:46  
Job code: 6600L02  
Task code:  
User Name: Administrator  
Laboratory Name: Lab  
Instrument: Inst  
Conditions:  
Submitter:  
SampleID:

Bottle Number: 71  
Description: QCC- 2500ng/ml

Instrument Calibration  
Parameters

MS1 Static:

Mass 18 Da to 1976 Da.

Resolution : 15.0/15.0

Ion Energy : 0.1

Reference File : NAICS

Acquisition File : STATMS1

MS1 Scanning:

Mass 20 Da to 2000 Da.

Resolution : 15.0/15.0

Ion Energy : 0.1

Reference File : NAICS

Acquisition File : SCNMS1

MS1 Scan Speed:

Scan 99 to 495 amu/sec.

Resolution : 15.0/15.0

Ion Energy : 0.1

Reference File : NAICS

Acquisition File : FASTMS1

MS2 Static:

Mass 18 Da to 1976 Da.

Resolution : 15.0/15.0

Ion Energy : 0.8

Reference File : NAICS

Acquisition File : STATMS2

MS2 Scanning:

Mass 20 Da to 2000 Da.

Resolution : 15.0/15.0

Ion Energy : 0.8

Reference File : NAICS

Acquisition File : SCNMS2

MS2 Scan Speed:

Scan 99 to 495 amu/sec.

Resolution : 15.0/15.0

Ion Energy : 0.8

Reference File : NAICS

Acquisition File : FASTMS2

Calibration Time: 15:10

Calibration Date: 01/15/98

Coefficients

MS1 Static:  $-0.000000151515*x^2 + 1.001003035443*x + -0.361354841764$

MS2 Static:  $-0.000000314536*x^2 + 1.001356659064*x + -0.463133593384$

Function 1: None

Instrument ID: OCP -v3.1\_4 -QUAT2 4000

Tuning Parameters: ES+

Source Page (ESI)

Capillary: 4.50 kVolts

HV Lens: 0.70 kVolts

Cone: 25 Volts

Skimmer Offset: 5 Volts

Skimmer: 2.0 Volts

RF Lens: 0.6 Volts

Source Temp: 100 oC

MS1

Ion Energy: 2.0 Volts

Ion Energy Ramp: 5.5 Volts

LM Resolution: 10.0

HM Resolution: 10.0

Lens 5: 100 Volts

Lens 6: 5 Volts

Multiplier 1: 850 Volts

MS2

Ion Energy: 2.0 Volts

Ion Energy Ramp: 0.0 Volts

LM Resolution: 15.0

HM Resolution: 15.0

Lens 7: 250 Volts

Lens 8: 40 Volts

Lens 9: 0 Volts

Multiplier: 850 Volts

Pressures

Analyser Vacuum:  $2.7e-5$  mBar

Gas Cell:  $9.9e-4$  mBar

Acquisition Threshold

SIR or MRM Data

Baseline level: 1.0

General

Ion count threshold: 0

Prescan Statistics

Zero Level: 29

ADC zero: 70.09

ADC standard deviation: 1.91

Acquisition Threshold MS2

SIR or MRM Data

Baseline level: 1.0

General

Ion count threshold: 0

Prescan Statistics

Zero Level: 19

ADC zero: 60.23

ADC standard deviation: 1.18

ACE Experimental Record

----- Run method parameters -----

HP1100 LC Pump Initial Conditions

Solvents

A% 100.0

B% 0.0

C% 0.0

D% 0.0

Flow (ml/min) 0.800

Stop Time (mins) 6.0

Min Pressure (bar) 0

Max Pressure (bar) 400

Oven Temperature Left(°C) 40.0

Oven Temperature Right(°C) 40.0

HP1100 LC Pump Gradient Timetable

No Entries in the gradient Timetable.

HP1100 LC Pump External Event Timetable

The Timetable contains 4 entries which are :

Time	Column	Switch	Contact 1	Contact 2	Contact 3	Contact 4
Initial	Off	Off	Off	Off	Off	
0.00	Off	Off	On	Off	On	
0.10	On	On	Off	Off	Off	
5.00	On	On	Off	Off	Off	

#### HP1100 Autosampler Initial Conditions

Injection Volume(μl) 20.0  
 Draw Speed 200.0  
 Eject Speed (μl/min) 200  
 Draw Position (mm) 0.00  
 Stop Time (mins) 3.50  
 Vial Number 71  
 Thermostat On  
 Thermostat Temperature(°C) 5.0

----- oOo -----

End of experimental record.

Solvent Delay

None

Function 1

Scans in function: 337

Cycle time (secs): 0.530

Inter Channel delay (secs):0.00

Retention window (mins): 0.000 to 6.000

Ionization mode: ES+

Data type: SIR or MRM data

Function type: MRM of 2 channels

Chan Reaction Dwell(secs) Cone Volt. Col.Energy

1 : 749.50 > 157.60 0.50 35.0 40.0

2 : 837.90 > 157.80 0.50 25.0 25.0