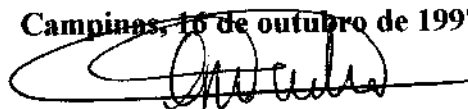


Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia da Farmacêutica Bioquímica Pamela Liliana Molina González Bento.

Campinas, 16 de outubro de 1997

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gilberto de Nucci', written over a horizontal line.

**Prof. Dr. Gilberto de Nucci
- Orientador -**

PAMELA LILIANA MOLINA GONZÁLEZ BENTO

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE TRÊS
FORMULAÇÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM
VOLUNTÁRIOS SADIOS**

***CAMPINAS
1997***

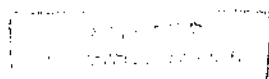
PAMELA LILIANA MOLINA GONZÁLEZ BENTO

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE TRÊS
FORMULAÇÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM
VOLUNTÁRIOS SADIOS**

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia, da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências, na área de Farmacologia.*

Orientador: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

**CAMPINAS
1997**



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	B446e
V.	Ex.
TOMBO BC/	32367
PROC.	281/97
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	03/12/97
N.º CPD	

CM-00103385-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B446e Bento, Pamela Liliana Molina Gonzalez
Estudo de bioequivalência de três formulações de ácido ascórbico em voluntários sadios / Pamela Liliana Molina Gonzalez Bento. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador : Gilberto de Nucci
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Medicamentos - biodisponibilidade. 3. Vitamina C. I. Gilberto de Nucci. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

1. Prof. Dr. Gilberto de Nucci

2. Prof. Dr. Seizi Oga

3. Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

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

Data: 15/10/97

*À minha madrinha Mireya,
pelo seu exemplo de profissionalismo e de
amor à família.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Liliana González e Javier Molina e ao meu irmão Fernando pelo estímulo, apoio e carinho.

Ao meu marido Paulo, pelo amor, companheirismo e paciência nos momentos de definições.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pela oportunidade, orientação e confiança depositada.

Aos amigos Cláudia Franklin, Maria Lúcia Martins, Simone Teixeira, Luciana Nathan e Marcos Pierossi, pelo companheirismo.

A Anicleto Poli, Leonardo Moraes, Marcelo Muscará e Wellington Ribeiro, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos demais amigos do departamento de Farmacologia, pela amizade.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Ao Stephen, pelo auxílio profissional e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, principalmente à Gislaine, à Maria das Dores Ponciano, à Solange, à Rita e ao Adilson.

À FAPESP, pela concessão de bolsa de mestrado.

A Deus pela vida e pelo felicidade de alcançar metas no caminho de minha realização pessoal.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	<i>ii</i>
CAPÍTULO I - Biodisponibilidade e Bioequivalência.....	
1. Introdução Geral.....	2
1. 1. Biodisponibilidade.....	7
1. 1. 1. Bioequivalência.....	9
1. 1. 2. Variabilidade individual.....	10
1.2. Forma Farmacêutica de Ação Prolongada.....	12
1. 2. 1. Preparação de formas orais de ação prolongada.....	14
1.3. Comprimidos Efervescentes.....	15
CAPÍTULO II - Estudo De Bioequivalência De Três Formulações De Ácido Ascórbico.	
1. Introdução.....	17
2. Objetivo.....	27
3. Métodos e Materiais.....	28
3.1. Seleção dos voluntários.....	28
3.2. Protocolo clínico.....	29
3.3. Drogas e Reagentes.....	30

3.4. Coleta e preparação das amostras.....	31
3.5. Metodologia de Análise.....	31
3.6. Condições cromatográficas.....	33
3.7. Análise estatística e farmacocinética.....	34
4. Resultados.....	35
5. Discussão.....	48
6. Conclusão.....	52
Summary.....	54
Referências bibliográficas.....	56
Anexos.....	68
Anexo I.....	69
Anexo II.....	86

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estrutura química do ácido ascórbico e desidroascórbico.....	17
Figura 2. Formação do derivado quinoxalínico (DFQ).....	32
Figura 3. Cromatogramas (HPLC). (a) Plasma branco, indicando a presença de um pico endógeno; (b) amostra de plasma obtida após 5 horas de administração oral de 1000mg de ácido ascórbico. Pico I- ácido ascórbico endógeno (4,9 µg/ ml) e pico II- ácido ascórbico (23,5 µg/ ml).....	36
Figura 4. Concentrações plasmáticas médias (média ± DP) de ácido ascórbico em função do tempo para as três formulações. Os dados correspondem a média de 17 voluntários, os quais receberam uma dose única de 1g do ingrediente ativo.	44
.....	

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela I. Sequência de administração de três formulações de ácido ascórbico em 17 voluntários sadios.....	39
Tabela II. Principais parâmetros farmacocinéticos de três formulações diferentes obtidos após dose única de 1000 mg de ácido ascórbico em 17 voluntários do sexo masculino e sadios.....	40
Tabela III. Análise estatística das razões individuais de parâmetros de $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} , $C_{max} / AUC_{[0-48]}$ e as diferenças individuais de T_{max} e C_0 obtidas para três formulações após a administração de dose única de 1000 mg de ácido ascórbico em 17 voluntários sadios (Celong/ Cewin).....	41
Tabela IV. Análise estatística das razões individuais de parâmetros de $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} , $C_{max} / AUC_{[0-48]}$ e as diferenças individuais de T_{max} e C_0 obtidas para três formulações após a administração de dose única de 1000 mg de ácido ascórbico em 17 voluntários sadios (Celong / Redoxon).....	42
Tabela V. Análise estatística das razões individuais de parâmetros de $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} , $C_{max} / AUC_{[0-48]}$ e as diferenças individuais de T_{max} e C_0 obtidas para três formulações após a administração de dose única de 1000 mg de ácido ascórbico em 17 voluntários sadios (Redoxon/ Cewin).....	43
Tabela VI - Média das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico (formulação Cewin TM - ação prolongada da Winthrop) <i>versus</i> tempo e desvio padrão (DP).....	45
Tabela VII - Média das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico (formulação Redoxon TM da Roche) <i>versus</i> tempo e desvio padrão (DP).....	46
Tabela VIII- Média das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico (formulação Celong TM - ação prolongada da Withehall) <i>versus</i> tempo e desvio padrão (DP).	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC - Área sob a curva da concentração plasmática de droga em função do tempo.

C_{max} - Concentração máxima atingida no plasma.

T_{max} - Tempo da concentração plasmática máxima atingida.

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência.

ANOVA - Análise de variância.

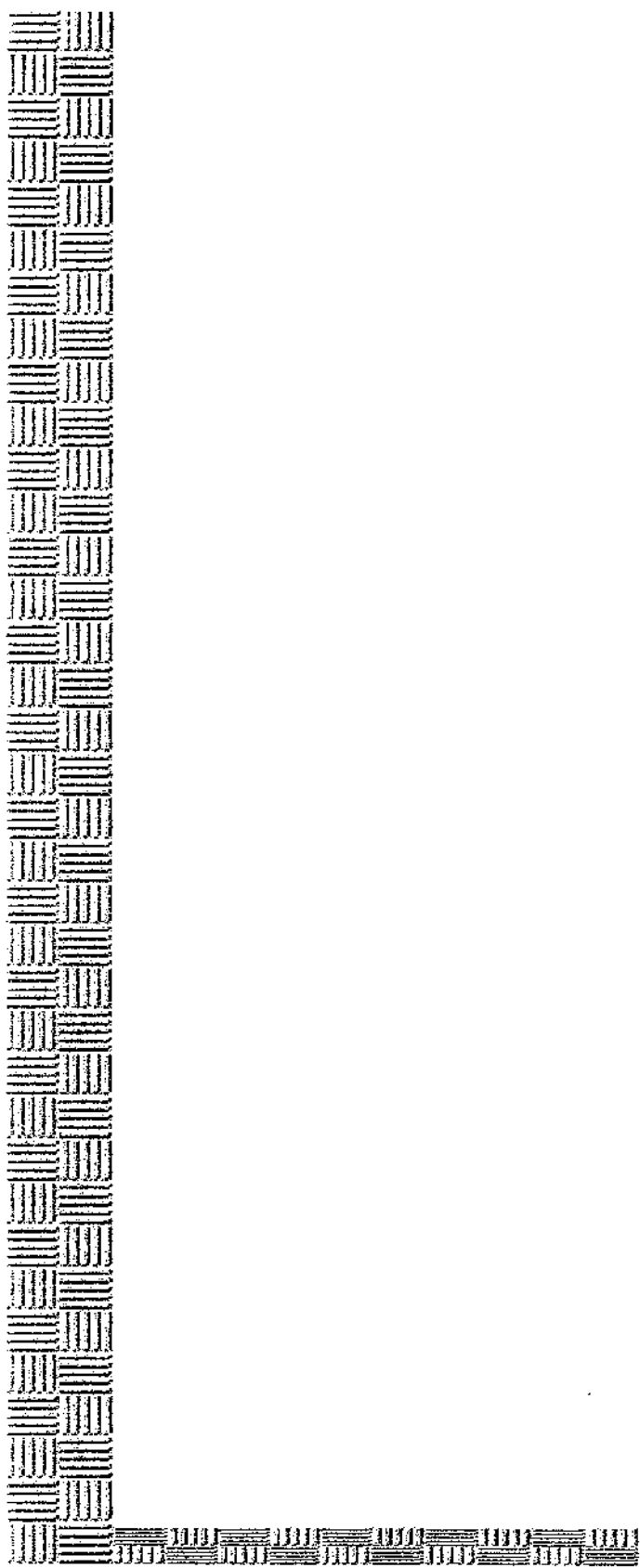
EDTA - Ácido etilendinitrilotetracético.

OPD - Orto-fenilenodiamina.

NaH₂PO₄.H₂O - Fosfato monossódico 1- hidrato.

OMS - Organização Mundial da Saúde.

FDA - Food and Drug Administration.



RESUMO

Neste estudo comparamos a biodisponibilidade de três formulações comerciais de ácido ascórbico, sendo duas adotadas como referência: Cewin™ (ação prolongada, Sanofi - Winthrop) e Redoxon™ (liberação normal, Roche). A Celong™ (ação prolongada, Whitehall) foi considerada como formulação teste. Esta comparação nos permitiu avaliar a bioequivalência dos diferentes produtos.

O protocolo clínico que consiste em três períodos randômicos, com intervalo de quatorze dias entre as doses, seguiu as normas requeridas pelo FOOD and DRUG ADMINISTRATION - United State of American (USA FDA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Dezessete voluntários adultos, sadios e do sexo masculino receberam uma dose única de 1000 mg de ácido ascórbico de cada formulação, em três diferentes fases do ensaio clínico. Foram colhidas amostras de sangue dos voluntários em intervalos padronizados, dentro do período de 48 horas, após a administração das diferentes formulações em cada fase do estudo.

As amostras foram processadas e as concentrações plasmáticas de ácido ascórbico total foram mensuradas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em coluna de fase reversa e detecção por fluorescência (SPEEK *et al*, 1984).

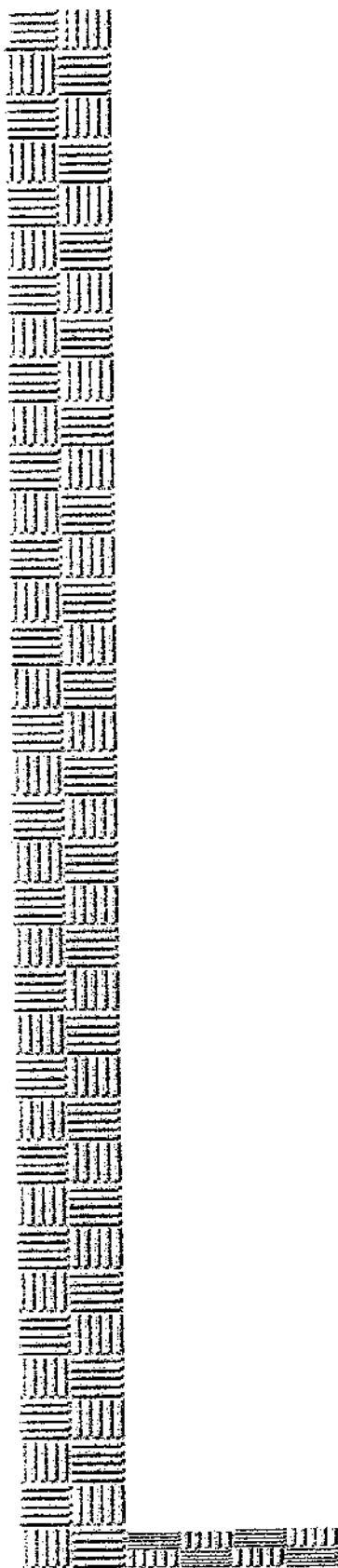
Determinaram-se parâmetros farmacocinéticos como: a área sob a curva da concentração plasmática em função do tempo, nos períodos de 0 a 24h ($AUC_{(0-24)}$) e 0 a 48h ($AUC_{(0-48)}$), máxima concentração alcançada (C_{max}), tempo em que esta ocorre (T_{max}), concentração basal (C_0) e a velocidade de absorção (C_{max} / AUC). As médias aritméticas e geométricas destes parâmetros e seus respectivos intervalos de confiança foram calculados e comparados para as três formulações, exceto o T_{max} , para o qual foram feitos cálculos próprios.

Os valores basais de ácido ascórbico foram determinados individualmente, para cada uma das formulações utilizadas, não sendo observada diferença significativa antes da

administração de cada uma das formulações [Celong ($4,6 \pm 0,7 \mu\text{g/ ml}$), Redoxon ($3,3 \pm 0,6 \mu\text{g/ ml}$), e Cewin ($4,0 \pm 0,6 \mu\text{g/ ml}$)].

As razões individuais Celong®/ Cewin® e Celong®/ Redoxon® dos parâmetros $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} e $C_{\text{max}}/ AUC_{[0-48]}$ para as três formulações estão incluídas no intervalo de confiança de 90% e no requerido para a bioequivalência (80-125%). Os valores das diferenças de T_{max} e C_0 também encontram-se dentro destes intervalos requeridos.

Para a análise estatística dos parâmetros utilizaram-se métodos paramétricos e não-paramétricos. Não se observou diferença significativa na biodisponibilidade das formulações. Após a avaliação da biodisponibilidade das três formulações comerciais de Cewin™ e Redoxon™ com Celong™ e com base nos requerimentos do FDA, concluímos que se tratam de produtos bioequivalentes.



CAPÍTULO I

BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA

1. INTRODUÇÃO GERAL

O aumento na produção de medicamentos pela indústria farmacêutica começou na década de 30, com a descoberta de novos princípios ativos, e se estende até hoje. O grande número de medicamentos disponíveis no mercado, fator decorrente da evolução da química e do desenvolvimento da indústria farmacêutica, originou a necessidade de se averiguar a eficácia dos novos produtos, proporcionando uma maior segurança no campo da terapêutica (LAPORTE, BAKSAAS, LUNDE, 1993).

A indústria farmacêutica instalada no Brasil cresceu 304% na década de 80 (MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E DO COMÉRCIO, 1985). O país ocupa hoje o oitavo lugar na escala mundial de vendas de especialidades farmacêuticas e o primeiro lugar entre os países da América Latina (LAPORTE, 1989).

A prescrição de um medicamento está relacionada com as indicações, contra-indicações e garantia de qualidade de uso do mesmo. Medicamento é toda substância ou associação de substâncias, que se utiliza para modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos para o benefício do organismo (ZANINI & OGA, 1989); ao prescrevê-lo, deve-se verificar se o efeito justifica os riscos, maiores ou menores conforme o caso (LAPORTE, BAKSAAS, LUNDE, 1993).

Estudos realizados mundialmente sobre a utilização de medicamentos permitem traçar um panorama no qual aparecem distorções comuns à maioria dos países: a abundância de produtos desnecessários ou com potencial tóxico inaceitável, prescrição irracional, automedicação e outras. Tais desvios decorrem, em última instância, do caráter lucrativo da atividade da produção farmacêutica e afetam as condutas nas áreas de ensino, prescrição e consumo (LAPORTE, BAKSAAS, LUNDE, 1993).

A Organização Panamericana de Saúde e a Organização Mundial de Saúde, para promoverem o uso racional dos medicamentos, contam com profissionais da saúde que aplicam os princípios básicos da farmacologia clínica e os ensaios para avaliar a eficácia do fármacos. A assessoria e orientação dos profissionais capacitados é fundamental nas atividades para regulamentação e controle dos produtos farmacêuticos, na preparação de listas de medicamentos e formulários terapêuticos. As decisões nestas áreas poderão ser influenciadas por critérios que surgem de sólidos fundamentos científicos. Estudos científicos desta natureza favorecem o uso efetivo e seguro das formulações farmacêuticas nas suas respectivas indicações (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OMS, 1992).

Nos países desenvolvidos, o produto que não é vendido por tempo e quantidade suficientes para comprovar a sua segurança e eficácia é definido como “medicamento novo” (pela legislação); esta definição também se aplica para novas indicações ou apresentações dos medicamentos registrados (Estados Unidos) (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OMS, 1992).

Antes da administração de um medicamento a seres humanos, deve-se investigar as atividades farmacológicas e toxicológicas do mesmo *in vitro* e em animais. As atividades dos laboratórios farmacêuticos direcionadas ao desenvolvimento dos medicamentos novos estão organizadas de tal maneira que as substâncias químicas são pesquisadas sistematicamente, dependendo do seu tipo, utilizando-se grande variedade de testes (bioquímicos, fisiológicos, etc.) para se chegar à substância ativa com o efeito desejado (LAPORTE, BAKSAAS, LUNDE, 1993). A substância que apresenta a atividade de fato será estudada detalhadamente. De qualquer modo, para ir da descoberta inicial até a obtenção de um produto finalizado são necessárias inúmeras pesquisas.

O novo princípio ativo é avaliado em animais e em seres humanos, obedecendo a uma seqüência determinada, que se inicia na descoberta do princípio ativo, baseada em pesquisas sistemáticas que incluem a investigação de produtos naturais e/ou a síntese química e vai até a obtenção do medicamento (LAPORTE, BAKSAAS, LUNDE, 1993).

Além disso, fazem parte da sequência do estudo de medicamento novo (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD- OMS, 1992):

Estudos pré-clínicos. Os estudos pré-clínicos determinam as ações farmacológicas da substância e também seu mecanismo de ação, a especificidade de seu efeito e a toxicidade em animais, seguindo-se protocolos bem definidos. Usam-se testes toxicológicos para determinar a toxicidade do medicamento e seus metabólitos em vários sistemas biológicos com o objetivo de poder prever o risco potencial em seres humanos. Atualmente, existe o requisito de se avaliar o efeito do medicamento na reprodução, no seu potencial carcinogênico ou de dano genético. O FDA dos Estados Unidos, por exemplo, requer para a maioria dos medicamentos, que estes testes sejam feitos antes de se iniciarem os ensaios clínicos e a promoção de vendas.

Estudos Clínicos. A primeira administração do medicamento em seres humanos está fundamentada na observação obtida nos estudos em animais e, portanto, baseia-se na toxicidade demonstrada em animais ou na falta da mesma. Considera-se a aparição de qualquer efeito tóxico em animais como fator determinante para não se aceitar a administração em seres humanos. Esta decisão pode ser equivocada porque alguns tipos de efeitos tóxicos são espécie-específicos; deste modo, às vezes, novos medicamentos potencialmente úteis não são utilizados. Os estudos toxicológicos feitos em animais são bons indicadores da toxicidade que se relaciona com a dose terapêutica da droga em humanos, enquanto as reações adversas que não estão relacionadas com a dose não se detectam normalmente durante os testes tradicionais de toxicidade. Os ensaios clínicos são divididos em fases.

- **Fase I.** Trata-se dos ensaios das primeiras administrações de um medicamento em seres humanos. O medicamento é administrado em voluntários sadios, primeiro em dose única e depois em doses múltiplas, utilizando-se todas as possíveis doses terapêuticas. Estes estudos se efetuam para a obtenção de dados sobre a segurança e a farmacocinética dos

medicamentos, já que os sintomas relevantes para a pesquisa da eficácia raramente estão presentes em voluntários sadios.

- **Fase II.** Consiste nos ensaios de administração do medicamento a pacientes. Deve-se avaliar a eliminação do medicamento pelo organismo, devido ao fato de que pacientes podem metabolizá-lo de maneira diferente dos voluntários sadios. Além disso, existem os ensaios que correspondem à primeira administração do medicamento em paciente com o objetivo de estudar o potencial terapêutico e os efeitos colaterais e com o intuito de se determinar as faixas da dose para a empregar em ensaios terapêuticos mais definitivos. Há também os ensaios que estão direcionados a estabelecer a eficácia que o medicamento possui de reduzir as manifestações de uma enfermidade específica e a comparar sua eficácia e efeitos indesejáveis com aqueles de outros medicamentos registrados com propósito similar.

- **Fase III (Ensaio clínico comparativo).** Estes estudos correspondem aos ensaios duplo-cegos, controlados, com distribuição aleatória, executados em número suficiente de pacientes, tendo como objetivo promover a informação que permita a análise estatística da eficácia e a segurança do medicamento. Estes estudos proporcionam uma melhor informação devido a utilização de um número maior de amostras. Se os estudos em seres humanos indicam que o composto pode ser um agente terapêutico eficaz e seguro, o fabricante pode apresentar uma solicitação ao Órgão Regulador correspondente para se obter uma licença de comercialização do novo medicamento.

- **Fase IV (Mercado controlado).** Fazem parte desta fase os estudos de utilização de medicamentos ou de vigilância sanitária pós-comercializações, destinados a suprir as informações necessárias para que se completem os dados acerca da segurança e da eficácia de um medicamento, somente possíveis de se obter quando os medicamentos são empregados, na prática, em grande escala. Após o uso extensivo do produto pode ocorrer o aparecimento de efeitos indesejáveis relativamente raros, toxicidade crônica desenvolvida somente após anos de exposição, interações com medicamentos previamente desconhecidas, usos potenciais novos ou recomendações sobre esquemas de doseamentos mais apropriados.

Estas informações podem alterar as obtidas na fase anterior, que se referem à segurança e eficácia do medicamento.

O crescimento da indústria farmacêutica causou a produção em grande escala de medicamentos; conseqüentemente, surgiram numerosos problemas relacionados com a fase inicial de matéria prima até a fase de obtenção do produto final. Em conseqüência deste fato, começaram a se desenvolver, dentro destes estabelecimentos industriais, setores altamente especializados, cuja finalidade básica é avaliar a pureza, a qualidade das matérias-primas e a concentração do princípio ativo ou dos princípios ativos presente nas formulações. O setor responsável pela qualidade dos medicamentos recebeu o nome de controle de qualidade. Hoje este controle inclui os estudos de biodisponibilidade que procuram relacionar a concentração do princípio ativo presente no organismo com o tipo de formulação farmacêutica ao qual está incorporado (SHARGEL & ANDREW, 1993).

Estes estudos de biodisponibilidade são efetivos no caso de se comprovar a bioequivalência de produtos similares (genéricos), que é o assunto abordado nesta dissertação. Os medicamentos avaliados nestes estudos são os chamados similares, que consistem em preparações idênticas a especialidades (SHARGEL & ANDREW, 1993).

Naturalmente, um similar de uma dada especialidade deve apresentar uma biodisponibilidade idêntica ou muito próxima da especialidade que pretende produzir; deve ser bioequivalente com ela. O interesse deste tipo de medicamento é preferencialmente de natureza econômica, uma vez que tem um preço inferior ao original.

Em países em desenvolvimento, a produção de genéricos é, às vezes, uma indústria florescente, pois a exportação destes é fonte importante de entrada de divisas. O estado legal desta indústria de genéricos é matéria de agitada controvérsia. As leis de proteção da patente de medicamentos novos variam muito. Em geral, os países em desenvolvimento não respeitam a leis ou estas apresentam curta duração (período mais curto de duração que os Estados Unidos ou Europa, onde a legislação protege a patente, de 7 à 10 anos) (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD- OMS, 1992).

A substituição por genéricos é praticada com grande frequência por farmacêuticos e consiste na utilização de um produto farmacêutico de marca diferente daquela prescrita pelo médico (SHARGEL & ANDREW, 1993), desde que contenha o mesmo ingrediente ativo, nas mesmas concentrações e formas farmacêuticas (Ex. Cewin[®] comprimidos substituído por Celong[®] comprimidos). É preciso comprovar a inexistência de diferenças entre elas; para isto, faz-se necessária a realização dos testes de bioequivalência (CÁRCAMO, 1992).

1.1. Biodisponibilidade

Biodisponibilidade é a velocidade e extensão pela qual a substância ativa ou a molécula terapêutica de uma droga é absorvida a partir de uma forma farmacêutica e se torna disponível no sítio de ação (CÁRCAMO, 1992).

A biodisponibilidade pode ser muito variável pois a absorção dos fármacos pode ser alterada por fatores que dependem do medicamento ou por fatores individuais, resultando na produção de sintomas tóxicos ou na redução do efeito terapêutico. Quando um medicamento é administrado por via enteral, o valor das concentrações plasmáticas e, conseqüentemente, a resposta do fármaco dependem da velocidade com que ocorre a absorção e da quantidade absorvida. Na biodisponibilidade interferem as características físico-químicas da droga (como a solubilidade, o peso molecular e o coeficiente de partição), o processos de industrialização (ver adiante no item sobre preparação da forma de ação prolongada), a forma farmacêutica da droga e outros fatores característicos do paciente, como efeito de primeira passagem, esvaziamento gástrico, a ingestão alimentar e de medicamentos, pH gástrico e urinário, e outros fatores pertencentes ao item de variabilidade individual (SHARGEL & ANDREW, 1993; CÁRCAMO, 1992; BRODY, 1994).

Formulações variadas da mesma droga, às vezes, não produzem respostas farmacológicas idênticas, pois alterações em sua preparação podem afetar a

biodisponibilidade do fármaco no seu local de ação (CÁRCAMO, 1992). Neste caso, concluímos que os produtos não apresentam a mesma desintegração e dissolução, decorrente das diferentes formas de cristais, tamanho das partículas ou outras características que não foram controladas rigorosamente na elaboração das formulações e também na manufatura de sua preparação (SHARGEL & ANDREW, 1993).

Na administração oral, o ingrediente ativo passa da luz do intestino delgado para a circulação sistêmica. A droga não deve apenas atravessar a mucosa, mas também está sujeita a ação de enzimas da parede intestinal e do fígado, onde será inativada ou desviada, antes de atingir a circulação sistêmica ou o seu local de ação; trata-se do efeito de primeira passagem (WILSON & WASHINGTON, 1989).

A velocidade do esvaziamento gástrico decorrente da presença de alimento interfere na permanência do fármaco no sítio específico de absorção; acredita-se que esta pode retardar, reduzir a absorção de drogas, não interferir e, além disso, estão sendo feitos estudos de situações não muito esclarecidas, em que se evidenciam aumentos na quantidade de droga absorvida (WILSON & WASHINGTON, 1989). Podemos citar o fármaco diclofenaco de potássio, para o qual a ingestão alimentar retardou a absorção devido ao atraso no esvaziamento gástrico (POLI *et al*, 1996).

A constituição dos alimentos é importante no esvaziamento gástrico e também porque estes podem interagir diretamente com o fármaco, como exemplo, o caso do leite que diminui a absorção da tetraciclina; além disso, os alimentos podem alterar a produção de secreções como a bile que, quando aumentada no trato gastrintestinal aumenta a absorção de fármacos pouco solúveis em meio aquoso.

O ação do pH gástrico provoca várias modificações na estrutura química dos fármacos, as quais podem induzir a uma maior ou menor absorção dos mesmos. O pH urinário pode favorecer ou reduzir a eliminação dos fármacos, alterando a sua permanência no organismo e, conseqüentemente, a sua atuação. A alteração significativa de eliminação de um fármaco provocada pela mudança do pH urinário depende da magnitude e persistência dessa alteração e da contribuição da reabsorção passiva dependente do pH para a eliminação

total do fármaco. A alcalinização da urina pode produzir uma elevação de quatro a seis vezes na excreção de um ácido relativamente forte (CÁRCAMO, 1992; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD- OMS, 1992; ROWLAND & TOZER, 1989).

Para a realização dos estudos de biodisponibilidade, os farmacologistas precisam diferir níveis de dosagem de drogas com precisão. O método mais confiável e sensível na determinação da biodisponibilidade de uma dose única envolve a análise das concentrações plasmáticas ou séricas da droga, em vários momentos, após a administração oral. O FDA estabelece que a biodisponibilidade *in vivo* de uma dada formulação farmacêutica pode ser determinada pela medida dos níveis plasmáticos da droga, do ingrediente ativo ou metabólitos ativos em função do tempo, ou através da quantificação do efeito farmacológico agudo (BIOAVAILABILITY AND BIOEQUIVALENCE REQUIREMENTS, 1985).

Estudos de biodisponibilidade devem ser executados com múltiplas doses quando uma variabilidade excessiva é encontrada na maneira com que, diferentes pacientes reagem à administração de doses únicas de uma determinada droga. É importante lembrar que diferentes biodisponibilidades terão significados diferentes, dependendo da potência e toxicidade da droga que se está avaliando (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD- OMS, 1992).

1.1.1. Bioequivalência

Equivalentes farmacêuticos são produtos que contêm os mesmos ingredientes ativos e são idênticos na concentração, forma farmacêutica e na via de administração (SHARGEL & ANDREW, 1993). Para que estes produtos farmacêuticos sejam considerados bioequivalentes é necessário que as suas velocidades e extensões de absorção não apresentem diferenças significativas sob as mesmas condições, segundo o FDA.

O órgão internacional FDA requer que novas formulações de produtos já disponíveis no mercado sejam testadas em termos de bioequivalência, comparando-se a biodisponibilidade das mesmas.

Os parâmetros área sob a curva de concentração plasmáticas *versus* tempo indicativo da quantidade total de droga ativa absorvida e presente no organismo durante um intervalo de tempo e as medidas de concentração plasmática máxima e do tempo necessário para atingir esta concentração fornecem informações pertinentes à biodisponibilidade do princípio ativo. Estes parâmetros são utilizados na avaliação da biodisponibilidade e da bioequivalência de duas preparações diferentes da mesma droga (CÁRCAMO, 1992).

Para produtos serem considerados bioequivalentes, as áreas sob as curvas de concentrações plasmáticas *versus* o tempo obtidas após a administração de formulações diferentes da mesma droga devem ser aproximadamente iguais. Se as formulações apresentarem uma disparidade muito grande entre as suas concentrações plasmáticas máximas obtidas ou nos tempos em que estas ocorrem, não devem ser consideradas bioequivalentes (SHARGEL & ANDREW, 1993).

Testes para a bioequivalência devem ser suficientemente simples e rápidos, utilizando-se numerosas amostras na rotina. Estes testes são fundamentais para o estabelecimento de controles sobre os medicamentos e assim contribui para um melhor processo de manufatura da preparação farmacêutica, diminuindo o grau de variabilidade nas características de liberação da droga *in vivo* (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1996; CÁRCAMO, 1992).

1.1.2. Variabilidade individual

Indivíduos de mesma espécie e pertencentes a uma população homogênea (após seleção) apresentam variabilidade no efeito de uma droga, decorrente da divergência de concentrações da droga no local de ação (diferença na farmacocinética) ou da diferença nas respostas fisiológicas à mesma concentração (diferença na farmacodinâmica) (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD- OMS, 1992).

Varição quantitativa é aquela relacionada com a farmacocinética do princípio ativo e com fatores que interferem no acesso do fármaco ao sítio de ação e que, conseqüentemente, determinam a intensidade do efeito. Como exemplos podemos citar: propriedades físicas e químicas da droga, dose e absorção do fármaco, fatores já citados no item biodisponibilidade e outros como ligação às proteínas, quantidade de droga distribuída e excretada, velocidade de biotransformação (ROWLAND & TOZER, 1989).

Fatores que modificam a ação dos fármacos são a causa da variação qualitativa, que consiste na alteração da natureza de resposta farmacológica; estes podem ser intrínsecos, dependentes do sistema biológico, ou extrínsecos quando dependem do fármaco, das condições de administração e da interação medicamentosa devido a presença de outros princípios ativos. Fazem parte dos fatores intrínsecos a idiosincrasia, os genéticos, a idade, o sexo e os estados fisiológicos e psicológicos. A seguir, são feitas citações de alguns dos fatores intrínsecos e extrínsecos.

A reação idiossincrática se expressa em uma minoria da população, sendo considerada um efeito anormal e geralmente prejudicial. Cita-se como exemplo a droga antimalárica primaquina, que é bem tolerada pela maioria da população mas, em alguns indivíduos (5-10% dos homens), causa hemólise, resultando em anemia grave.

Em estudos sobre a variabilidade genética, encontramos diferenças na taxa de metabolismo de diversas drogas como o suxametônio que é inativado pela hidrólise catalisada por colinesterases plasmáticas. Existem indivíduos que produzem um tipo anormal de colinesterase com um padrão modificado de especificidade em relação ao substrato e ao inibidor (o responsável é um gene recessivo). Assim tais indivíduos não conseguem inativar rapidamente o suxametônio, apresentando um bloqueio neuromuscular que pode durar várias horas (BRODY *et al*, 1994)

A idade interfere na ação de uma droga devido a existência de diferentes taxas de função renal e hepática nos indivíduos (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD- OMS, 1992). Os neonatos possuem uma taxa de 20% e os idosos de 50% em relação ao valor do adulto, deste modo ocorre um aumento do tempo de meia-vida

plasmática de drogas, como nos casos de antibióticos para bebês e da digoxina para idosos (BRODY *et al*, 1994; ROWLAND & TOZER, 1989).

O metabolismo hepático em recém-nascidos é deficiente, devido a baixa atividade enzimática. O cloranfenicol por exemplo, cujo o metabolismo depende da conjugação hepática, tende a se acumular causando a síndrome cinzenta. Por outro lado, a atividade das enzimas microssômicas hepáticas responsáveis pela metabolização de drogas como o diazepam, diminui nos idosos, aumentando os tempos de meia-vida plasmática das mesmas (ROWLAND & TOZER, 1989).

Nos estados patológicos, como hepatopatias e nefropatias, ocorrem alterações no metabolismo e na eliminação das drogas, já que tanto a atividade enzimática como a taxa de filtração podem estar alteradas nestes casos ((ROWLAND & TOZER, 1989; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD- OMS, 1992).

Uma droga pode interagir com outra e modificar sua ação através de dois mecanismos: em um a ação é alterada, mas a concentração da droga no seu sítio de ação continua a mesma, no outro existe uma mudança na ação e na concentração disponível no sítio de ação (BRODY *et al*, 1994).

Apesar da consideração e cuidado de todos os detalhes, no caso do ácido ascórbico existe a variabilidade inter-indivíduos e também a variabilidade biológica não-controlável de cada indivíduo, principalmente relacionada com a reserva corporal deste fármaco (WEBER.; BENDICH, SCHALCH, 1996).

1.2. Forma Farmacêutica de Ação Prolongada.

A vitamina C é apresentada em várias formas farmacêuticas. Neste estudo, são abordadas as formas em comprimido efervescente e de ação prolongada, esta última elaborada por técnicas especializadas encarecendo o seu custo (SHARGEL & ANDREW, 1993).

A duração do efeito de um fármaco está diretamente relacionada ao seu tempo de meia-vida ou de sua permanência no sangue. As nomeadas formas de ação prolongada ou sustentada com absorções lentas e constantes são ideais para os fármacos que possuem meia-vida curta (inferior a 6 horas) e precisam ser administrados em intervalos de 3 e 4 horas (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OMS, 1992).

Na elaboração de formas de ação sustentada, as velocidades de desintegração e dissolução do princípio ativo são alteradas, modificando-se a taxa de absorção do mesmo (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1996).

No uso deste tipo de formulação ocorrem: uma redução na frequência de administração da droga, mantendo-se o efeito terapêutico durante o período maior de repouso com níveis sanguíneos contínuos e convenientes; um decréscimo na incidência e na intensidade de efeitos colaterais; e, além disso, uma economia, devido à diminuição dos custos operacionais da equipe de enfermagem em hospitais (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1996).

Para a maioria das preparações comerciais disponíveis em forma de liberação lenta, a droga não é liberada de forma constante; ao contrário, a quantidade de droga ativa disponível diminui com o tempo. O que se encontra, na prática, é um nível de efeito que não descreve um platô ao longo do tempo, mas atinge um máximo e diminui lentamente, até que uma nova dose seja administrada (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OMS, 1992).

O principal limite de utilidade das preparações de liberação prolongada é o tempo de semivida biológica que, quando muito elevado, não justifica a preparação especial. Outros fatores são a decomposição do princípio ativo no trato gastrointestinal, a sua absorção em uma zona muito limitada, a sua má absorção pela mucosa intestinal e, por último, uma elevada toxicidade do princípio ativo (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OMS, 1992; PRISTA, ALVES, MORGADO, 1996)

1.2.1. Preparação de formas orais de ação prolongada.

Comprimidos constituídos por sucessivas camadas permitem obter uma forma de liberação farmacêutica de ação descontínua que pode-se aproximar da verdadeira ação prolongada. Trata-se de um comprimido estratificado em que cada camada ou estrato cede, em tempos diferentes, a quantidade de fármaco que contém. A versão comum consiste em um núcleo resistente ao suco gástrico e entero-solúvel, envolvido por um revestimento que se dissolve rapidamente no suco gástrico. A camada externa é dissolvida em um curto intervalo de tempo, fornecendo a dose de ação imediata; depois ocorre a desintegração das outras camadas, elevando o nível sangüíneo do fármaco para valores convenientes (BRODY *et al*,1994).

Para a obtenção de diferentes tempos de desintegração de grânulos pode-se optar por duas técnicas distintas. A primeira consiste em preparar camadas de espessuras sucessivamente crescentes, utilizando-se a mesma substância e, neste caso, o tempo de desintegração varia de acordo com a espessura da camada (técnica demonstrada por Chaumeil e ainda por Delporte e Jaminet). A segunda técnica emprega substâncias diferentes para o revestimento dos grânulos, obedecendo às suas características de resistir mais ou menos que outras ao ataque dos sucos digestivos. As percentagens convenientes de cada grupo de grânulos (de tempos de desintegração diferentes) são incluídas na mesma unidade medicamentosa, de modo a se obter uma ação planejada (PRISTA, ALVES, MORGADO,1996).

O princípio ativo, em vez de ser fracionado e revestido, pode ser pulverizado e introduzido em uma matriz (rede ou esqueleto) que, na maioria das vezes, é constituída por macromoléculas mais ou menos inertes (BRODY,1994). Este esqueleto é muito poroso e os poros são preenchidos pelo fármaco. A maneira pela qual se efetua a compressão pode alterar a desagregação do comprimido. As matrizes utilizadas apresentam diferentes propriedades físico-químicas (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1996).

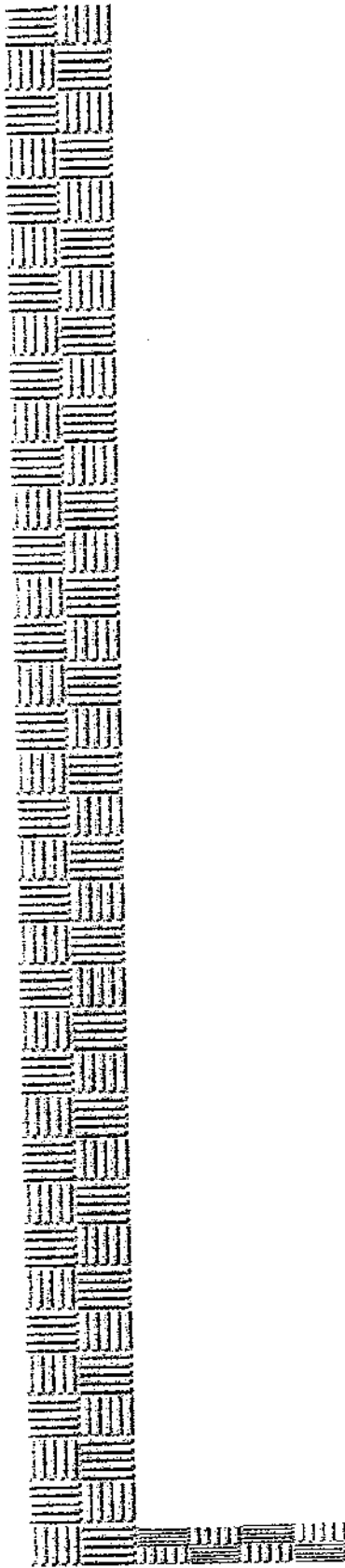
Segundo Prista *et al*, outro método de preparação de formas de ação prolongada consiste na floculação do princípio ativo em polímeros aniônicos. O floculado resultante

contém o fármaco no estado molecular e sua liberação se efetua por extração e dissolução, fenômenos que sofrem influência do pH.

Existe uma técnica que consiste em dissolver ou suspender o princípio ativo em um monômero (epóxido), que depois é polimerizado sob a forma de pérolas. A adição de grupos amina ao polímero torna-o solúvel no meio do ácido, enquanto a introdução de funções ácidas na molécula permite a dissolução em meio neutro ou só ligeiramente ácido. A mistura de diferentes polímeros assegura a liberação rápida de uma certa quantidade (dose de ação imediata) em meio ácido, seguida de uma cessão lenta e progressiva no intestino (dose de manutenção), (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1996).

1.3. Comprimidos Efervescentes

Trata-se de comprimidos destinados à dissolução em água e, para isso, é necessário que recebam como excipiente uma grande quantidade de material efervescente na sua preparação. No caso dos comprimidos efervescentes de vitamina C, mistura-se o ácido ascórbico com um álcali (frequentemente o bicarbonato de sódio); preparam-se dois grânulos isolados, um com o componente ácido (ácido ascórbico) e outro com a porção alcalina, os quais serão misturados completamente secos, no momento da compressão. Para a compressão é necessário um controle da temperatura e da umidade do ambiente em que ela será executada (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1996).



CAPÍTULO II

***ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE TRÊS
FORMULAÇÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO***

1. INTRODUÇÃO

Ácido ascórbico.

Vitamina C é o nome dado a todos os compostos que possuem qualitativamente a mesma atividade biológica antiescorbútica que inclui o ácido ascórbico e a sua forma oxidada, o ácido desidroascórbico (PROCHAZKA & FAGNER, 1964). Em consequência de suas propriedades redutoras, o ácido ascórbico oxida-se facilmente para ácido desidroascórbico (sistema redox - figura 1). O poder vitamínico das duas formas é praticamente idêntico e dependente de seu anel lactônico (FRANCO, 1992). O isômero da vitamina C, o ácido eritórbico conhecido também como ácido isoascórbico, é comumente usado como aditivo nos alimentos (carnes e bebidas) (Sauberlich et al, 1991), porém este possui atividade antiescorbútica muito pequena (5%) (Sauberlich et al, 1989; CLYDESDALE, et al, 1991).

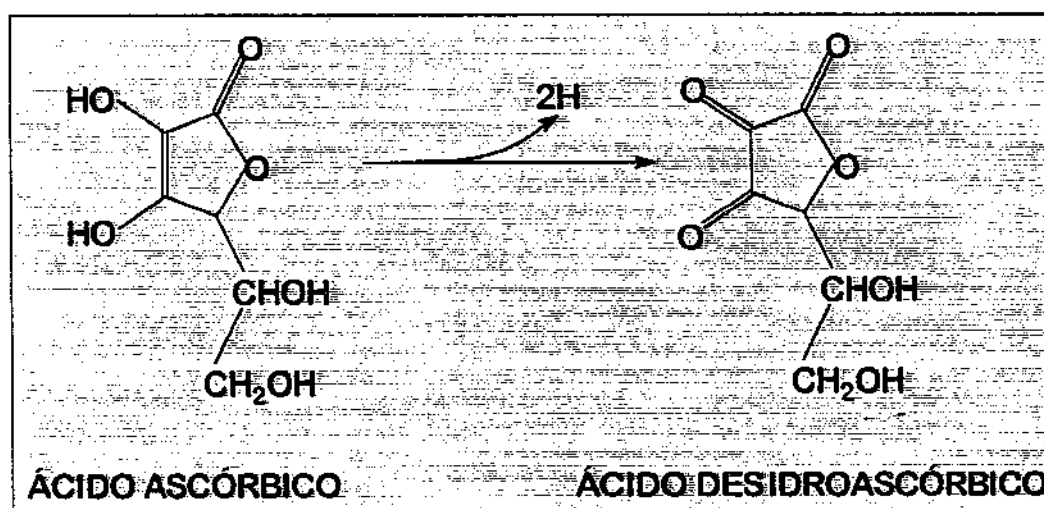


Figura 1- Estrutura molecular representando o ácido ascórbico e o desidroascórbico.

A origem biológica da vitamina C resulta da transformação de glicose ou galactose, respectivamente nos animais e plantas. Apenas o homem, outros primatas e as cobaias não possuem uma enzima chamada L-gulonolactone oxidase que participa da síntese do ácido ascórbico, e precisam desta vitamina como fator dietético, retirando-a da dieta alimentar ou através da ingestão de sua forma sintética (NISHKIMI & YAGI, 1991).

O ácido ascórbico nos vegetais está distribuído em maior abundância nas frutas cítricas (como tangerinas, laranja e no limão), tomates, pimentões, ameixas, nas folhas frescas da amoreira, nos pigmentos, groselhas vermelhas, cerejas, amoras, uvas, maçãs, batatas e cenouras (ALLEM Jr., 1993). Apesar de ser extraído do *capsicum* ou de outras espécies de vegetais como as *rose hips*, hoje ele é preparado sinteticamente, sendo usado o L-isômero. As formas sintética e natural de vitamina C possuem biodisponibilidades semelhantes em seres humanos (PELLETIER & KEITH, 1974; VINSON & BOSE, 1988; MANGELS *et al*, 1993). A quantidade em porcentagem de vitamina C na forma reduzida e oxidada é muito variável nos alimentos naturais, pois sofre influência de fatores como: estágio de maturidade, diferenças regionais e estação do ano (VANDERSLICE & HIGGS, 1991).

Admite-se que nas células vivas o ácido ascórbico se encontre na forma de complexo com proteínas (ascorbigênio), que o protege de oxidações espontâneas. A sua distribuição é extensa pelo organismo; certas glândulas são particularmente ricas, como o córtex supra-renal, lobo anterior da hipófise e tireóide, sendo encontrado também no fígado, cérebro, leite e sangue. A vitamina C encontra-se em vários tecidos do organismo, em quantidades diferentes em cada tipo de célula (KUBLER & GEHLER, 1970).

Química

O ácido ascórbico é quimicamente o (R)-5-[(S)-1,2-diidroxi-etil]-3,4-diidroxi-5(H)-furan-2-ona], também conhecido como ácido L-ascórbico, ácido L-xiloascórbico e

ácido-3-oxo-L-gulofurano-lactona (forma enólica). Trata-se de uma substância branca, cristalina, solúvel na água, metanol e acetona (com a qual forma combinação cristalina instável). É insolúvel no éter, clorofórmio, benzeno e lipídeos. No estado sólido é uma substância estável, mas muito lábil em solução (principalmente em água). O calor, a alcalinidade do meio, a presença de metais pesados (cobre e prata, em especial) e os agentes oxidantes, destroem-no rapidamente. Além disso é atóxico e, provavelmente, a substância ativa menos tóxica que se conhece (DOLLEY, 1991)

Deficiência de vitamina C.

A doença provocada pela deficiência de vitamina C, o escorbuto, apresenta sintomas que incluem: fadiga no desempenho de atividades físicas, petéquias, hemorragia perifolicular, depressão, diminuição da cicatrização de feridas e distrofias dentárias (SAUBERLICH, 1990). As hemorragias se devem à fragilidade capilar resultante. Um escorbuto discreto é provavelmente a deficiência vitamínica mais comum nas sociedades em que as pessoas particularmente acompanham dietas hipocalóricas ou que não podem comprar frutas e vegetais frescos. Esta doença carencial ocorre pelo decréscimo na síntese de colágeno, a maior proteína do organismo (BERG & KERR, 1992). A vitamina C é essencial para a formação e manutenção desta substância cimentante que une as células entre si; seu papel bioquímico não está bem definido, mas parece estar relacionado à sua capacidade de agir como um sistema oxirredutor, intervindo nos fenômenos metabólicos. A dose usual para tratamento do escorbuto é de 300 mg diários desta vitamina, durante pelo menos duas semanas.

A deficiência de vitamina C foi estudada nos EUA. O II Estudo Avaliativo Nacional de Saúde e Nutrição feito naquele país (Second National Health and Nutrition Evaluation Survey (NHANES II)) encontrou níveis baixos de vitamina C em 3% da população estudada (Woteki *et al.*, 1990). Homens com 25 anos de idade ou mais possuem

níveis mais baixos de vitamina C que as mulheres. Homens africanos e americanos na faixa de 55 a 75 anos de idade têm o mais baixo nível de vitamina C (16%). No I Estudo Avaliativo (First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I) foram reunidas informações sobre a nutrição de 11.348 adultos americanos não institucionalizados, de 25 a 74 anos de idade. Examinando dados obtidos neste estudo, verificou-se que a taxa de mortalidade destes americanos possuía uma relação inversamente proporcional com o aumento na ingestão da vitamina C, nos homens e uma relação não relevante nas mulheres (ENSTROM & SEIFTER, 1992).

Farmacologia

A dose diária recomendada de uma vitamina é definida como a quantidade adequada para preencher as necessidades nutricionais conhecidas de praticamente todos os indivíduos saudáveis. Vários estudos foram feitos com o intuito de se chegar a dose mais adequada para a vitamina C, avaliando-se todos os seus fatores farmacocinéticos (LEVINE *et al*, 1991; LEVINE *et al* 1995; WEBER, BENDICH, SCHALCH, 1996). A quantidade média de ácido ascórbico necessária que deve ser fornecida diariamente pelos alimentos numa dieta bem equilibrada oscila entre 50 a 150 mg, variando com a idade (crianças, adultos e idosos), o estado de saúde (gravidez, hepatopatia, etc.) e as condições nutricionais de cada pessoa (dietas hipocalóricas e restritas de vegetais e frutas).

As quantidades diárias recomendadas pelas autoridades variam em uma faixa de 20 mg, no Reino Unido, para 70 mg recomendadas na Alemanha. Nos EEUU, de acordo com a Food and Nutrition Board of the U.S. National Research Council, recomendam-se doses de 35 mg para as crianças e de 60 mg para adultos (não fumantes e 70 Kg) segundo Levine (1996). Estas doses diárias recomendadas têm sido contestadas por vários autores, que acreditam serem eficientes apenas na prevenção do escorbuto, sem observar as outras

possíveis ações no benefício à saúde (WEBER,BENDICH, SCHALCH, 1996; YOUNG, 1996).

De acordo com Pauling (1970), a quantidade de vitamina C contida na dieta alimentar é menor que a necessária para uma boa saúde, e sugere que a dose diária ideal seja de 2,3 g ou mais. Alta concentração de vitamina C aumentaria a resistência à infecções, melhoram a cura de feridas e ajudam no decréscimo das incidências de choques consequentes a injúrias e cirurgias.

Farmacocinética.

A vitamina C é absorvida no intestino humano através de um processo de transporte ativo que é saturável (CLYDESDALE, et al, 1991) e dependente de sódio (Na^+) (STEVENSON & BRUSH 1969; BIGLEY & STANKOVA, 1974; KALLNER, HARTMANN, HORNIG, 1977; SAUBERLICH, 1985; ROSE & CHOI, 1990; MATUSIRWICZ *et al* 1995; ROSE, 1996.). Esta absorção depende de um transportador determinado que se encontra em lugar específico e em número limitado no intestino delgado de animais e seres humanos (íleo) (ROSE, 1996). Podem ocorrer alterações nesta absorção pela saturação dos transportadores, pela inibição competitiva de várias outras substâncias capazes de se fixar ao transportador (como o ácido eritórico) (SUZUKI, KURATA, ARAKAWA, 1991) e também pela motilidade intestinal rápida, de maneira que o ácido ascórbico é arrastado e não passa adequadamente pelo seu sítio de absorção. A dose de saturação média em homens e mulheres é de 500 a 1000 mg (BLANCHARD *et al*, 1990).

Em baixas doses, como na dieta alimentar (< 30 mg/por dia), a vitamina C é absorvida quase por completo; em doses de 30 a 180 mg/por dia, a absorção é de 70 a 90% aproximadamente; cai para 50% quando a dose desta vitamina é de 1.5g e para 16% em uma dose de 12g. Maior absorção intestinal é obtida se administrarmos doses inferiores a 1 g de

ácido ascórbico em determinados intervalos, em um mesmo dia, em vez de uma única megadose (SACHARIN, TAYLOR, CHASSEUD, 1977).

As propriedades farmacocinéticas da vitamina C observadas em jovens e idosos são semelhantes, em estudos feitos separadamente para homens (BLANCHARD *et al*, 1990) e mulheres (BLANCHARD *et al*, 1990). Entretanto existe uma pequena diferença entre homens e mulheres devido a composição e ao peso corporal (BLANCHARD, 1991).

A eliminação do ácido ascórbico depende da sua reabsorção tubular renal, que é feita através de um mecanismo ativo e dependente de sódio (difusão), o qual também sofre saturação (SEGHERI *et al*, 1994).

A presença de grandes quantidades de vitamina C não absorvidas, resultado da ingestão de uma megadose, provoca diarreias osmóticas e desconfortos intestinais (KUBLER & GEHLER J, 1970). Além disso, resulta na acidificação da urina, ocorrendo a precipitação de sais com a formação de cálculos renais e a interferência no ritmo de excreção das drogas. Mesmo sem estar em excesso, esta vitamina altera a farmacocinética de outras drogas (ZANNONI & SATO) como os anticoncepcionais (KUHNZ *et al*, 1995).

Funções da Vitamina C (Atividade biológica).

Como já foi dito, o ácido ascórbico atua como co-fator em numerosos processos biológicos. É provavelmente o mais efetivo e menos tóxico antioxidante identificado nos mamíferos, quebrando a cadeia de reações oxidantes, pois reage diretamente com peróxidos, radicais hidroxila e outros (BENDICH *et al.*, 1986; MALMSTROM, ANDREASSON, REINHAMMAR, 1975; MOESLINGER *et al.*, 1995; MONDOVI & AVIGLIANO, 1984). Outras funções incluem a síntese dos hormônios neurotransmissores (DILIBERTO, DANIELS, VIVEROS, 1991), colágeno, carnitina (REBOUCHE, 1991) e outras substâncias (BLOCK, 1991).

A vitamina C é essencial para a síntese do colágeno do glicosaminoglicano, dos proteoglicanos e auxilia na manutenção de várias enzimas (certas monoxigenases e dioxigenases) e suas formas reduzidas. Por exemplo, o ácido ascórbico serve como redutor para propil e lisil-hidrolases (PADH, 1991; 5. LIAU, *et al* 1993). A propil-hidroxilase converte resíduos propila em colágeno, através da hidroxiprolina. A hidroxiprolina permite uma conformação de tripla-hélice que, polimerizada, resulta em fibras funcionais de colágeno (PETERKOFKY, 1991).

Radicais livres desencadeiam processos de oxidação causando danos ao DNA, enzimas, proteínas e outras macromoléculas. A formação excedente de radicais livres se expressa através do estresse oxidativo (termo utilizado para descrever condições de danos oxidativos as células e quando a relação entre radicais livres e antioxidantes está desequilibrada, sendo favorável aos primeiros) e pode desencadear vários problemas médicos ao organismo, como recuperação demorada de tecidos após trauma, e condições crônicas (arteriosclerose e câncer). Os radicais livres resultam de processos biológicos decorrentes de estímulos exógenos, que são controlados por enzimas e antioxidantes micronutrientes como o ácido ascórbico. Consequentemente, o ácido ascórbico é importante na proteção contra o estresse oxidativo, relacionado com doenças e degeneração associada com envelhecimento, incluindo doenças coronárias, formação de cataratas, e câncer. Considerando a capacidade dos antioxidantes em diminuir os riscos do estresse oxidativo, cresce o consumo destes micronutrientes e o interesse no estudo dos mesmos (ROCK, JACOB, BONEN, 1996; NIKI, 1991; SIES & STAHL, 1995).

Resultados de trabalhos confirmam a hipótese de que a oxidação da LDL é o processo mais importante na gênese da lesão arteriosclerótica. Em estudos laboratoriais, o ácido ascórbico protege completamente lipídeos no plasma e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) contra danos peroxidativos (JIALAL *et al* ., 1990). O ácido ascórbico, o α -tocoferol e o β -caroteno com propriedades antioxidantes, podem inibir a oxidação e evitar a progressão da arteriosclerose (JIALAL, VEGA, GRUNDY, 1990; FREI, 1991). Além disso, como antioxidante, está envolvido no metabolismo do colesterol e na síntese da prostaciclina presente na parede endotelial, mantendo a integridade vascular (SIMON,

1992). Existe uma relação inversamente proporcional entre os níveis de ácido ascórbico e a mortalidade pelas doenças coronárias (estudos epidemiológicos).

A catarata é a principal causa de cegueira no mundo. Num estudo feito em Massachusetts observaram-se 15 % de prevalência de cataratas em pessoas com 55 anos de idade ou mais, elevando-se o índice a mais de 45 % em sujeitos acima de 75 anos de idade (KAHN, 1997). Existe interesse no estudo do envolvimento de antioxidantes com a catarata senil, devido aos níveis altos de ácido ascórbico nas lentes humanas. Em um estudo envolvendo 50.528 mulheres americanas, o risco de desenvolverem catarata foi 45 % menor naquelas que tomaram um suplemento de vitamina C por mais de 10 anos (HANKINSON *et al.*, 1992). O suplemento mais frequentemente utilizado é de 250 a 500 mg de ácido ascórbico. Os resultados dos estudos em andamento (GARLAND, 1991; GERSHOFF, 1993) apresentam um suporte para a hipótese de que este antioxidante participa da prevenção de cataratas.

Muitos mecanismos estão sendo propostos para explicar a influência da vitamina C na prevenção de tumores. O ácido ascórbico captura radicais livres e reduz o nitrito, impedindo a formação de N-nitrosaminas e nitrosamidas, substâncias que induzem o câncer em animais e, provavelmente, nos homens. A maioria dos trabalhos elaborados com resultados significativos relacionam a vitamina C com a diminuição do risco de câncer no estômago. Outros estudos estão sendo realizados sobre a influência desta vitamina no decréscimo da incidência de outros tipos de câncer como: cervical, de mama, próstata, esôfago, pâncreas, cólon e ovários (SAUBERLICH, 1994).

Umas das teorias sobre a causa da doença de Parkinson é que o estresse oxidativo contribui para a degeneração dos neurônios. O α -tocoferol, junto ao ácido ascórbico, com suas propriedades antioxidantes, diminui a quantidade de radicais livres no cérebro, o que retarda a evolução desta doença degenerativa (MOERTEL *et al.*, 1985; FAHN, 1989; BLOCK, 1991).

Outros trabalhos científicos indicam que a vitamina C é importante para o funcionamento normal de linfócitos-T e para a efetiva atividade fagocitária dos leucócitos

(VALLANCE, 1979; COOK & MONSEN, 1977; MOSER, 1987). Apresenta também uma ação amenizadora nos sintomas de enfermidades do trato respiratório, como infecções e bronquites (MOHSENIN & DuBOIS, 1987). A deficiência de vitamina C desencadeia desequilíbrio nutricional, traduzindo-se por perda de peso e anemia acentuada, que favorecem o aparecimento de doenças infecciosas. Sabe-se que o ácido ascórbico participa do metabolismo do folato, mas não se conhece seu papel exato na eritropoiese.

A absorção de ferro no organismo é aumentada pela vitamina C. A capacidade redutora da vitamina C é importante para o metabolismo do ferro, na sua incorporação à ferretina e na catálise da redução de forma férrica para a ferrosa. Doses de 50 a 100mg de ácido ascórbico são utilizadas nos estudos feitos para demonstrar o aumento de absorção do ferro (HALLBERG, BRUNE, ROSSANDER- HULTHEN, 1989; HUNT *et al.*, 1990; HOFFMAN, YANELLI, BRIGES, 1991).

Preparações de vitamina C.

Existe uma grande variedade de especialidades farmacêuticas contendo o ácido ascórbico ou este ingrediente ativo junto a outras vitaminas (complexo vitamínico e suplementos alimentares), com larga produção e venda. O ácido ascórbico é comercializado no Brasil, principalmente na forma livre, mas também como sal sódico e cálcico. Em outros países é também comercializado o palmitato de ascorbila. Apresenta-se sob a forma de pó ou cristais brancos ou amarelos inodoros, sendo usado extensivamente na indústria alimentícia e em medicamentos (DAVIES *et al.*, 1991). As concentrações de ácido ascórbico em amostras biológicas podem ser expressas em unidades internacionais (U.I.). Uma U. I. equivale à atividade de 0,05 mg de ácido L-ascórbico, sendo portanto, de 20000 U.I. a atividade biológica para 1g de vitamina C (FRANCO, 1992).

Os métodos químicos para a determinação do ácido ascórbico baseiam-se em particular nas suas propriedades redutoras, cujo conhecimento é importante para a preparação e conservação de alimentos e medicamentos e para os métodos analíticos de identificação e dosagem do ácido ascórbico. Este também é empregado na purificação de algumas soluções extrativas e na eliminação de oxidantes que possam interferir nos métodos de doseamento de outros fármacos (COSTA *et al*, 1986).

2. OBJETIVO

Com base no modelo farmacocinético, que consiste nas medidas das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico e na determinação de parâmetros adequados das formulações, o objetivo deste estudo é avaliar a biodisponibilidade comparativa de três formulações comerciais de ácido ascórbico: duas padrões, CewinTM (ação prolongada, Sanofi Winthrop) e RedoxonTM (Roche), com CelongTM (ação prolongada, Withehall).

A partir deste objetivo outros são atingidos, como: aprendizagem da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), desde o tratamento das amostras até o conhecimento e operação do equipamento envolvido; maior compreensão da farmacocinética aplicada; utilização e interpretação dos métodos estatísticos.

3. MÉTODOS E MATERIAIS

3.1. Seleção dos voluntários

Neste ensaio clínico empregamos normas requeridas pelo FDA (higidez dos voluntários, administração dos fármacos em jejum e delineamento do protocolo clínico).

Neste estudo foram selecionados 18 voluntários sadios do sexo masculino, com idade entre 22 e 50 anos (média = 32 ± 2), peso entre 55,5 e 90 kg (média = 73 ± 2), dentro dos 15% do peso corporal ideal.

A seleção dos voluntários foi realizada através de consulta médica, incluindo anamnese e exame físico, além de eletrocardiograma e exames laboratoriais que colaboraram para a confirmação do estado de higidez. Em uma avaliação clínica não apresentaram sinais ou sintomas evidentes de doenças cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica ou psiquiátrica. Os exames laboratoriais não mostraram alterações (hemograma completo, velocidade de hemossedimentação, uréia, creatinina séricas, transaminases, fosfatase alcalina, gamma GT, bilirrubina total, glicemia, ácido úrico, sódio, potássio, cloreto, urina I e protoparasitológico). Esta avaliação ocorreu no mínimo quatro semanas antes da internação.

A exclusão dos voluntários teve como base os seguintes critérios: indivíduos que tenham participado em outros estudos nos últimos três meses; que tenham recebido medicação regularmente há menos de um mês; com estória de alcoolismo e abuso de drogas, que ingerem mais de quatro unidades de álcool por dia (1 unidade = 1/2 copo de cerveja); que possuam peso acima de 100 kg ou 15% abaixo do peso ideal, de acordo com a Metropolitan Life Insurance Tables.

Após a avaliação criteriosa dos resultados dos exames acima mencionados, foram selecionados os voluntários que, após terem suas dúvidas pessoais esclarecidas assinaram o termo de consentimento para o estudo.

3.2. Protocolo clínico

Os voluntários selecionados foram submetidos a uma dieta restrita de vitamina C, duas semanas antes da internação (para este ensaio clínico faz-se necessária a depleção de vitamina C). Os voluntários foram internados às 20:00 h na Unidade de Internação da Farmacologia Clínica (hospital da UNICAMP), no dia anterior à administração das formulações em estudo e foram mantidos no hospital ainda durante 24 horas após a ingestão da vitamina C. Os medicamentos foram administrados após jejum de 6 horas; as refeições fornecidas durante o período de internações foram padronizadas. Após a internação do hospital, nas 24 horas seguintes, já em casa, tiveram dieta devidamente orientada.

Após a administração das formulações, líquidos foram permitidos de acordo com as necessidades dos voluntários internados; líquidos que contêm princípios ativos como xantina e cafeína (existentes em chá, refrigerantes e café) foram excluídos da dieta, como qualquer tipo de medicação. O consumo de álcool não foi permitido 48 horas antes da internação e durante a mesma. Durante as 3 primeiras horas após a ingestão dos medicamentos, foi permitida a ingestão de apenas 200 ml de água comum.

O estudo consistiu em três períodos (de 48 horas) abertos, cruzados e aleatórios, com um intervalo de 14 dias entre cada fase. As amostras de plasma para o estudo do ácido ascórbico foram obtidas primeiramente de uma coleta que antecedeu a administração das formulações e posteriormente, em intervalos, durante 48 horas após a dosagem. Em cada fase administrou-se uma dose única correspondente às formulações padrões Cewin™ (ação prolongada, Sanofi Winthrop) e Redoxon™ (Roche) e Celong™ (ação prolongada, Whitehall). A dose administrada foi de 1000 mg (1 comprimido de Redoxon, 2 comprimidos de Cewin e 2 de Celong) de vitamina C. A coleta teve início às 7:00 h.

A observação da pressão arterial sistêmica e da frequência do pulso dos pacientes fizeram parte do acompanhamento dos voluntários durante a internação.

A internação seria interrompida se aparecessem reações adversas ao medicamento, efeitos colaterais, significantes alterações no exame de acompanhamento e por motivo de doença, requerendo-se uma administração medicamentosa. Os voluntários foram questionados no decorrer da internação devido à possível presença de tais reações.

O ensaio clínico transcorreu normalmente, não tendo sido verificadas reações adversas e variações na pressão arterial sistêmica ou frequência de pulso. Exames laboratoriais realizados após as internações não apresentaram alterações.

O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

3.3. Drogas e Reagentes

Os reagentes utilizados para o método de quantificação de ácido ascórbico por CLAE foram os seguintes.

- Ácido L- ascórbico (99,7%), Merck Ind. Quim.
- EDTA dipotássico (99%), Vetec Química Fina Ltda.
- Ácido metafosfórico (98%), Reagenti Carlo Erba
- Ácido acético glacial (99,8%), Merck Ind. Quim.
- Acetato de sódio (95.5%), Merck Ind. Quim.
- Iodo ressublimado (99.5,%), Merck Ind. Quim.
- Iodeto de potássio (95%), Merck Ind. Quim.
- Tiosulfato de sódio (95,5), Merck Ind. Quim.
- orto-fenilodiamina, OPD (100%), Sigma.
- Fosfato dissódico, Na_2HPO_4 (99%), Merck Ind. Quim.
- Metanol (99%) para cromatografia , Merck Ind. Quim.

As soluções aquosas foram preparadas com H₂O deionizada (Milli-Q plus, Millipore, USA) , sendo a sua resistividade > 18.2 Mohm. cm.

3.4. Coleta e preparação das amostras

Durante a internação foram coletadas amostras de sangue da veia do antebraço (10 ml) para a determinação das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico às: 0:00; 0:30; 1:00; 2:00; 3:00; 4:00; 5:00; 6:00; 8:00; 10:00; 12:00; 14:00; 16:00; 18:00; 20:00; 22:00; 24:00 e 48:00 horas após a administração de preparações contendo 1000 mg do ácido.

A técnica utilizada consistiu em coletar as amostras de sangue em EDTA dipotássico (1 mg/ml de sangue total). O sangue foi estocado a 4°C e protegido da luz. Antes de completar 30 minutos, as amostras foram centrifugadas em 2000 g a 4°C, por 15 minutos, também protegidas da luz. Em seguida, adicionaram-se 250 µl de ácido metafosfórico em 250 µl de plasma, agitando-se vigorosamente ou em vórtex por 15 segundos, para precipitação das proteínas e estabilização do ácido ascórbico. As amostras foram centrifugadas novamente nas condições acima e separou-se o sobrenadante das mesmas, estocado em alíquotas (duplicatas) a -20°C.

Na doseamento do ácido ascórbico utilizaram-se 100 µl da amostra. As amostras foram protegidas da luz durante todo o tempo de experimentação. A estabilidade do ácido ascórbico após o processo de desproteinização é, no máximo, de 5 semanas, mesmo quando as amostras são armazenadas no escuro e em temperatura de -20°C. Após este período ocorre degradação e consequentemente reduz-se a concentração.

3.5. Metodologia de análise.

As concentrações plasmáticas de ácido ascórbico total (ácido ascórbico + desidroascórbico) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE),

em coluna de fase reversa e detecção por fluorescência, conforme o método proposto por SPEEK *et al.* (1984).

Neste estudo, o ácido ascórbico foi oxidado para ácido desidroascórbico. A posterior adição de ortofenilodiamina (OPD) resultou na formação de um produto fluorescente, que foi identificado e representa o ácido ascórbico total. Na Figura 2 podemos observar a formação do composto detectável por fluorescência (KEATING & HADDAD, 1982).

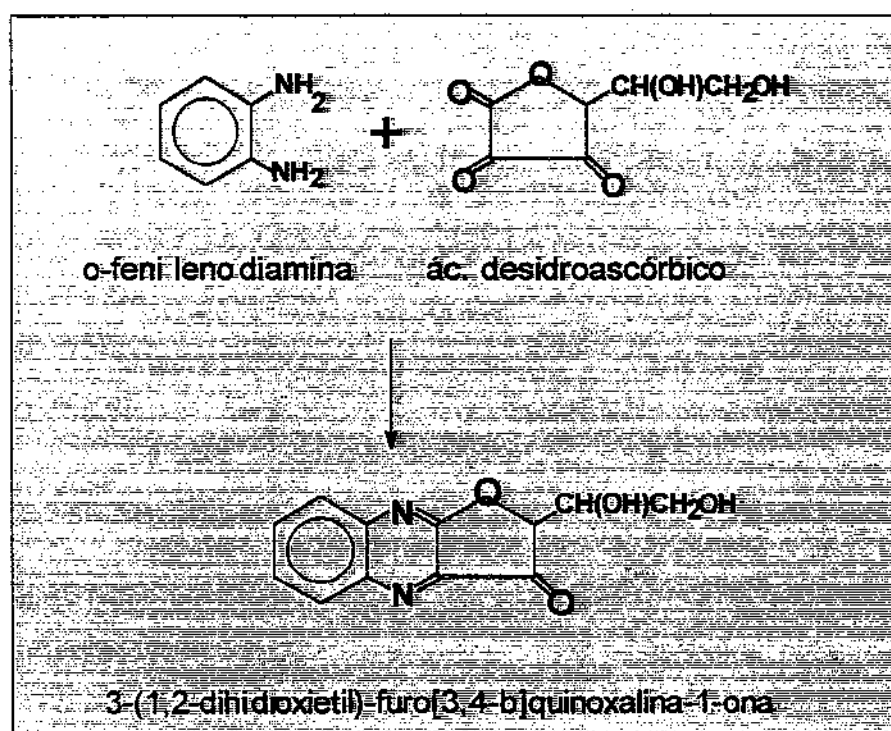


Figura 2 - Formação do derivado quinoxalínico (DFQ)

Para a elaboração da curva de calibração utilizou-se uma mistura de plasmas, obtidos das amostras de sangue colhidas dos voluntários antes da administração da droga. A esta mistura foram adicionadas quantidades conhecidas de ácido ascórbico. A preparação da curva de calibração (5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) foi feita diariamente, no decorrer do estudo.

O preparo das amostras é feito com 100 μl de cada uma delas ou de cada ponto da curva padrão em tubo de polipropileno (5 ml). A seguir, adicionaram-se 250 μl de tampão acetato 4,5 M, pH 6,5 (acetato de sódio 4,5 M); este pH só pode ser atingido

mediante o uso de tampão suficientemente concentrado. Após agitação, acrescentou-se a cada amostra 100 µl de iodo (10% m/ v) em solução de iodeto de potássio (0.3M). Após nova agitação vigorosa, estas amostras foram incubadas por 10 minutos na temperatura ambiente e protegidas da luz. Desta forma, o ácido ascórbico total foi oxidado para desidroascórbico. O excesso de iodo foi reduzido com 100 µl de solução 0,5M de tiosulfato de sódio. Finalmente, foram adicionados 550 µl de uma solução aquosa de ortofenilenodiamina (1,12 mg/ ml), sendo as amostras incubadas por 45 minutos, protegidas da luz e em temperatura ambiente. A adição de OPD resultou na formação de aduto fluorescente (derivado quinoxalínico) e assim obtidas foram conservadas a 4°C, por um período de 12 horas, após terminada a reação. As amostras foram centrifugadas (por 2 minutos, 2000 g) antes da injeção dos 100 µl no sistema cromatográfico.

Todas as amostras de cada voluntário foram analisadas dentro de um mesmo ensaio para evitar variações interensaios.

3.6. Condições cromatográficas

A fase móvel (tampão Na₂HPO₄ 25mM, pH = 7,0/ metanol/ H₂O: 43/23/32) foi bombeada através de uma coluna de fase reversa (µBondapack C18, 5 µm, 300 × 3,9 mm. Millipore- Waters, USA), na vazão de 1,5 ml/min.

O sistema cromatográfico consiste de uma bomba Shimadzu LC-10 AD, acoplada a um detector de fluorescência Shimadzu, modelo RF-535, com a leitura realizada em comprimento de onda de excitação de 360nm e de emissão de 402nm. O sinal de saída foi anotado em um registrador gráfico Bryans 28000 (Bryans Southern Instruments, Grã-Bretanha). As amostras foram injetadas manualmente mediante o injetor Rheodyne 7126, provido de um "loop" com volume fixo de 200µl.

Houve preparação diária de todos os tampões e semanal dos reagentes.

Nas condições descritas acima, o tempo de retenção do derivado do ácido ascórbico foi de 8 ($\pm 0,1$) minutos.

3.7. Análise estatística e farmacocinética

As curvas individuais das concentrações plasmáticas do ácido ascórbico, em função do tempo foram obtidas para cada uma das três formulações. Para se definir a velocidade de absorção do ácido ascórbico determinou-se a concentração plasmática máxima atingida (C_{max}) e o tempo necessário para alcançá-la (T_{max}). Para se determinar a extensão de absorção e metabolismo do ácido ascórbico, as áreas sob as curvas de concentração plasmática *versus* tempo nos períodos de 0 a 12h (AUC_{0-12}) e de 0 a 48h (AUC_{0-48}) foram calculadas segundo o método trapezoidal.

Basicamente, os testes estatísticos aplicados dividem-se em dois grupos: os paramétricos (levam em consideração algum tipo de distribuição populacional) e os não-paramétricos (independentes do tipo de distribuição). Os dados obtidos de C_{max} , AUC_{0-12} e AUC_{0-48} (e as razões individuais) foram analisados estatisticamente, utilizando testes paramétricos (ANOVA) e não paramétricos (WILCOXON STINGANS & DILETTI, 1990).

Utilizaram-se os seguintes programas estatísticos: Shiphar by SIMED S. A.- Centre d'Études et de Researches en Statistiques et Information Medicales; Bioequivalence Program for Two Period Cross-over Studies - version 34, by Herman P. Wijnand.

4. RESULTADOS

A **Figura 3** mostra cromatogramas típicos obtidos pelo método descrito. O painel 3a mostra o perfil cromatográfico a partir da amostra colhida antes da administração da droga, onde se pode verificar a presença de um pico referente ao ácido ascórbico basal. O painel 3b mostra um cromatograma obtido a partir do plasma de uma amostra, após 5h da administração de 1000 mg de ácido ascórbico.

A sensibilidade do método é de 5 µg/ml, considerando-se alturas de picos superiores ou iguais a 3 vezes o ruído da linha de base (S/N=3). Considerando as diluições da amostra original de ácido ascórbico plasmático, e que o volume injetado no cromatógrafo é de 100 µl, a sensibilidade do método é de 23ng de ácido ascórbico total.

Oito amostras nas concentrações 5, 25, 75µg/ml da droga em estudo foram analisadas durante o mesmo ensaio, e os coeficientes de variação (CV%) intra-ensaio obtidos foram 4,46, 3,68 e 4,84 % , respectivamente.

Os valores dos coeficientes de variação obtidos na variação inter-ensaio foram 8,03, 8,58 e 3,97% para as concentrações de ácido ascórbico 5, 25, 50µg/ml, respectivamente.

As curvas de calibração apresentaram-se lineares na faixa de 5 a 100 µg/ ml, o coeficiente de regressão médio foi de 0,096 e a inclinação da reta, de $95 \pm 1,01$.

Foram calculados os níveis basais de ácido ascórbico antes da administração de Celong ($4,6 \pm 0,7 \mu\text{g/ ml}$), Redoxon ($3,3 \pm 0,6 \mu\text{g/ ml}$), e Cewin ($4,0 \pm 0,6 \mu\text{g/ ml}$).

Os níveis médios de ácido ascórbico basal foram determinados antes dos três períodos de internação que constituíram o ensaio clínico, apresentando os valores seguintes: $2,2 \pm 0,6 \mu\text{g/ ml}$ antes do primeiro período; $4,1 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$, antes do segundo, significativamente maior ($p < 0,01$) do que se observou no período anterior e $5,6 \pm 0,5 \mu\text{g/ ml}$

no terceiro, significativamente maior ($p < 0,01$) do que os valores observados no segundo período de internação.

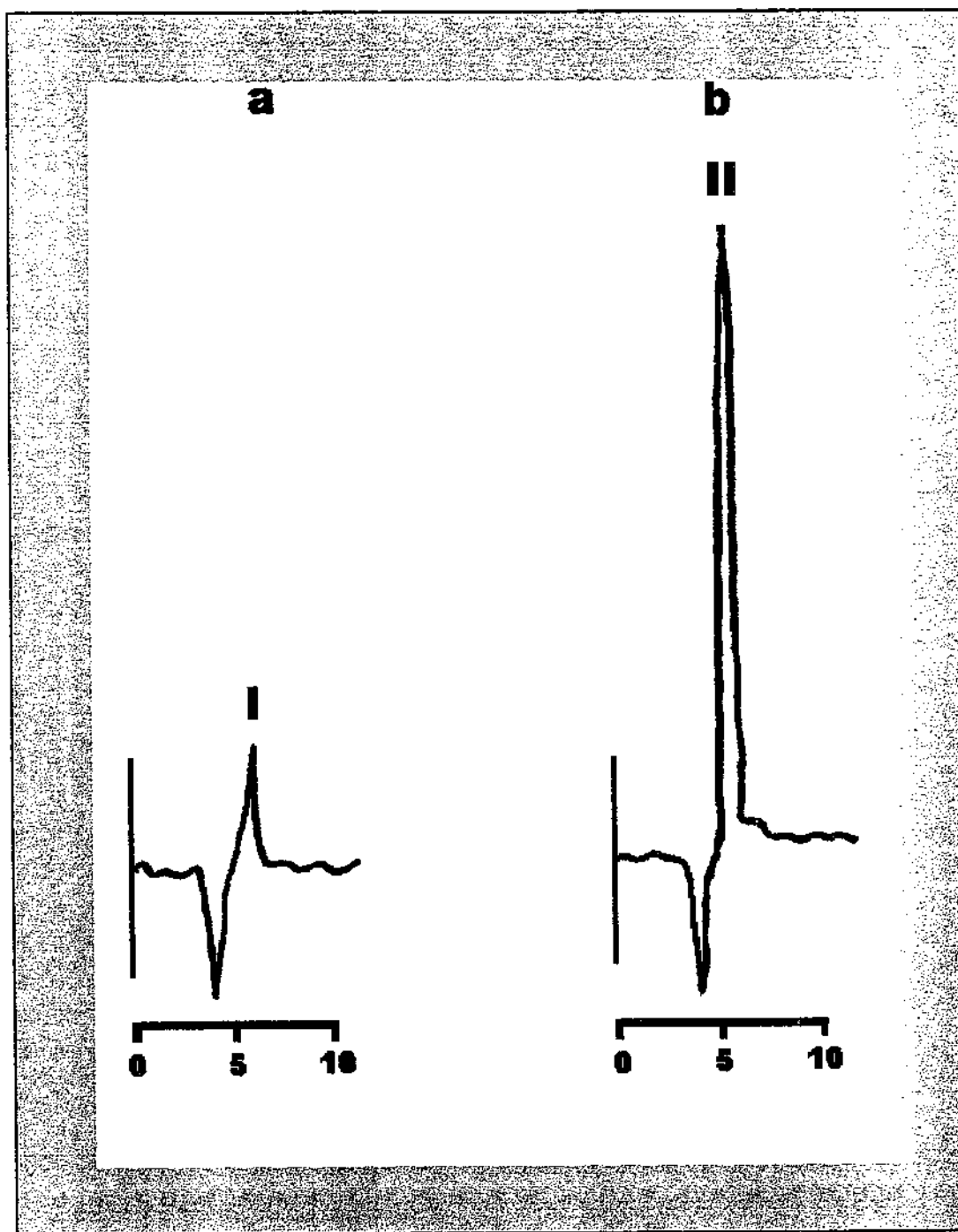


Figura 3 - Cromatogramas referentes à análise de ácido ascórbico em plasma . (a) Plasma branco, indicando a presença de um pico endógeno; (b) amostra de plasma obtida após 5 horas de administração oral de 1000 mg de ácido ascórbico. Pico I- ácido ascórbico

endógeno (4,9 µg/ ml) e pico II- ácido ascórbico (23,5 µg/ ml). Condições cromatográficas: coluna, µBondapack C18, 5 µm, 300 × 3,9 mm; fase móvel tampão Na₂HPO₄ 25 mM, pH = 7,0/ metanol/ H₂O: 43/ 23/ 32; vazão de 1,5 ml/min; e detecção por fluorescência.

A porcentagem de recuperação foi calculada para as concentrações de 5 µg/ml e 10 µg/ml. Foi observada uma recuperação de 60% para concentrações de 5 µg/ml e de 69% para aquelas de 10 µg/ml.

O ensaio clínico transcorreu normalmente, não sendo relatados qualquer efeito colateral ou reações adversas pelos 17 voluntários sadios que participaram do estudo (voluntário n.º 6 não compareceu às internações), comprovando que as três preparações farmacêuticas de ácido ascórbico (Celong[®], Cewin[®] e Redoxon[®]) foram bem toleradas. A **tabela I** apresenta a sequência de administração das três formulações de ácido ascórbico nos 17 voluntários sadios.

Os exames laboratoriais anteriores e posteriores ao ensaio clínico não apresentaram valores fora do intervalo de referência.

A **Figura 4** mostra as médias das concentrações plasmáticas em função do tempo para o ácido ascórbico, após a administração de dois comprimidos de 500 mg de cada formulação (Celong[®] e Cewin[®]) e de um comprimido efervescente de 1000 mg (Redoxon[®]) em 17 voluntários sadios.

Tabelas VI, VII, VIII mostram as médias das concentrações plasmáticas do ácido ascórbico para cada uma das três formulações e os desvios padrão correspondentes nos intervalos de tempos determinados.

Calcularam-se os parâmetros farmacocinéticos obtidos para as três preparações farmacêuticas de ácido ascórbico e as médias geométricas e aritméticas das AUC_[0-12], AUC_[0-48] e C_{max} e respectivos intervalos de confiança foram comparados entre as três formulações (**Tabela II**). Também foram calculados mediana e intervalo de confiança para T_{max} para as três formulações (**Tabela II**).

A análise estatística das razões individuais dos parâmetros $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} e as diferenças individuais de T_{max} , para Celong®/ Cewin® após a administração de uma única dose de 1000 mg de ácido ascórbico de cada preparação em 17 voluntários sadios, são apresentadas na tabela III. A tabela IV apresenta análise estatística das razões individuais dos parâmetros $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} e as diferenças individuais de T_{max} , para Celong®/ Redoxon® e a tabela V a análise de Redoxon®/ Cewin®.

Os dados da concentração individual *versus* tempo (Figuras - Vol I a XVIII) e parâmetros farmacocinéticos individuais (Tabelas correspondentes as figuras) são apresentados no anexo.

TABELA I. Sequência de administração de três formulações de ácido ascórbico em 17 voluntários sadios.

Voluntário	Período I	Período II	Período III
1	Cewin	Celong	Redoxon
2	Redoxon	Celong	Cewin
3	Cewin	Redoxon	Celong
4	Redoxon	Cewin	Celong
5	Celong	Redoxon	Cewin
6	Cewin	Redoxon	Celong
7	Celong	Cewin	Redoxon
8	Redoxon	Celong	Cewin
9	Celong	Redoxon	Cewin
10	Redoxon	Cewin	Celong
11	Cewin	Celong	Redoxon
12	Celong	Cewin	Redoxon
13	Cewin	Celong	Redoxon
14	Celong	Redoxon	Cewin
15	Cewin	Redoxon	Celong
16	Redoxon	Celong	Cewin
17	Redoxon	Cewin	Celong
18	Celong	Cewin	Redoxon

TABELA II - Principais parâmetros farmacocinéticos de três formulações diferentes obtidos após dose única de 1000 mg de ácido ascórbico em 17 voluntários do sexo masculino e sadios. IC: intervalo de confiança. DP: desvio padrão.

Parâmetros	Celony	Cewin	Redoxon
AUC ₀₋₄₈ (µg. h. ml ⁻¹)			
Média geométrica (IC 90%)	381 (324 - 447)	390 (342 - 445)	403 (354 - 459)
Média Aritmética (DP)	402 (114)	407 (114)	422 (120)
AUC ₀₋₁₂ (µg h ml ⁻¹)			
Média geométrica (IC 90%)	121 (104 -141)	119 (106-133)	126 (111 - 142)
Média Aritmética(DP)	127,4 (36,9)	122,6 (30,6)	130.8 (37,7)
C _{max} (µg / ml)			
Média geométrica (IC 90%)	14 (12,1 - 16,1)	13,8 (12,4 - 15,5)	14,8 (13,1 - 16,6)
Média Aritmética (DP)	14,6 (4,0)	14,2 (3,5)	15,0 (4,2)
T _{max} (h)			
Mediana	4,5	5	4
Intervalo	(2 - 8)	(3 - 8)	(2 - 14)
C _{max} /AUC ₀₋₄₈ (h ⁻¹)			
Média geométrica			
IC 90%	0,0370 0,034 - 0,040	0,035 0,033 - 0,038	0,036 0,034 - 0,038
C _o (µg / ml)			
Média Aritmética			
DP	4,6 2,9	4,0 2,6	3,3 2,6

TABELA III - Análise estatística das razões individuais de parâmetros de $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} , C_{max} / AUC_{0-48} e as diferenças individuais de T_{max} e C_0 obtidas para três formulações após a administração de dose única de 1000 mg de ácido ascórbico em 17 voluntários sadios (Celong e Cewin).

CELONG / CEWIN	PARAMÉTRICO		NÃO PARAMÉTRICO	
	Média Geométrica	IC 90%	Ponto Estimado	IC 90%
AUC_{0-48}	97,8	86,1 - 110,9	101,9	89,9 - 110,2
AUC_{0-12}	105,9	92,0 - 121,7	107,7	91,9 - 121,5
C_{max}	100,9	85,9 - 118,4	103,2	85,7 - 124,1
T_{max}	0,2 ^b	-0,7 - 1,2 ^c	0,24	-0,5 - 1,0
C_{max} / AUC_{0-48}	103,9	94,4 - 114,2	103,3	94,1 - 112,3
C_0	0,5 ^b	-1,1 - 2,2 ^c	0,6	-0,3 - 2,0

^a Segundo Hauschke *et al.* e o FDA (USA), os resultados não paramétricos são expressos como ponto estimado e 90% de intervalo de confiança (IC) das razões individuais, exceto para T_{max} (expresso como ponto estimado e 90% IC das diferenças individuais). ^b Média aritmética das diferenças. ^c 90% IC das diferenças individuais.

TABELA IV - Análise estatística das razões individuais de parâmetros de $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} , C_{max} / AUC_{0-48} e as diferenças individuais de T_{max} e C_0 obtidas para três formulações após a administração de dose única de 1000 mg de ácido ascórbico em 17 voluntários sadios (Cewin e Redoxon).

CELONG / REDOXON	PARAMÉTRICO		NÃO PARAMÉTRICO	
% RAZÕES	Média Geométrica	IC 90%	Ponto Estimado	IC 90%
AUC ₀₋₄₈	93,6	83,20- 105,6	97,1	90.2 - 104,6
AUC ₀₋₁₂	94,7	81,5 - 110,1	92,8	81,8 - 101,8
C _{max}	94,9	81,2 - 101,0	98,7	82,3 - 108,9
T _{max}	0,11 ^b	1 - 1,4 ^c	0,11	-0,5 - 1,5
C _{max} / AUC ₀₋₄₈	102,7	95,7 - 110,3	105,7	96,1 - 111,3
C ₀	1,3 ^b	-0,3 - 2,8 ^c	1,0	-0,05 - 2,8

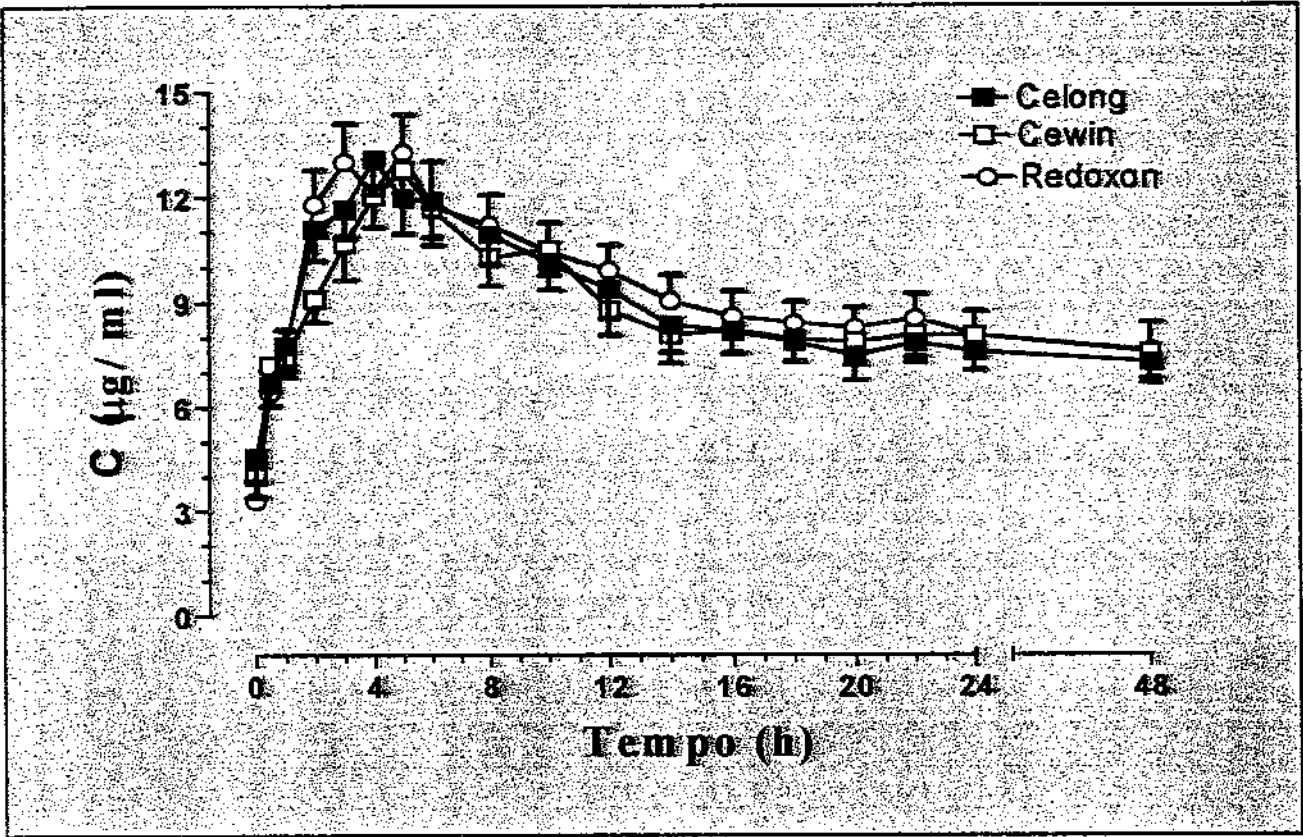
^a Segundo Hauschke *et al.* e o FDA (USA), os resultados não paramétricos são expressos como ponto estimado e 90% de intervalo de confiança (IC) das razões individuais, exceto para T_{max} (expresso como ponto estimado e 90% IC das diferenças individuais). ^b Média aritmética das diferenças. ^c 90% IC das diferenças individuais.

TABELA V - Análise estatística das razões individuais de parâmetros de $AUC_{[0-12]}$, $AUC_{[0-48]}$, C_{max} , C_{max} / AUC_{0-48} e as diferenças individuais de T_{max} e C_0 obtidas para três formulações após a administração de dose única de 1000 mg de ácido ascórbico em 17 voluntários sadios (Redoxon e Cewin).

REDOXON/CEWIN	PARAMÉTRICO		NÃO PARAMÉTRICO	
% RAZÕES	Média Geométrica	IC 90%	Ponto Estimado	IC 90%
AUC ₀₋₄₈	104,8	94,8 - 116,0	105,1	95,1 - 118,1
AUC ₀₋₁₂	110,5	101,5 - 120,3	111,9	99,9 - 121,3
C _{max}	107,1	95,5 - 120,0	105,9	92,1 - 124,5
T _{max}	0,6 ^b	-0,8 - 2,0 ^c	0,0	-1,0 - 2,0
C _{max} / AUC ₀₋₄₈	103,9	94,4 - 114,2	103,3	94,1 - 112,3
C ₀	-0,7 ^b	-2,3 - 0,8 ^c	-0,5	-2,1 - 0,5

^a Segundo Hauschke *et al.* e o FDA (USA), os resultados não paramétricos são expressos como ponto estimado e 90% de intervalo de confiança (IC) das razões individuais, exceto para T_{max} (expresso como ponto estimado e 90% IC das diferenças individuais). ^b Média aritmética das diferenças. ^c 90% IC das diferenças individuais.

CONCENTRAÇÃO MÉDIA



	Celong	Cewin	Redoxon
AUC _[0-48] (µg/ml*h) (DP)	402 (114)	407 (114)	422 (120)
C _{max} (µg/ml) (DP)	14,6 (4,0)	14,2 (3,5)	15,0 (4,2)
T _{max} (h). Mediana (Faixa)	4,5 (2 - 8)	5 (3 - 8)	4 (2 - 6)

Figura 4 - Concentrações plasmáticas médias (média ± DP) de ácido ascórbico em função do tempo para as três formulações. Os dados correspondem a média de 17 voluntários, os quais receberam uma dose única de 1g do ingrediente ativo.

*

Tabela VI - Média das concentrações plasmáticas do ácido ascórbico (formulação CewinTM - ação prolongada da Winthrop) *versus* tempo e desvio padrão (DP).

Winthrop		
Cewin TM (ação prolongada)		
Tempo	Média	D.P.
0	4,0	2,6
0,5	7,2	2,9
1	7,4	2,3
2	9,1	2,8
3	10,7	4,2
4	12,0	3,7
5	12,8	2,7
6	11,7	4,4
8	10,3	3,3
10	10,5	3,0
12	8,8	3,1
14	8,1	3,4
16	8,2	2,8
18	7,9	2,6
20	7,9	2,9
22	8,1	2,7
24	8,1	2,7
48	7,6	3,1

Tabela VII- Média das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico (formulação Redoxon™ da Roche) *versus* tempo e desvio padrão (DP).

Roche
Redoxon™

Tempo	Média	D.P.
0	3,3	2,6
0,5	6,4	2,8
1	7,7	2,3
2	11,8	4,0
3	13,0	4,5
4	12,1	4,0
5	13,3	4,4
6	11,7	5,3
8	11,2	3,5
10	10,4	3,4
12	9,9	2,9
14	9,1	3,1
16	8,6	2,9
18	8,4	2,5
20	8,3	2,4
22	8,5	2,8
24	8,1	2,8
48	7,6	3,3

Tabela VIII- Média das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico (formulação Celong™ - ação prolongada da Withehall) *versus* tempo e desvio padrão (DP).

Withehall

Celong™ (ação prolongada)

Tempo	Média	D.P.
0	4,6	2,9
0,5	6,7	2,6
1	7,8	2,9
2	11,1	3,7
3	11,7	3,4
4	13,1	4,2
5	12,0	4,3
6	11,9	4,2
8	10,9	3,5
10	10,1	3,2
12	9,4	3,6
14	8,4	3,3
16	8,2	2,7
18	7,9	2,4
20	7,5	2,9
22	7,8	2,4
24	7,6	2,3
48	7,3	2,5

5. DISCUSSÃO

Vários estudos empregando CLAE foram realizados para a determinação do ácido ascórbico total ou vitamina C em plasma, como também sua forma reduzida e oxidada separadamente. Estes trabalhos avaliaram os tipos de eluentes, de coluna, sistemas de detecção e técnicas de extração, devido à instabilidade do ácido ascórbico e do desidroascórbico (KACEM *et al*, 1986 ; KEATING & HADDAD 1982; FELTON & HALVER, 1989, TANISHIMA & KITA, 1993; MARGOLIS, ZIEGLER, HELZLSOUER, 1991; MARGOLIS, & DAVIS, 1988). O doseamento da concentração de ácido ascórbico total é um procedimento válido, pois a duas formas de vitamina C possuem a mesma atividade biológica.

O ácido ascórbico é determinado facilmente por CLAE, com detecção UV, mas o ácido desidroascórbico possui baixa absorbância de luz no UV, estando, portanto, sujeito à interferência de absorbâncias de outras substâncias presentes nas amostras (ROSS, 1994; KACEM *et al*, 1986). Quando se utiliza faixa de absorbância de luz baixa, os solventes devem possuir alto teor de pureza (BAKER *et al*, 1983).

O método por CLAE e detecção eletroquímica apresenta boa sensibilidade, mas gasta-se longo período de tempo para estabilização do equipamento. Deste modo, torna-se uma metodologia trabalhosa para a análise de um grande número de amostras (IWASE, 1992; TSAO & SALIMI, 1982).

Métodos baseados na detecção por fluorescência (SEEPK *et al*, 1984) como o utilizado neste estudo, são bastante específicos, proporcionam boa sensibilidade e cromatogramas sem a presença de picos interferentes (PEINADO, TORIBIO, PÉREZ-BENEDITO, 1987; VANDERSLICE & HIGGS, 1984). O sistema cromatográfico

apresenta rápida estabilização. O tempo para análise é relativamente curto, proporcionando análise de um número grande de amostras.

SEEPK *et al* (1984) desenvolveram um método por CLAE baseado em uma oxidação enzimática (ascorbato oxidase), utilizando uma pré-coluna, na qual ocorre a reação. Esta pré-coluna deve estar nas condições ideais de pH e temperatura para atividade enzimática. Entretanto, com a utilização do iodo para a oxidação, a técnica torna-se mais simples.

O fármaco com propriedade de fluorescência deve possuir um anel aromático adequado para conduzir um sinal mensurável. Os ensaios de fluorescência podem ser tornar ainda mais sensíveis através da modificação química da substância analisada, para estimular sua luminescência (conversão em produtos de condensação altamente fluorescente), como no caso do ácido desidroascórbico, que é sujeito a uma reação de derivatização com o OPD (KEATING & HADDAD, 1982).

O derivado quinoxalínico, estocado à temperatura de 4°C e protegido da luz, tem seu tempo de estabilidade aumentada. É recomendável que todo o procedimento seja feito no escuro (SEEPK *et al*, 1984).

A desproteínização do plasma com ácido metafosfórico 10%, previamente às reações de oxidação para ácido desidroascórbico e posterior complexão com o OPD formando um aduto, oferece as vantagens de que 1) nesse pH a molécula de ácido ascórbico mostra uma maior estabilidade e 2) há bom rendimento da precipitação das proteínas plasmáticas. O ácido ascórbico é facilmente oxidado quando ocorre a desproteínização do plasma, quando o oxigênio é liberado da oxi-hemoglobina. Devido a esta oxidação, ao transporte e ao acondicionamento das amostras podem ocorrer erros na dosagem.

Os cuidados tomados durante a coleta das amostras como também na preparação e estocagem das soluções plasmáticas de ácido ascórbico devem-se à instabilidade do ácido ascórbico em solução aquosa, em temperaturas maiores de 4 °C e na presença de luz. Estes efeitos foram comprovados pela diminuição das alturas dos picos,

evidenciando a sua degradação. O controle do tempo das reações, temperatura e a proteção da luz foram rigorosamente respeitados, pois destes fatores depende a reprodutibilidade do método.

Os resultados mostram que há boa linearidade na curva de calibração de dosagem do ácido ascórbico plasmático (plasma contaminado), nas concentrações entre 5 e 100 µg/ml.

O método de determinação do ácido ascórbico aqui utilizado apresentou boa sensibilidade, precisão e pouca variabilidade, o que o credencia a ser utilizado nas análises das amostras dos voluntários.

No presente trabalho, todos os voluntários foram submetidos a uma dieta isenta de ácido ascórbico por um período de duas semanas, a fim de minimizar a variabilidade individual. Após o término da dieta, deu-se início ao estudo e os valores basais de ácido ascórbico foram determinados individualmente, para cada uma das formulações utilizadas, não sendo observada diferença significativa antes da administração de cada uma das formulações [Celong ($4,6 \pm 0,7$ µg/ ml), Redoxon ($3,3 \pm 0,6$ µg/ ml), e Cewin ($4,0 \pm 0,6$ µg/ ml)]. Entretanto, ao compararmos os valores médios de ácido ascórbico basal anteriores ao primeiro período de internação com os do segundo, diferenças significativas foram encontradas: $2,2 \pm 0,6$ µg/ ml e $4,1 \pm 0,5$ µg/ ml ($p < 0,01$), respectivamente. A mesma diferença significativa foi observada na comparação entre os valores médios de ácido ascórbico basal do terceiro ($5,6 \pm 0,5$ µg/ ml - $p < 0,01$), com aqueles do segundo período de internação. Tais diferenças possivelmente estão relacionadas com o aumento da reserva corporal de ácido ascórbico, durante o decorrer do estudo. Deste modo, considerando-se a variabilidade biológica não controlável de cada voluntário, os valores de ácido ascórbico basal não foram descontados das concentrações plasmáticas individuais. A velocidade de eliminação do ácido ascórbico é inversamente proporcional ao grau do sistema de saturação (PIOTROYSKIJ *et al.*, 1993 ; WAGNER, LINDLEY, COFFIN, 1979). Dessa maneira um nível mais elevado de vitamina C nos dois últimos períodos do estudo pode aparecer devido a saturação na eliminação (NELSON *et al.*, 1978; WAGNER, LINDLEY, COFFIN, 1979).

Quando a curva da concentração plasmática de ácido ascórbico *versus* tempo (Figura.4) foi empregada para mensurar bioequivalência, não houve diferença significativa quanto à extensão de absorção observada entre as três formulações.

Através dos testes estatísticos obtivemos uma razão (formulação teste/formulação de referência) para C_{max} e/ou AUC, expressando um valor médio (transformado por logaritmo ou não) contido num intervalo de confiança de probabilidade variável (90 ou 95%), analisando-se posteriormente a inclusão ou superposição deste com o intervalo do tipo 0,80-1,25.

As razões individuais (Celong®/Cewin® e Celong®/Redoxon®) de $AUC_{[0-48]}$, $AUC_{[0-12]}$ e C_{max} , $C_{max}/AUC_{[0-48]}$ para as três formulações, estão inclusas no intervalo de confiança de 90% requerido para bioequivalência (faixa de 80 a 125%), o que se observa nas Tabelas III e IV.

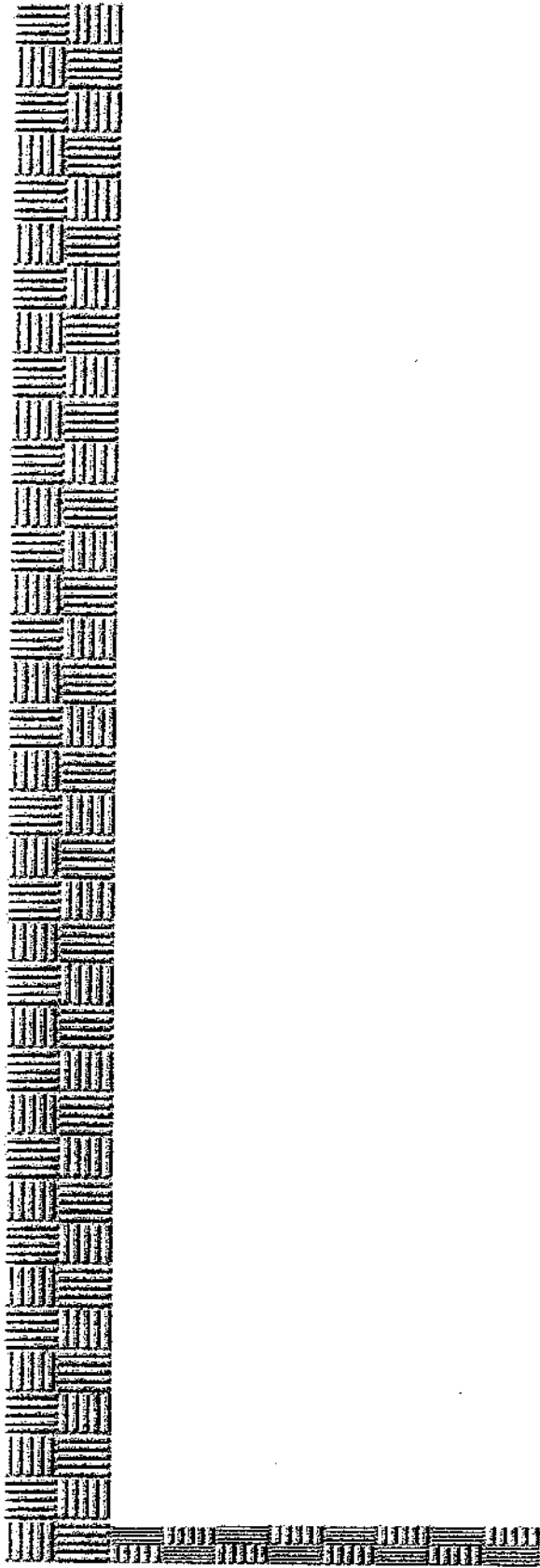
Os valores das diferenças de T_{max} e C_0 estão dentro do intervalo de confiança requerido para acessar bioequivalência (Tabelas III e IV).

Neste estudo foram abordadas formulações de ação prolongada e de ação normal (comprimidos efervescentes), esperava-se encontrar diferenças relacionadas a velocidade de absorção entre as mesmas. Entretanto, isto não foi observado, uma vez que não houve diferença estatística nos parâmetros sugeridos para se avaliar a velocidade de absorção (T_{ma} , C_{max}).

6. CONCLUSÃO

Observando a análise estatística dos resultados obtidos neste estudo de determinação de ácido ascórbico plasmático, utilizando-se a metodologia de CLAE com detecção por fluorescência, podemos concluir que a formulação farmacêutica teste Celong é bioequivalente em relação às duas formulações farmacêuticas utilizadas como referências (Cewin e Redoxon). Também pode-se concluir que na dose de 1g de ácido ascórbico observada em 48 horas não se observaram diferenças significativas entre as formulações de ação prolongada e a de liberação normal (comprimidos efervescentes).

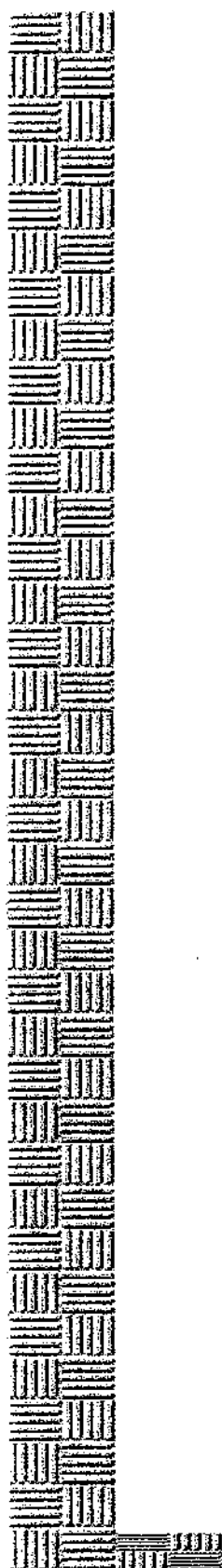
A conclusão sobre a bioequivalência foi baseada nos requerimentos da FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - United State of American.



SUMMARY

This study compares the bioequivalence of three ascorbic acid formulations (test: Celong 500 mg prolonged release tablets from Whitehall; standard: Cewin 500 mg prolonged release tablets from Winthrop and Redoxon oral efervescent 1000 mg tablets from Roche) in seventeen healthy male volunteers. A single oral dose of 1000 mg of the appropriate formulation was administered according to a randomized cross-over way with a two week washout interval between periods. Plasma samples for the HPLC determination of ascorbic acid were obtained before and at set intervals up to 48h after the administration of each formulation. From the plasma concentration vs. time curves obtained for each formulation, the following parameters were obtained: areas under the curves (AUC) from 0 to 12 h and from 0 to 48 h, maximum achieved concentration (C_{max}) and the time at which it occurred (T_{max}). Parametric and non-parametric analysis of individual AUC and C_{max} ratios and T_{max} differences among formulations showed no statistical significance, despite their different patterns of drug release. Based on the above results and in accordance with the European Union and the US Food and Drug Administration, Celong was found to be bioequivalent to both Cewin and Redoxon, and also Cewin was bioequivalent to Redoxon with regard to both the extent and rate of absorption.

Key Words: Ascorbic Acid - Bioequivalence - human pharmacokinetics - high performance liquid Chromatography.



Referências bibliográficas

- ALLEM, L. V. Jr. Chapter 17: Nutritional Products. **Handbook of Nonprescription Drugs**. 10 ed, 1993. p 292-3.
- BAKER, J. K.; KAPEGHIA, J.; VERLANGIERI, A. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in blood plasma samples. **J. Liq. Chromatogr.**, 6: 1319-332, 1991.
- BENDICH, A.; MACHLIN, L.J. ; SCANDURRA, O.; BURTON, G.W. ; WAYNER, D.M. The oxidant role of vitamin C. **Free. Radical. Biol. Med.**, 2: 419-44, 1986.
- BERG, R.A. & KERR, J.S. Nutritional aspects of collagen metabolism. **Ann. Rev. Nutr.**, 12: 369- 90, 1992.
- BERGSTEN, P.; YU, R.; KEHRL, J.; LEVINE, M. Ascorbic acid transport and distribution in human B lymphocytes. **Arch. Biochem. Biophys.**, 317: 208-214, 1995.
- BIGLEY, R.H. & STANKOVA, L. Uptake and reduction of oxidized and reduced ascorbate by human leukocytes. **J. Exp. Med.**, 139: 1084-1092, 1974.
- BLANCHARD, J. Effects of gender on vitamin C pharmacokinetics. **J. Am. Coll. Nutr.**, 5: 453-59, 1991.
- BLANCHARD, J; CONRAD, K. A.; MEAD, R. A.; GARRY, P. J. Vitamin C disposition in young and elderly man. **Am. J. Clin. Nutr.**, 51: 837-45, 1990.
- BLANCHARD, J; CONRAD, K. A.; MEAD, R. A.; GARRY, P. J. Effects of age and intake on vitamin C disposition in females. **Eur. J. Clin. Nutr.**, 44: 447-460, 1990.
- BLOCK, G. Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer. **Am. J. Clin. Nutr.**, 54: 1310S-1314S, 1991.
- BRODY, T. M. Clinical Pharmacokinetics and Dosing Schedules. In _____ - **Human. Pharmacology, Molecular to Clinical**. 2 ed. St. Louis, Mosby, 1994. p 33-48.

- CÁRCAMO, E.C. Biodisponibilidad. In: _____ - **Introducción a la farmacocinética**, Washington, The general secretariat of the organization of American States, 1992. p 77-89.
- CLYDESDALE, F. M.; HO, C.; LEE, C.Y.; MONDY, N.I.; SHEWFELT, R. L. The effects of postharvest treatment and chemical interactions of the bioavailability of ascorbic acid, thiamin, vitamin A, carotenoids, minerals. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, 30(6): 599-638, 1991.
- COOK, J. D. & MONSEN, E. R. Vitamin C, the common cold, and iron absorption. **Am. J. Clin. Nutr.**, 30: 235-241, 1977.
- DILIBERTO, E. J.; DANIELS A. J.; VIVEROS, O. H. Multicompartmental secretion of ascorbate and its dual role in dopamine β -hydroxylation. **Am. J. Clin. Nutr.**, 54: 1163S-72S, 1991.
- DOLLEY, C. **Therapeutic Drugs**. Churchill Livingstone. Edinburgh London Melbourne. New York, Tokio and Madrid, 1991. Vol. I. p A143.
- EIPPER, B. A. & MAINS, R. E. The role of ascorbate in the biosynthesis of neuroendocrine peptides. **Am. J. Clin. Nutr.**, 54: 1153S-6S, 1991
- ENSTROM, J.E. ; KAMIN, L.E. ; KLEIN, M.A. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. **Epidemiology** , 3:194-202, 1992.
- FAHN, S. The endogenous toxic Hypothesis of the etiology of Parkinson's disease and a pilot trial of high dosage antioxidants in attempt to slow the progression of the illness. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 570:186-96, 1989.
- FELTON, S.P & HALVER, J.E. Separation of three commercial forms of vitamin C (ascorbic acid, ascorbic-2-sulfate and ascorbate-2-polyphosphate) by HPLC. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 190: 217-18, 1989.
- FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. 8 ed. 1992. p 53-59.

- FREI, B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 1113S-18S. 1991.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Federal Register, part 320: **Bioavailability and Bioequivalence Requirements**, 154-173. 1985.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - In vivo bioequivalence guidances. *Pharmacopeial Forum*, 19 : 6501-6508, 1993.
- GARLAND, D. L. Ascorbic acid and the eye. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 1198S-1202S, 1991
- GERSHOFF, S. N. Vitamin C (ascorbic acid): New roles, new requirements. *Nutr. Ver.*, 51: 313-326, 1993.
- HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ROSSANDER-HULTHEN, L. Is there a physiological role of vitamin C in iron absorption ? *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 498: 324-32, 1987.
- HANKISON, S.E.; STAMFER, M.J.; SEDDON, J.M.; COLDITZ, G.A.; ROSNER, B. Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study. *Br. Med. J.*, 305: 335-39, 1992.
- HAUSCHKE, D.; STEINIJANS, V.W.; DILETTI, E. A distribution- free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 28: 72-78, 1990.
- HUNT, J.R.; MULLEN, L.M.; LYKKEN, G.I.; GALLAGHER, S. K.; NIESEL, F. H. Ascorbic acid: effect on ongoing iron absorption and status in iron-depleted young women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 51: 649-55, 1990.
- HOFFMAN, K. E.; YANELLI, K.; BRIGES, K. R. Ascorbic acid and iron metabolism: alterations in lysosomal function. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 1188S-92S, 1991
- IWASE, H. Determination of ascorbic acid in elemental diet by high- performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.*, 606: 277- 280, 1992.

- JIALALI I.; VEGA G.L.; GRUNDY S.M. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins. *Atherosclerosis*, 82: 185-91, 1990.
- JOHNSTON, C. S. & LUO, B. Comparison of the absorption and excretion of three commercially available sources of vitamin C. *J. Am. Diet. Assoc.*, 94: 779-782, 1994.
- KACEM, B.; MARSHALL M.R.; MATTEWS; GREGORY J.F. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC with postcolumn derivatization and UV absorbance. *J. Agric. Food. Chem.*, 34: 271-274, 1986.
- KAHN, H.A.; LEIBORVITZ, H.M. ; GANLEY, J.P. ; KINI, M.M.; CALTON, T. The Framingham Eye Study .I.Outline and major prevalence findings . *Am. J. Clin. Epidemiol.*, 196: 17-37, 1977.
- KALLNER, A.; HARTMANN, D.; HORNIG. On the absorption of ascorbic acid in man. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 47: 383-388, 1977.
- KEATING, R.W & HADDAD, P.R. Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, 245: 249-55, 1982.
- KUBLER, W & GEHLER, J. Kinetics of intestinal absorption of ascorbic acid: calculation of non-dosage- dependent absorption processes. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 40: 442-453, 1970.
- KUHNZ, W.; LOUTON, T.; HÜMPEL, M.; BACK, D.J.; ZAMAH N.M. Influence of high doses of vitamin C on bioavailability and serum protein binding of levonorgestrel in women using a combination oral contraceptive. *Contraception*, 51: 111-116, 1995.
- LAPORTE, J.R.; BAKSAAS, I.; LUNDE, P.K.M. General background. In: HASAN *et al* . Edited by M. N. G. Dukes. *Drug Utilization Studies*. Filand. WHO Regional Publications, European Series, 1993.

- LAPORTE, J.R. **Epidemiologia do Medicamento - Princípios Gerais**. Editora Hucitec-Abrasco. 1989.
- LEVINE, M.; DHARIWAL, K. R.; WASHKO, P. W.; BUTLER, J. D.; WELCH, R. W.; WANG, Y.; BERGSTEN, P. Ascorbic acid and in situ kinetics: a new approach to vitamin requirements. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 1157S-62S, 1991.
- LEVINE, M.; DHARIWAL, K. R.; WELCH, R. W.; WANG, Y.; PARK, J. B. Determination of optimal vitamin C requirements in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62: 1347S-56S, 1995.
- LEVINE, M.; CONRY-CANTILENA, C.; WANG, WELCH, R. W.; Y.; WASHKO, P. W.; DHARIWAL, K. R.; PARK, J. B.; LAZAREV, A.; GRAUMLICH, J.F. KING, J.; CANTILENA, L. R. Vitamin C pharmacokinetics in health volunteers: Evidence for a recommended dietary allowance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 3704-3709, 1996.
- LIAU, L.S.; LEE, B.L.; NEW, A.L.; ONG, C.N. Determination of plasma ascorbic acid by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection. *J. Chromatogr.*, 612: 63-70, 1993.
- MALMSTROM, B.; ANDREASSON L.E.; REINHAMMAR B. **The Enzymes**. 3 ed. Acad. Press., NY., 1975. v 12. p 507-579.
- MANGELS, A. R.; BLOCK, G.; FREY, C.; PATTERSON, B. H.; TAYLOR, P. R.; NORKUS, E. P.; LEVANDER, O.A. The bioavailability to humans of ascorbic acid from oranges, orange juice and cooked broccoli is similar to that of synthetic ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.*, 123: 1054-1061, 1993.
- MARGOLIS, S. A. & DAVIS T. P. Stabilization of ascorbic acid in human plasma, and its liquid-chromatographic measurement. *Clin. Chem.*, 34: 2217-2223, 1988.
- MARGOLIS, S. A.; ZIEGLER, R.G.; HELZLSOUER. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurement in human serum and plasma. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 1315S-18S, 1991.

- MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E DO COMÉRCIO. Secretaria de Tecnologia Industrial. Setor Farmacêutico- Desenvolvimento Tecnológico. Brasília, 1985.
- MATUSIRWICZ, M.; DABROWSKI, K.; VOLKER, L.; MATUSIEWICZ, K. Ascorbate polyphosphate is a bioavailable vitamin C source in juvenile rainbow trout: tissue saturation and compartmentalization model. *J. Nutr.*, 125: 3055-3061, 1995.
- MELLORS, A.J.; NAHRWOLD, D.L.; ROSE, R.C. Ascorbic acid flux across the mucosal border of guinea pig an human ileum. *Am. J. Physiol.*, 233: E374-E379, 1977.
- MYLLYLÄ, R.; SAVOLAINEN, E.; KIVIRIKKO, K. I. The role of ascorbate in the propyl hydroxylase reaction. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 83: 441-448, 1978.
- MOERTEL, C. G.; FLEMING, T. R.; CREAGAN, E. T.; RUBIN J.; O'CONNELL M. J.; AMES, M. M. High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have no prior chemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 312: 137-141, 1985.
- MOESLINGER, T.; BRUNNER, M.; VOLF, I.; SPIECKERMANN.. Spectrophotometric determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid. *Clin. Chem.*, 41-8: 1177-1181, 1995.
- MOHSENIN V. & DUBOIS A.B. Vitamin C and airways. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 498: 259-79, 1987.
- MONDOVI, B. & AVIGLIANO, L. *Copper Proteins and Copper Enzymes*. Boca Raton, CRC Press, 1984. v 3. p 101-118FL.
- MOSER, U. Uptake of ascorbic acid by leukocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 498: 200-214, 1987.
- NELSON, E.W.; LANE, H.; FABRI, P.J.; SCOTT, B. Demonstration of saturation kinetics in the intestinal absorption of vitamin C in man and the guinea pig. *J. Clin. Pharmacol.*, 18: 325-335, 1978.

- NIKI, E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 1119S-24S, 1991.
- NISHIKIMI, M. & YAGI, K. Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 1203S-8S, 1991.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. *Métodos en Farmacología Clínica*. Programa Regional de medicamentos Esenciales. Programa Desarrollo de Servicios de la Salud. Oficina Sanitaria, Oficial Regional de la Organización Mundial de la Salud. 1992. 432p.
- PACHLA, L. A. & KISSINGER, P. T. Determination of ascorbic acid in foodstuffs, pharmaceuticals, and body fluids by liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chem.*, 48: 384-387, 1976.
- PADH, H. Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutr. Rev.*, 49: 65-70, 1991.
- PAULING, L. Evolution and the Need for Ascorbic Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67(4): 1643- 48, 1970.
- PEINADO, J.; TORIBIO, F.; PÉREZ-BENEDITO, D. Kinetic- fluorimetric determination of ascorbic acid at the nanomole level. *Analyst*, 112: 775-779, 1987.
- PELLETIER, O.; KEITH, M.O. Bioavailability of synthetic and natural ascorbic acid. *J. Am. Diet. Assoc.*, 64 : 271-75, 1974.
- PETERKOFISKY, B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 1135S- 40S, 1991.

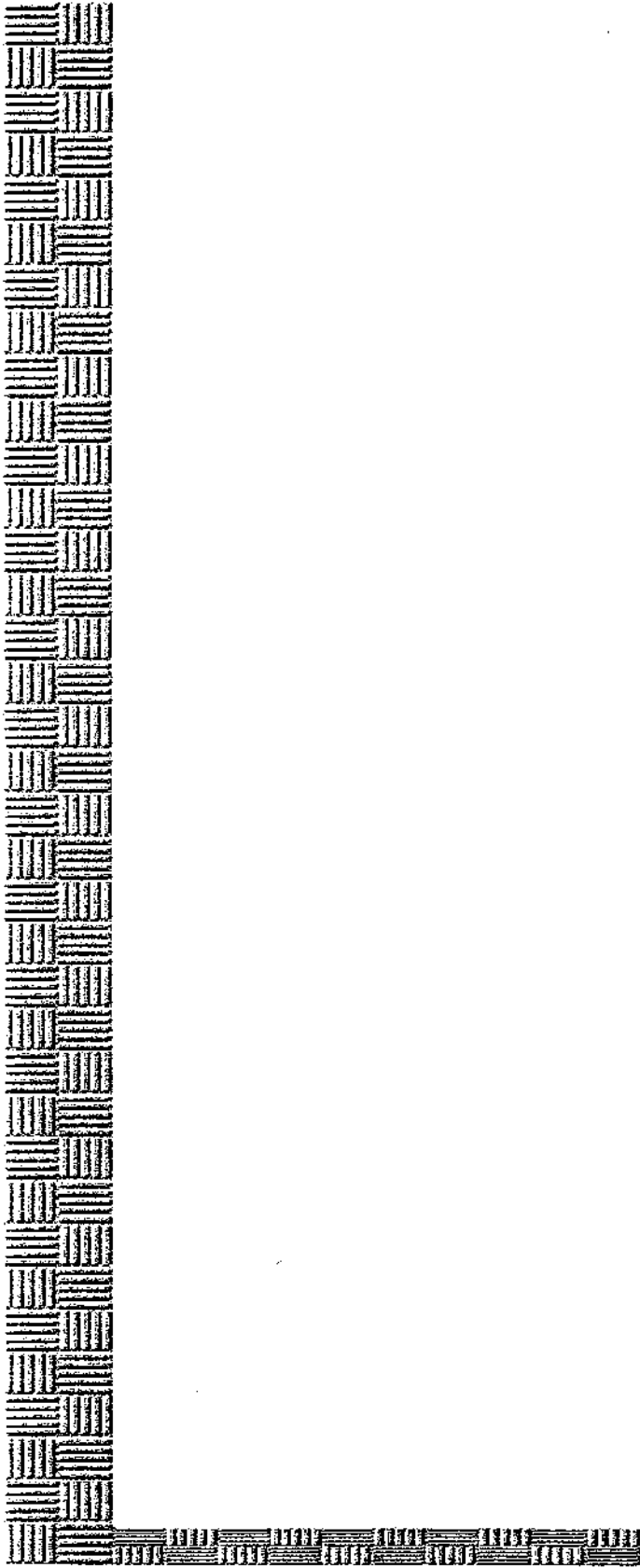
- PIOTROYSKIJ, V.K.; KALLA, Y Z; GAJDOS, M.; GERYKOVA, M.; TMOVEC, The use of a nonlinear absorption model in the study of ascorbic acid bioavailability in man. **Biopharm. Drug. Dispos.**, 14: 429-442, 1993.
- POLI, A.; MORENO, R.A.; RIBEIRO W.; DIAS H.B.; MORENO H.; MUSCARÁ M.N.; De NUCCI G. Influence of gastric secretion blockade and food intake on the bioavailability of the potassium diclofenac suspension in healthy male volunteers. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, 34(2): 80-83, 1996.
- PRISTA, L. N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 4 ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. v I e III.
- PROCHAZKA, Z. & FAGNER J. **Vitamine, chemie und biochemie**, 1964. p 383.
- RANG H.P., RITTER, J.M.; DALEM, .M.M. **Pharmacology**. 3 ed. London. Churchill Livingstone, 1995. p 885.
- REBOUCHE, C. J. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. **Am. J. Clin. Nutr.**, 54: 1147S-52S, 1991.
- ROCK, C.L.; JACOB R.A.; BOWEN P.E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrientes: Vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **J. Am. Diet. Assoc.**, 96: 693-702, 1996.
- ROSE , R.C & CHOI, J. Intestinal absorption and metabolims of ascorbic acid in rainbow trout. **Am. Physiol. Society.**, R1238-41, 1990.
- ROSE , R.C. Intestinal absorption of water-soluble vitamins. **Society for Exp. Biol. and Med.**, 212: 191-198, 1996.
- ROSS, M.A. Determination of ascorbic acid and uric acid in plasma by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, 657: 197-200, 1994.
- ROWLAND, M. & TOZER, T.N. Absorption. In: _____ - **Clinical Pharmacokinetics: Conceptos and Applications**, USA, Lea & Febiger, 1989. p 113-131.

- ROWLAND, M. & TOZER, T.N. Variability. In: _____ - **Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications**, USA, Lea & Febiger, 1989. p 197-276.
- SACHARIN, R.; TAYLOR, T.; CHASSEAUD, L.F. Blood levels and bioavailability of ascorbic acid after administration of a sustained- release formulation to humans. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, 1977.
- SAUBERLICH, H.E. Bioavailability of vitamins. **Prog. Food. Nutr. Sci.**, 9: 1-33. 1985.
- SAUBERLICH, H.E. Ascorbic acid . In **Present. Knowledge in Nutrition**, ed. ML Brow., Washington, D. C, Int. Life Sci, Inst, 1990. p 132-41.
- SAUBERLICH, H.E.; WOOD, S. M.; TAMURA, T.; FREEBERG, L. E. Influence of dietary intakes of erythorbic acid on plasma vitamin C analysis. **Am. J. Clin. Nutr.**, 54: 1319S- 22S, 1991.
- SAUBERLICH, H.E. Vitamin C and cancer . In **Nutr. Dis. Update: Cancer**, eds. D Kritchevsky, K Carrol, Champaing: Am. Oil Chem, Soc In press, 1994.
- SEGHIERI, G.; MARTINOLI, L.; MICELI, M.; CIUTI, M.; D'ALESSANDRI, G.; GIRONI, A.; PALMIERI, L.; ANICHINI, R.; BARTOLOMEI, G.; FRANCONI, F. Renal Excretion of Ascorbic Acid in Insulin Dependent Diabetes Mellitus. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, 64: 119-124, 1994.
- SHARGEL, L. & ANDREW, Y.B.C. Biopharmaceutic Consideratios in Drug Product Desing. In: **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**, 3 ed., USA, Appleton & Lange, 1992. p 135-165.
- SHARGEL, L. & ANDREW, Y.B.C. Bioavailability and bioequivalence. In: **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**, 3 ed., USA, Appleton & Lange, 1992. p 193-223.
- SIES, H. & STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.**, 62 (suppl): 1315S-21, 1995.

- SPEEK, A.J.; SCHJVER, J., SCHREURS, W.H.P. Fluorometric Determination of Total Vitamin C in Whole Blood by High-Performace Liquid Chromatography with Pre-Column Derivatization. *J. Cromatogr.*, 805: 58-60, 1984.
- SIMON, J.A. Vitamin C and cardiovascular disease: a review. *J. Nutr.*, 122:760-65, 1992.
- STEVENSON, N.& BRUSH, M. Existence and characteristics of Na⁺ - dependent active transport of ascorbic acid in guinea pig. *Am. J. Clin. Nutr.*, 22: 318-326, 1969.
- SUZUKI, E.; KURATA, T.; ARAKAWA, N. Comparation of absorption of erythorbic acid and ascorbic acid in guinea pig small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 37: 453-59, 1991.
- TANISHIMA, K. & KITA, M. High-performance liquid chromatographic determination of plasma ascorbic acid in relationship to health care. *J. Chromatogr.*, 613: 275-280, 1993.
- TSAO, C.S. & SALIMI, S.L. Differential determination of L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.*, 245: 355-58, 1982.
- VALLANCE, S. Leucocyte ascorbic acid and the leucocyte count. *Br. J Nutr.*, 409- 411, 1979.
- VANDERSLICE, J. T. & HIGGS, D.J. HPLC analysis with fluorometric detection of vitamin C in food samples. *J. Chromatografic. Sci.*, 22: 485-489, 1984.
- VANDERSLICE, J. T. & HIGGS, D.J. Vitamin C content of foods: sample variability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 1323S-7S, 1991.
- VIDGREN, M.; KUMPUSALO, E.; SILVASTI, M.; MYKÄNEN, M.; PARVIAINEN, M. Absorption of ascorbic acid from a film-coated tablet and from a new enteric-coated pellet preparation in subjects with inadequate plasma levels of ascorbic acid. *Therapeutics for Sates of Deficiency*, 42: 143-46, 1992.

- VINSON, J. A. & BOSE, P. Comparative bioavailability to humans of ascorbic acid alone or in a citrus extract. **Am. J. Clin. Nutr.**, 48: 601-4. 1988.
- ZANINI, A. C. & OGA, S. Introdução à farmacologia. In: _____ - **Farmacologia Aplicada**. 4 ed. São Paulo, Atheneu editora São Paulo, 1989. p 6.
- ZANNONI, V. G. & SATO, P. H. Effects of ascorbic acid on microsomal drug metabolism. **Interactions with Drugs and Environmental Chemicals**, 119-130.
- WAGNER, E.S.; LINDLEY, B.; COFFIN, R. D. High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in urine. Effect on urinary excretion profiles after oral and intravenous administration of vitamin C. **J. Chromatogr.**, 163: 225-229, 1979.
- WEBER, P.; BENDICH, A.; SCHALCH, W. Vitamin C and Human Health - A Review of Recent data Relevant to Human Requirements. **Internat J. Vit. Nutr. Res.**, 66: 19-30, 1996.
- WIMALARASI, P. & WILLIS R. B. H. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, 256: 368-371, 1983.
- WILSON C.G. & WASHINGTON N. The stomach: its role in oral drug delivery. In: **Physiological Pharmaceutics, Biological Barriers to Drug Absorption**, England, ELLIS HORWOOD LIMITED, 1989. p 47-68.
- WILSON C.G. & WASHINGTON N. Small Intestine: Transit and absorption of drugs. In: **Physiological Pharmaceutics, Biological Barriers to Drug Absorption**, England, ELLIS HORWOOD LIMITED, 71-88. p 1989.
- WOTEKI, C.; JOHNSON C.L.; MURPHY, R. Nutritional status of the U.S. population: iron, vitamin C, and zinc. In **What Is American Eating ?** Washington, D.C.: Food Nutr Board Natl Res Counc, Natl Acad Press, 21-23, 1986.

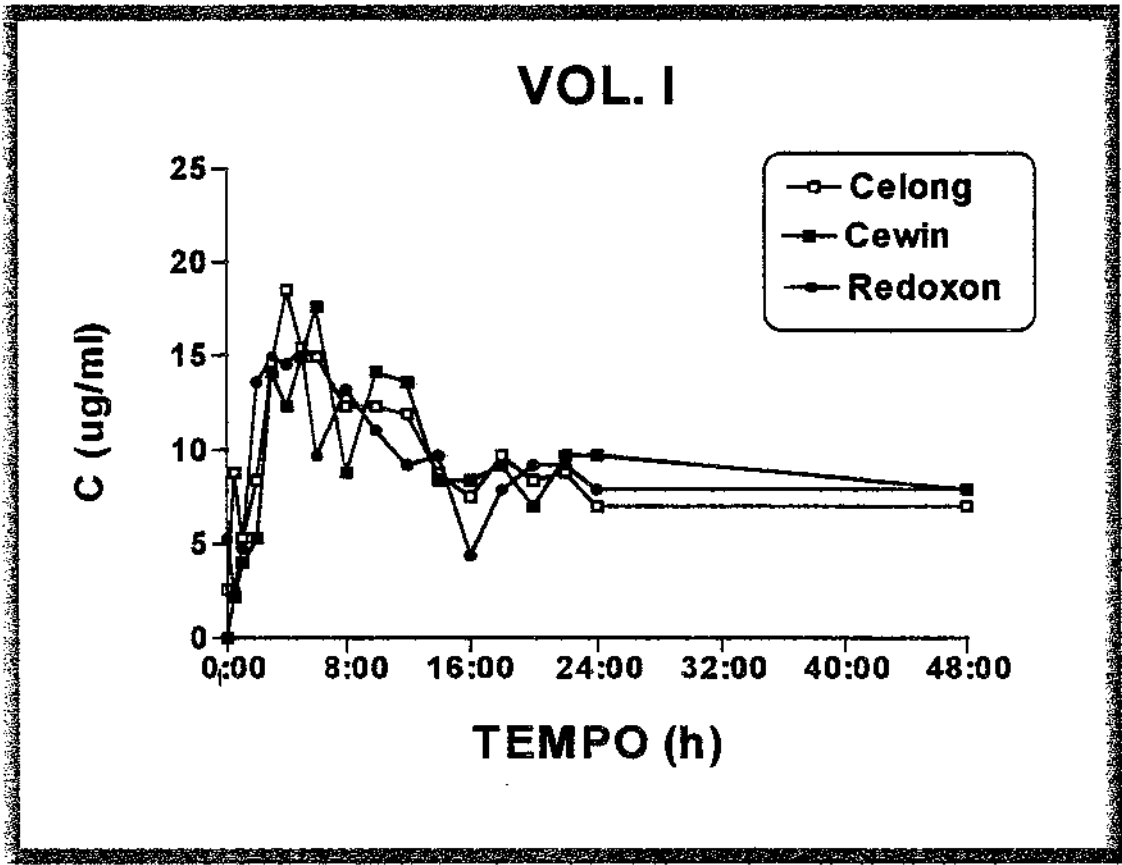
YOUNG, V. R. Evidence for a recommended dietary allowance for a vitamin C from pharmacokinetics: A comment and analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 93: 14344-14348, 1996.



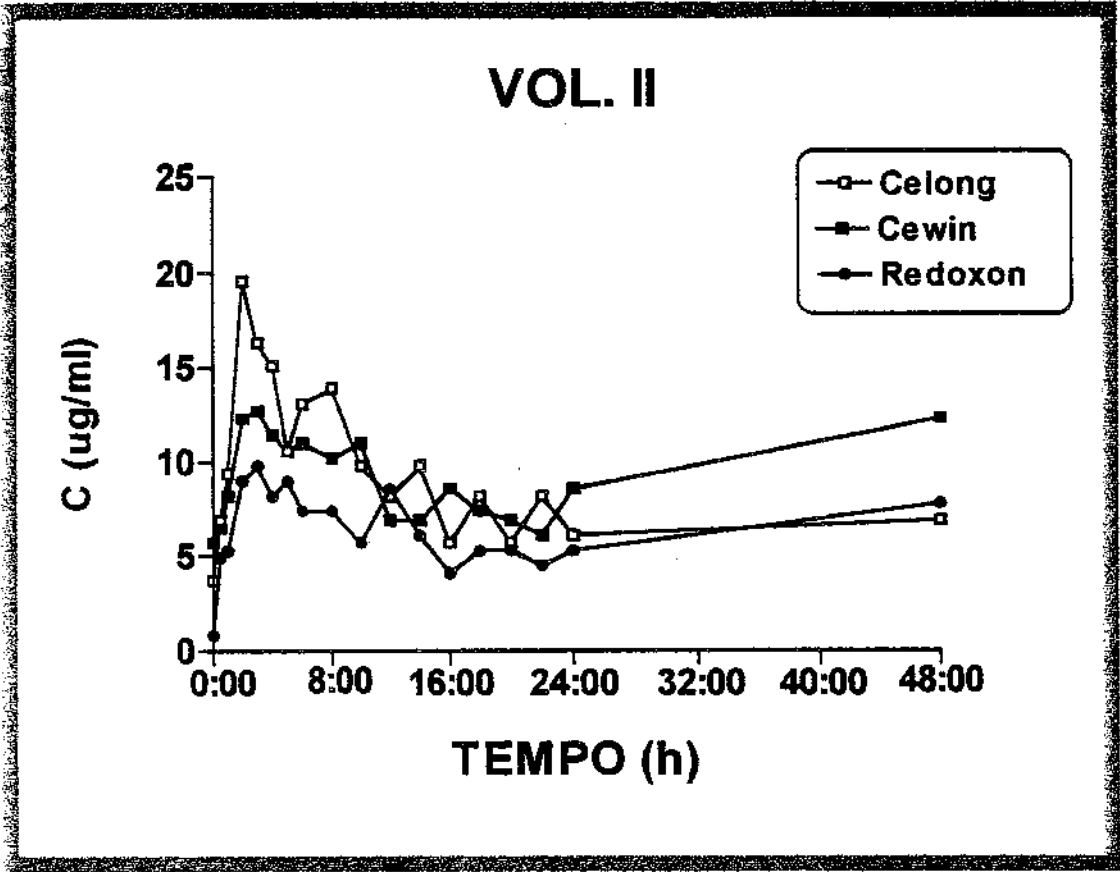
Anexos

ANEXO I.

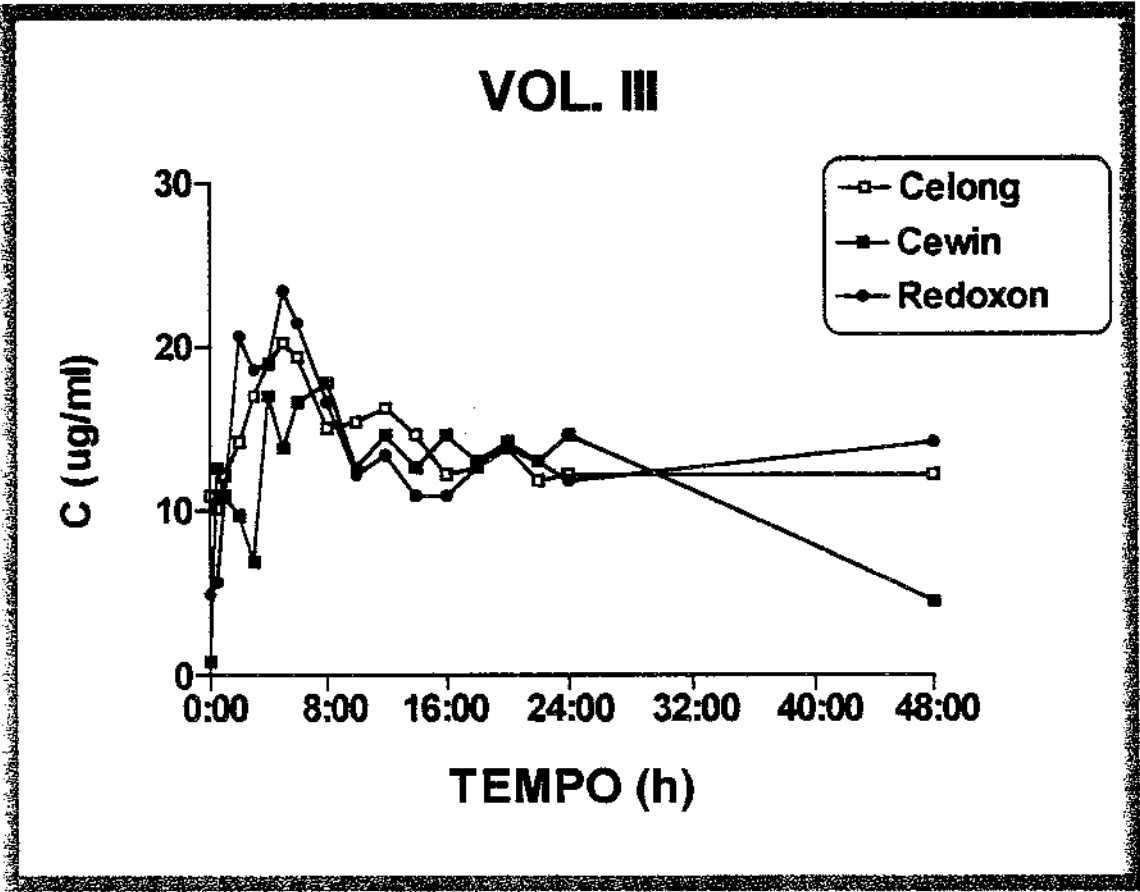
Dados da concentração individual vs. tempo (Figuras 1 - 17) e Parâmetros Farmacocinéticos (Tabelas das figuras 1 - 17)



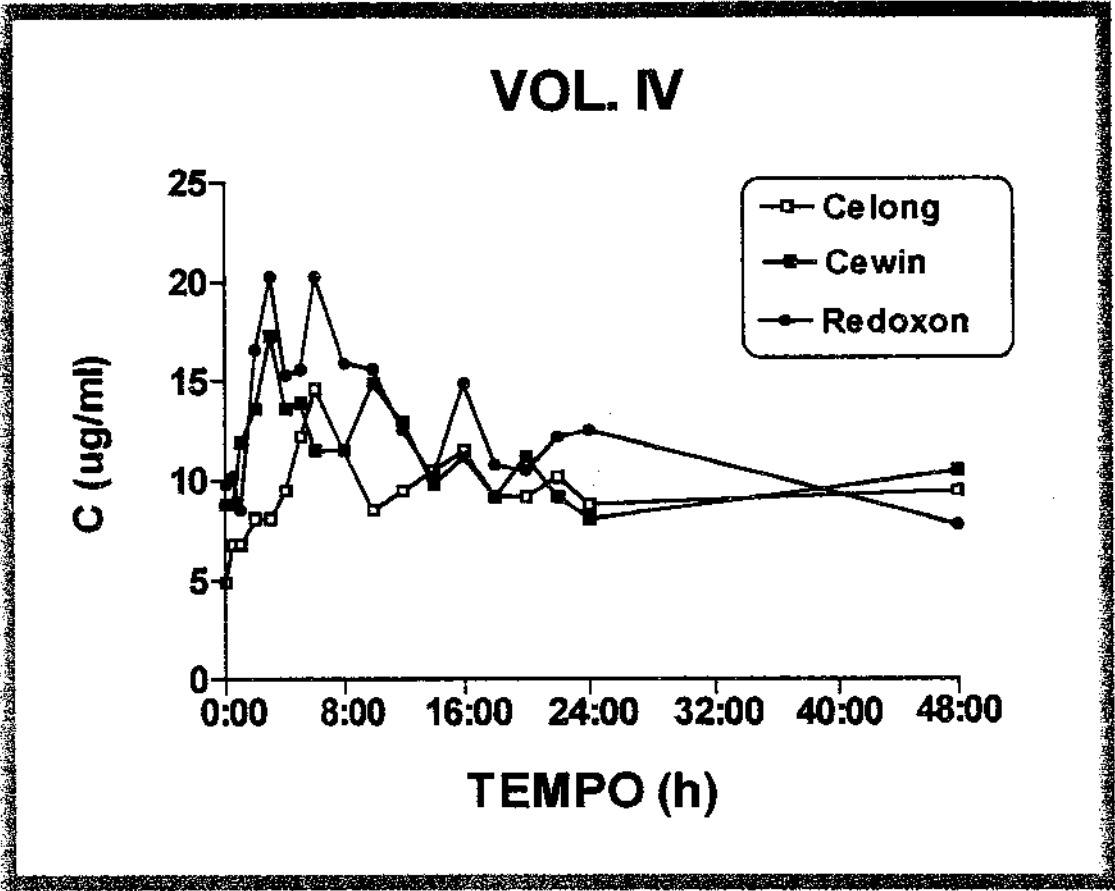
	Celong	Cewin	Redoxon
AUC ₀₋₄₈ (µg/ml*h)	423	456	440
C _{max} (µg/ml)	19	17	15
T _{max} (h)	4	6	5



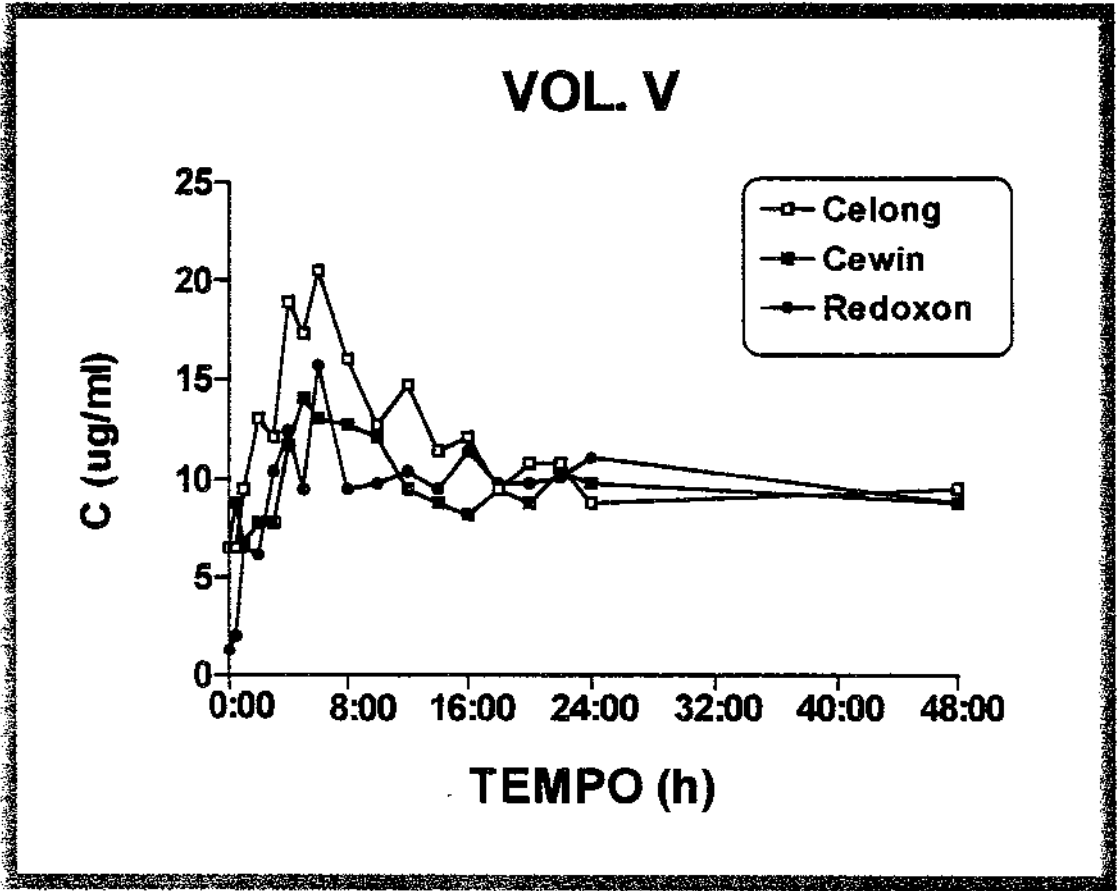
	Celong	Cewin	Redoxon
AUC _[0-48] ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	395	461	310
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	19	12	9
T _{max} (h)	2	3	3



	Celong	Cewin	Redoxon
AUC[0-48](µg/ml*h)	643	555	656
C _{max} (µg/ml)	20	17	23
T _{max} (h)	5	8	5

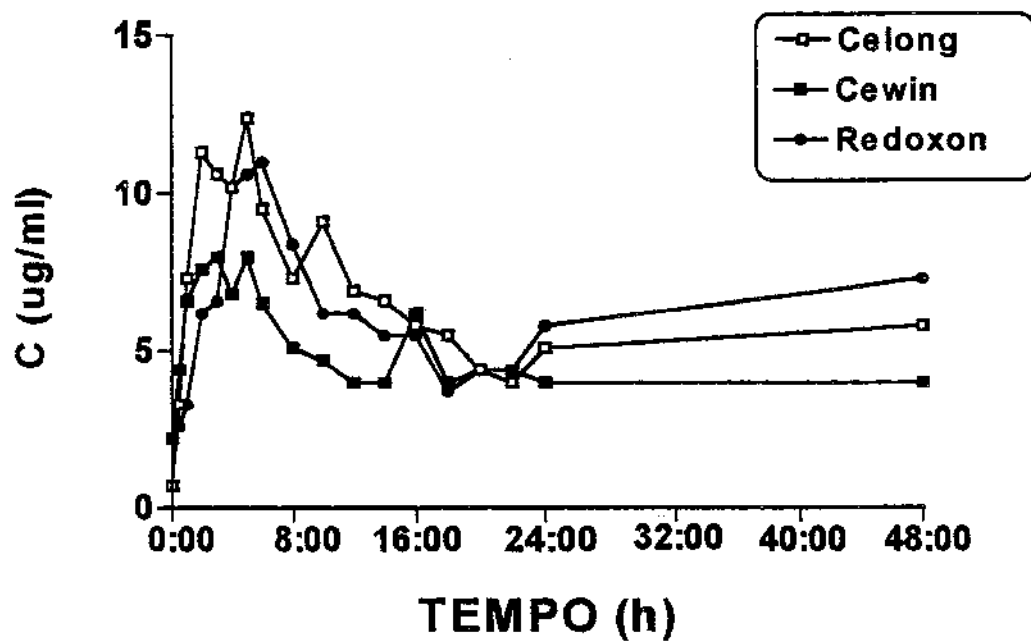


	Celong	Cewin	Redoxon
AUC _[0-48] (μg/ml*h)	458	503	574
C _{max} (μg/ml)	14	17	20
T _{max} (h)	6	3	3

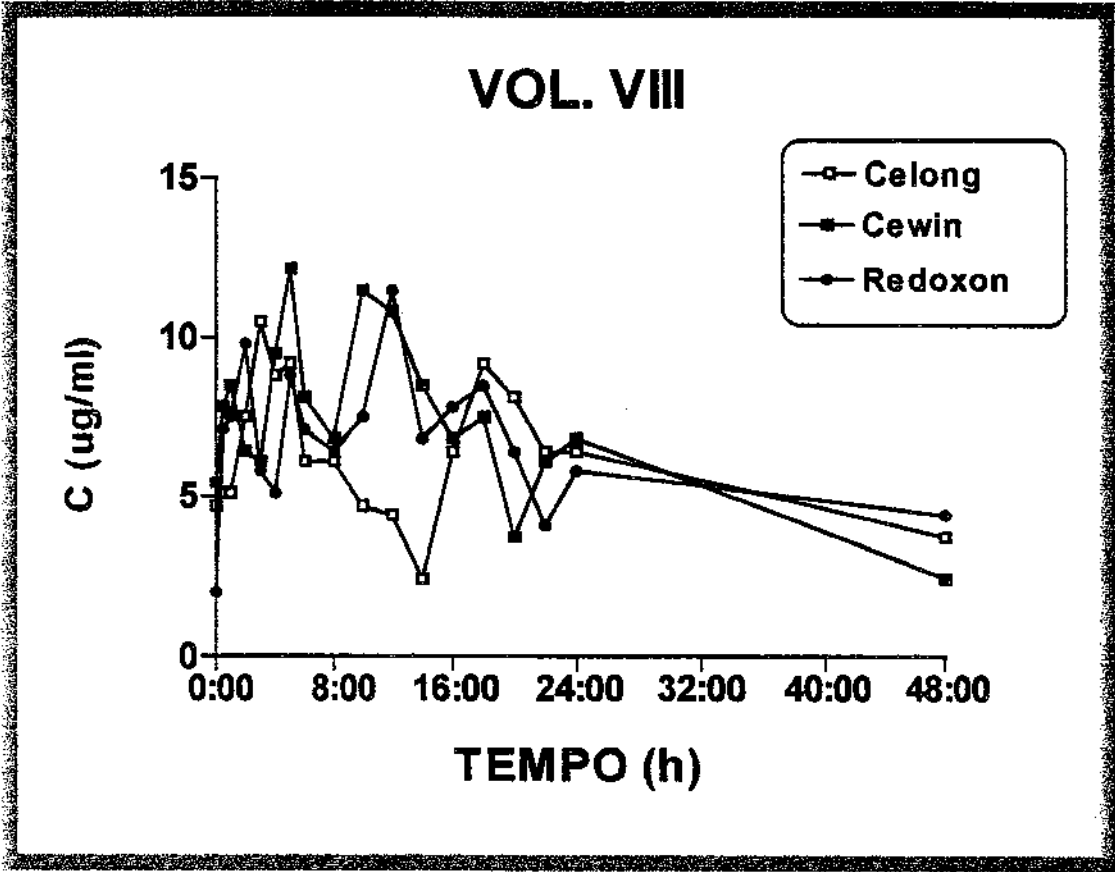


	Celong	Cewin	Redoxon
AUC _[0-48] ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	528	465	482
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	20	14	15
T _{max} (h)	6	5	4

VOL. VII

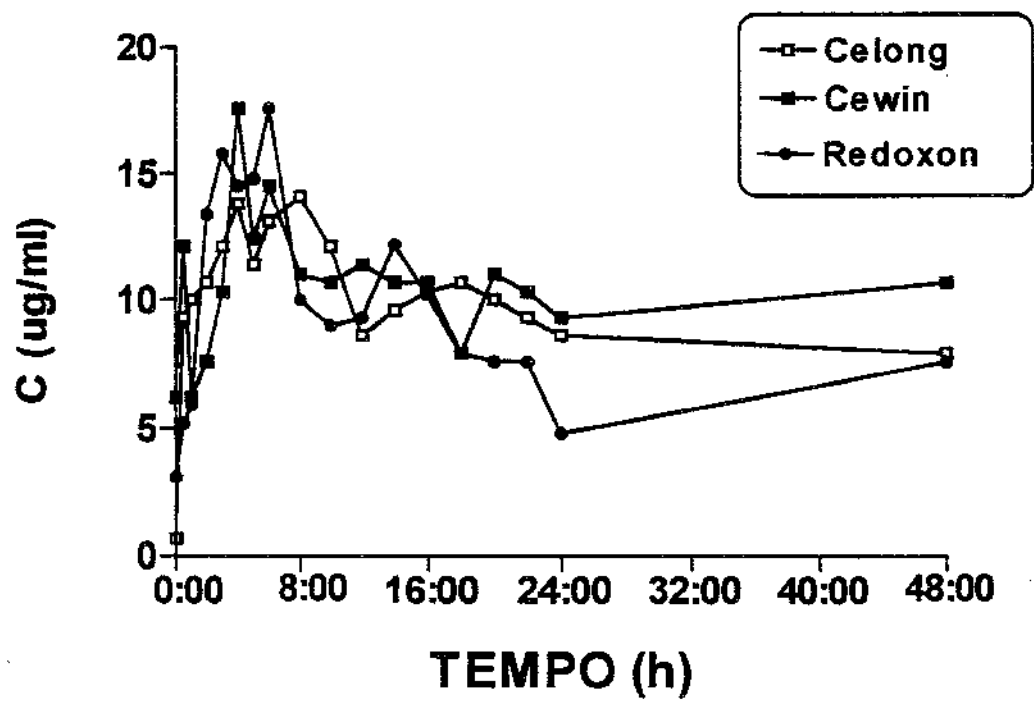


	Celong	Cewin	Redoxon
AUC _[0-48] (µg/ml*h)	301	221	306
C _{max} (µg/ml)	12	8	11
T _{max} (h)	5	3	6

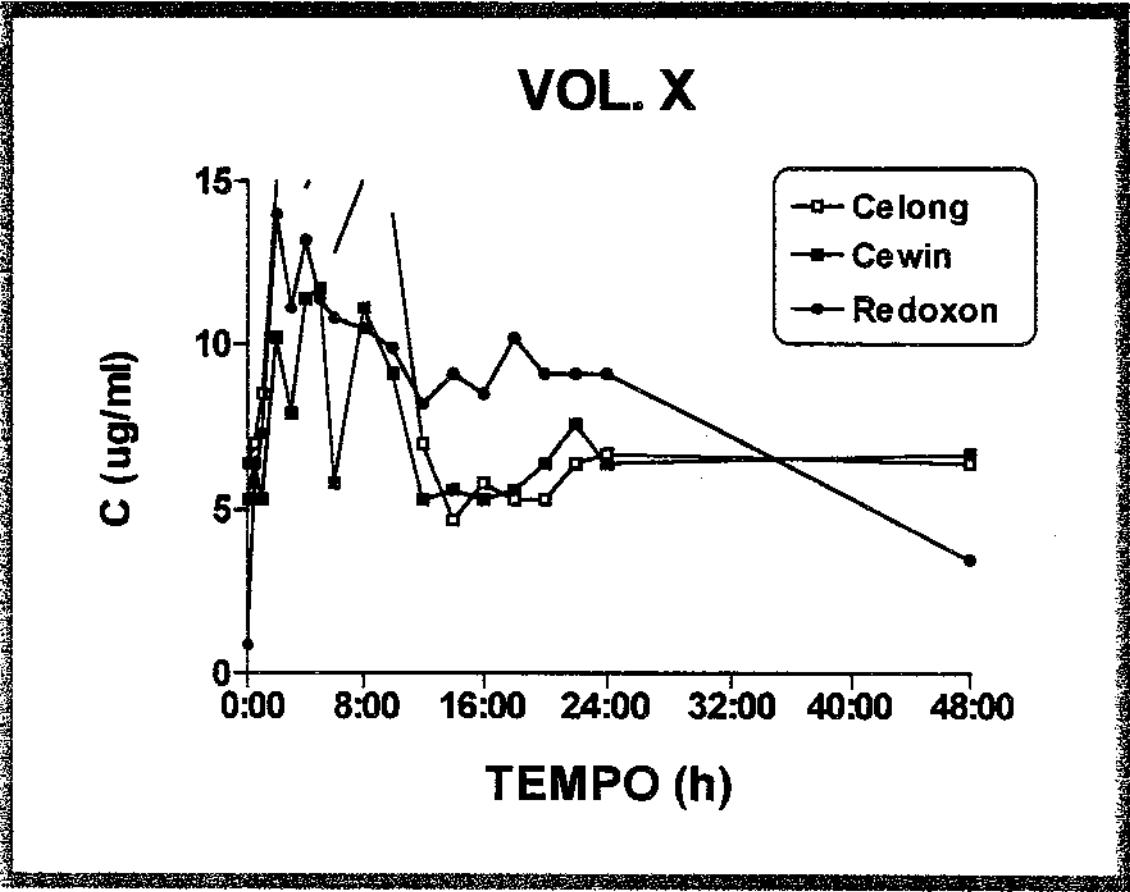


	Celong	Cewin	Redoxon
AUC[0-48](µg/ml*h)	277	298	296
C _{max} (µg/ml)	10	12	11
T _{max} (h)	3	5	6

VOL. IX

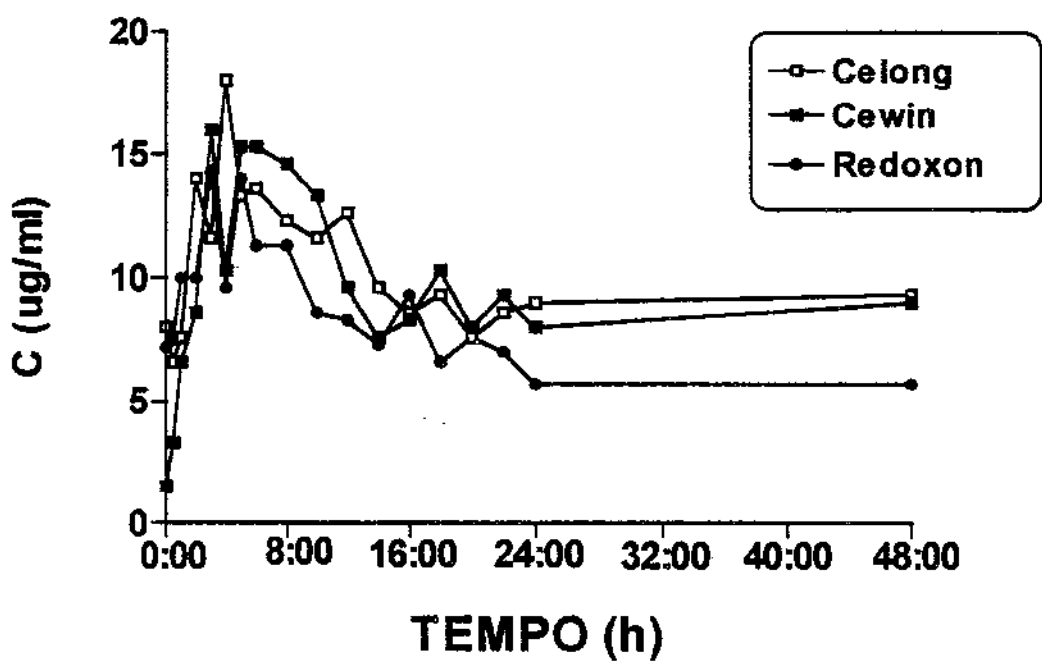


	Celong	Cewin	Redoxon
AUC _[0-48] (µg/ml*h)	456	498	393
C _{max} (µg/ml)	14	17	17
T _{max} (h)	8	4	6

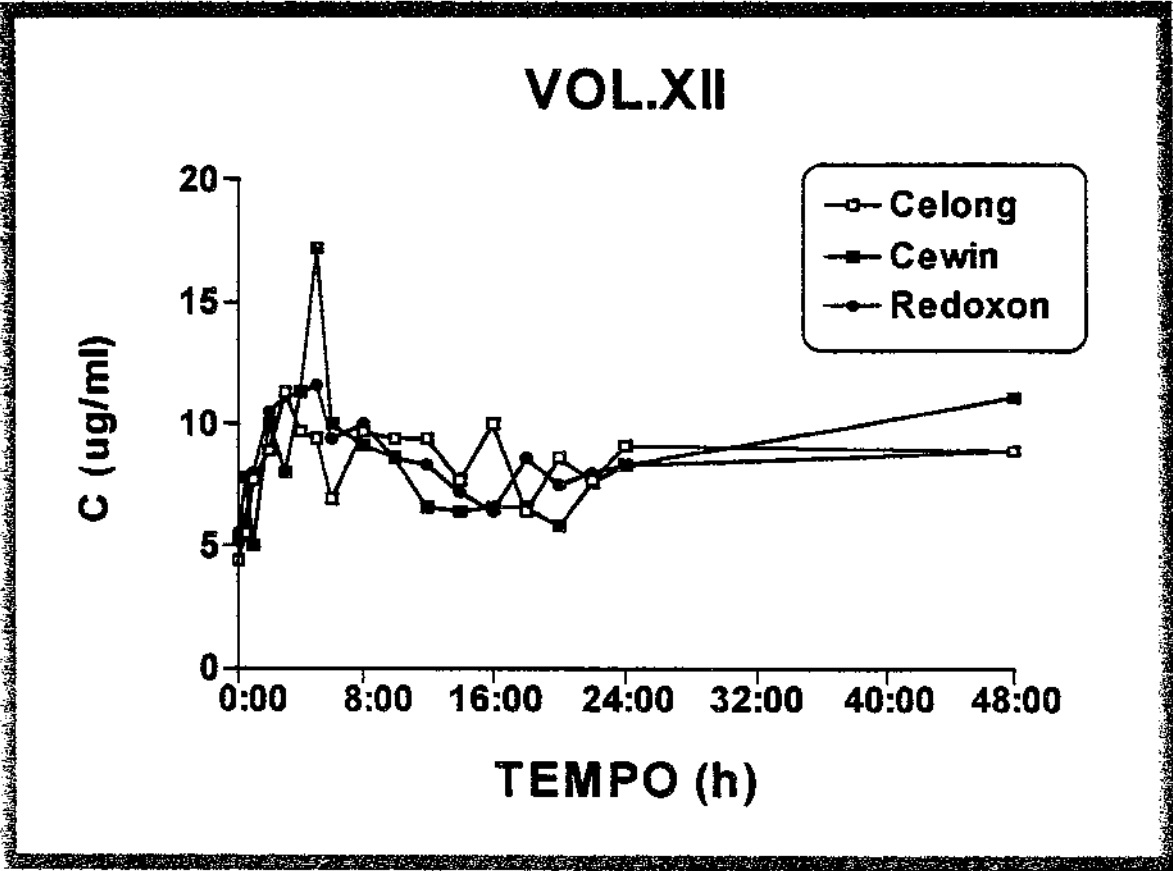


	Celong	Cewin	Redoxon
AUC _[0-48] (µg/ml*h)	384	334	383
C _{max} (µg/ml)	16	11	14
T _{max} (h)	3	5	2

VOL. XI

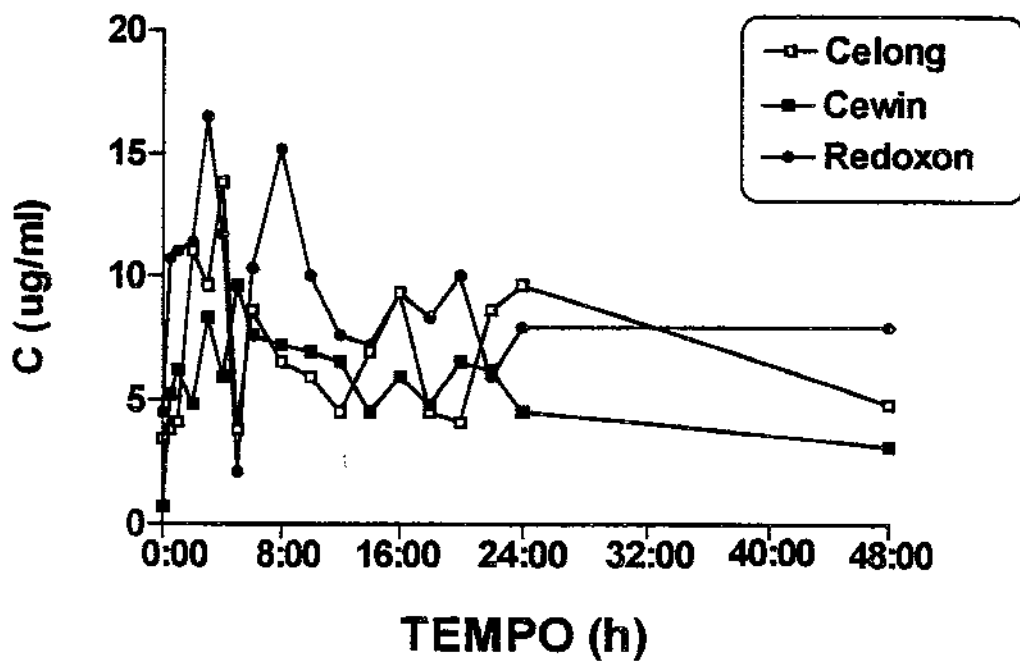


	Celong	Cewin	Redoxon
AUC[0-48]($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	478	454	351
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	18	16	14
T _{max} (h)	4	3	3



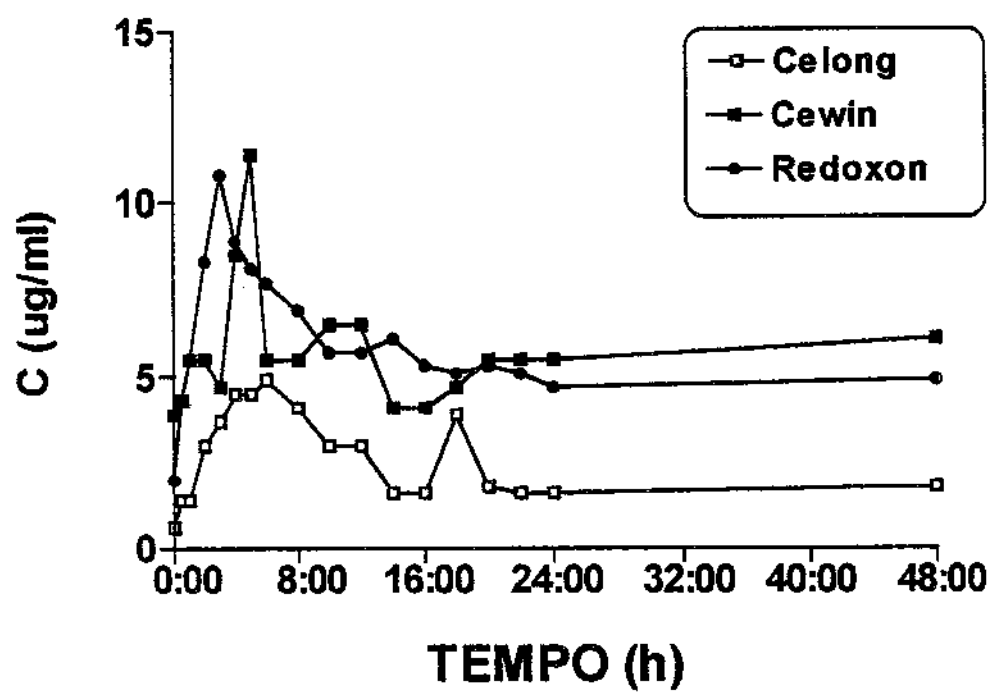
	Celong	Cewin	Redoxon
$AUC_{0-48}(\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	422	425	412
$C_{\text{max}}(\mu\text{g/ml})$	11	17	11
$T_{\text{max}}(\text{h})$	3	5	5

VOL. XIII

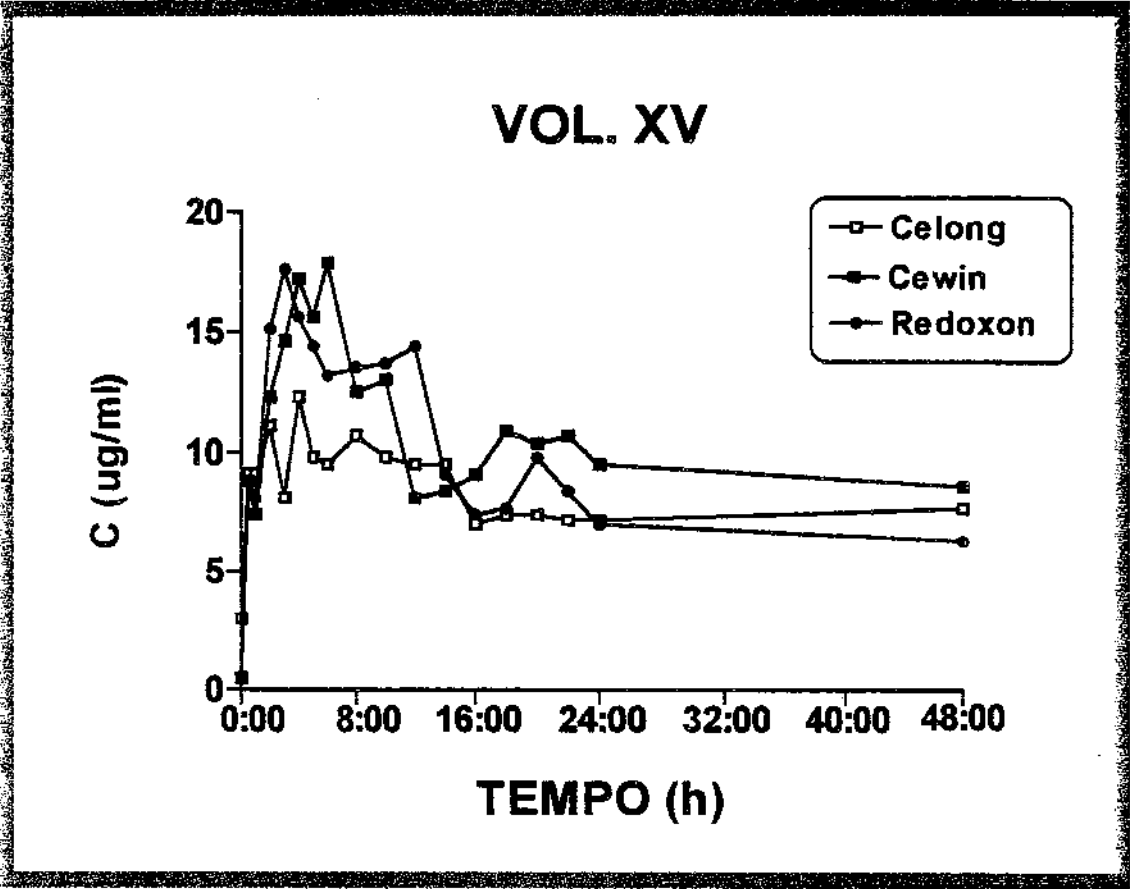


	Celong	Cewin	Redoxon
$AUC_{0-48}(\mu g/ml \cdot h)$	341	240	391
$C_{max}(\mu g/ml)$	13	9	16
$T_{max}(h)$	4	5	3

VOL. XIV

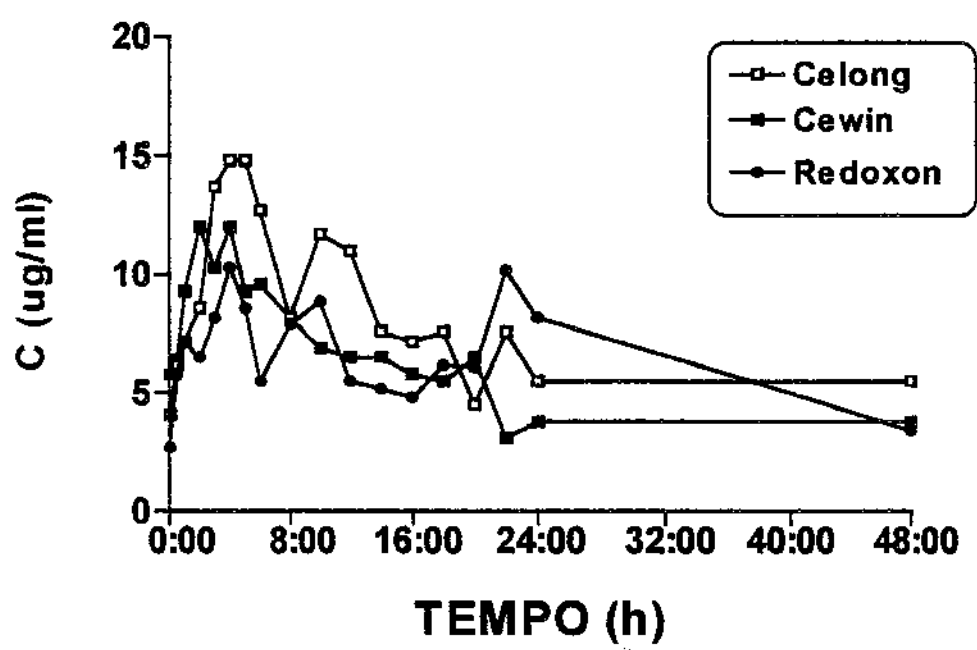


	Celong	Cewin	Redoxon
$AUC_{0-48}(\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	109	274	264
$C_{\text{max}}(\mu\text{g/ml})$	5	11	10
$T_{\text{max}}(\text{h})$	6	5	3



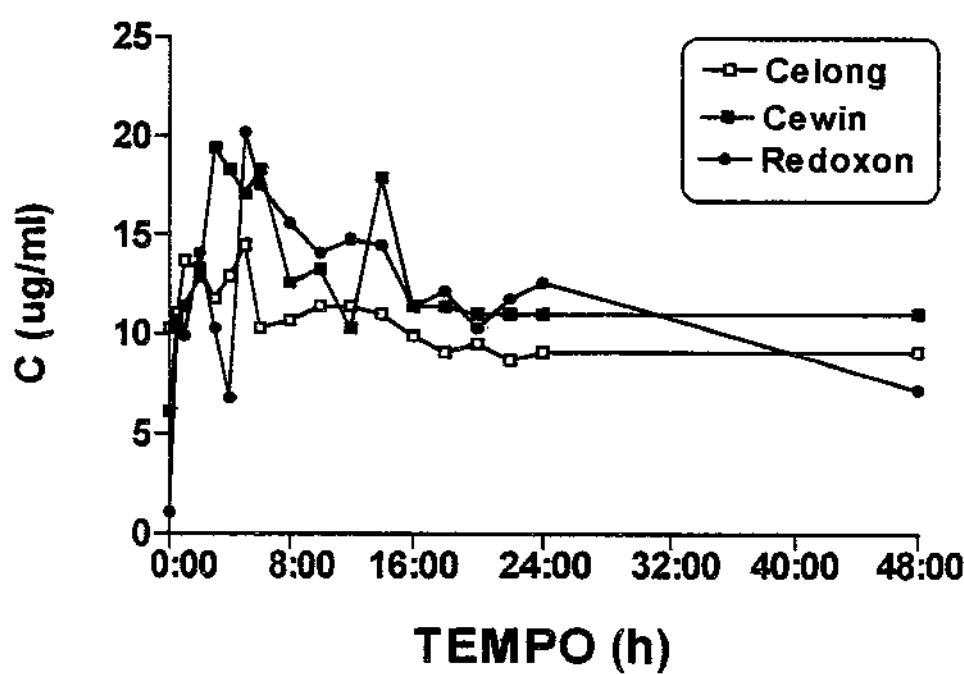
	Celong	Cewin	Redoxon
AUC[0-48](µg/ml*h)	390	490	427
C _{max} (µg/ml)	12	17	17
T _{max} (h)	4	6	3

VOL. XVI



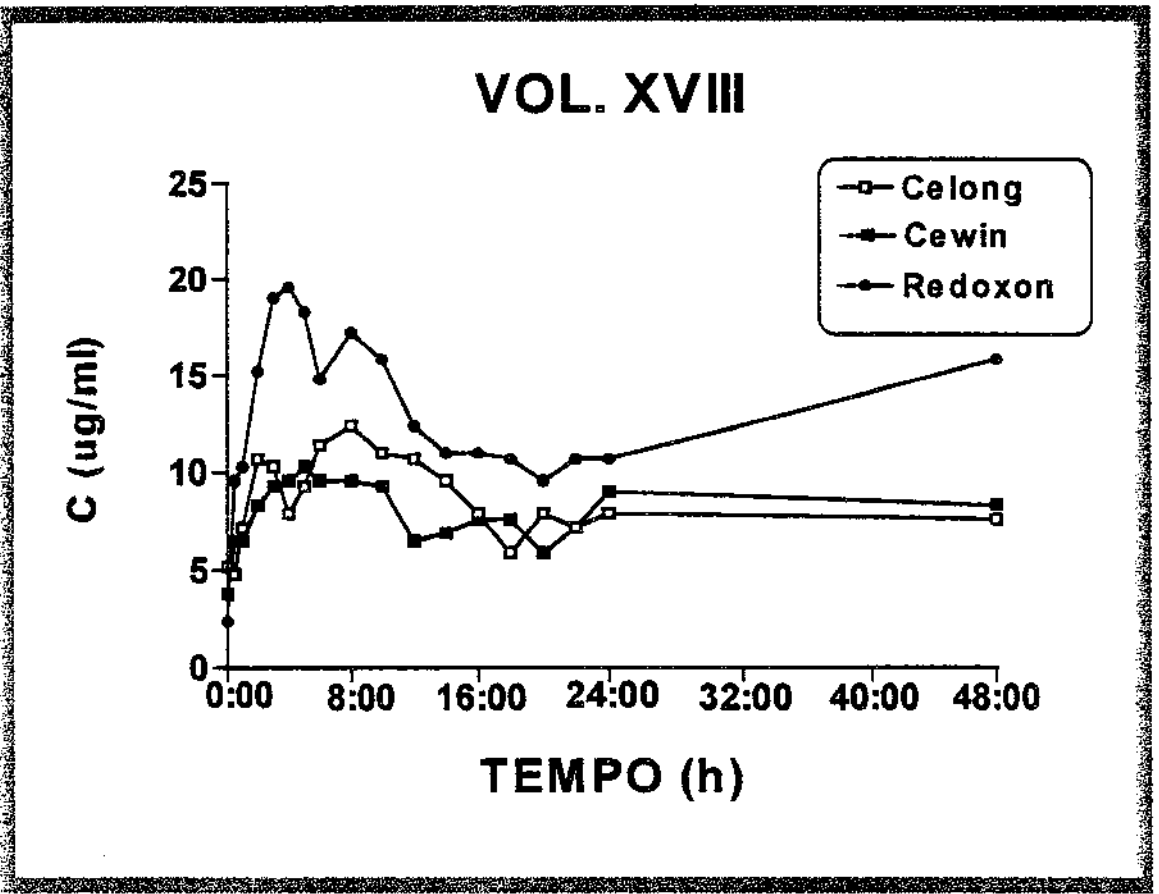
	Celong	Cewin	Redoxon
AUC _[0-48] ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	349	263	308
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	14	12	10
T _{max} (h)	4	3	4

VOL. XVII



	Celong	Cewin	Redoxon
AUC _[0-48] ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	474	591	550
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	14	19	20
T _{max} (h)	5	3	5

VOL. XVIII



	Celong	Cewin	Redoxon
AUC[0-48] (µg/ml*h)	404	398	634
C _{max} (µg/ml)	12	10	19
T _{max} (h)	8	5	4

ANEXO II.

TERMO DE CONSENTIMENTO

ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE 3 PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE VITAMINA C EM VOLUNTÁRIOS SADIOS

Responsáveis: Drs. Eduardo Abib Jr, Gun Birgitta Mendes e Gilberto de Nucci

O abaixo-assinado (Nome do voluntário, idade e nº HC), declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade dos médicos Eduardo Abib Jr , Gun Birgitta Mendes e Gilberto de Nucci, da Unidade de Farmacologia Clínica - HC UNICAMP. O abaixo-assinado está ciente que:

- i - O objetivo da pesquisa é comparar os níveis plasmáticos de vitamina C após a ingestão de três formulações de vitamina C, a saber Cewin (Winthrop), Redoxon (Roche), Celong (Whitehall).
- ii - Durante o estudo, será internado três vezes por 36 horas, com intervalo de 12 dias. Em ambas as ocasiões, será administrado 1 (hum) grama de vitamina C por via oral e coletado 17 amostras de sangue de 10ml cada através de butterfly heparinizado em cada internação.
- iii - A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.
- iv - A administração oral de vitamina C não costuma apresentar efeitos colaterais dignos de nota. Entretanto a administração de qualquer medicamento pode causar reações idiossincráticas imprevisíveis.
- v - Será submetido antes da primeira internação e após a terceira internação aos seguintes exames laboratoriais: hemograma, transaminases, fosfatase alcalina, bilirrubina total, proteínas totais, uréia, creatinina, urina rotina e eletrocardiograma.
- vi - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.
- vii - Está livre para interromper a participação no ensaio clínico a qualquer momento, a não ser que esta interrupção seja contra-indicada por motivo médico.
- viii - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade de Farmacologia Clínica.

ix - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e a Unidade de Farmacologia Clínica não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

x - Durante o período de 6 meses a partir da data da assinatura do mesmo, o voluntário estará assegurado por apólice da Companhia Vera Cruz Seguradora.

xi - A Unidade de Farmacologia Clínica o manterá informado em relação ao progresso da pesquisa, caso julgue a informação relevante para o voluntário.

xii - Caso haja surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto-Socorro do Hospital de Clínicas da UNICAMP e solicitar que o mesmo contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico.

xiii - Poderá contactar a Secretaria da Comissão de Ética para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico..

xiv - É condição indispensável para participação no ensaio clínico que esteja em boa saúde, e portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações.

Campinas,

Assinatura do voluntário

Dr Eduardo Abib Jr (Assin.)

Dra Gun Birgitta Mendes (Assin.)

Dr Gilberto de Nucci (Assin.)

PARECER DA COMISSÃO ÉTICA

COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA DO HC UNICAMP

CONSULTA No. 273/95-C.Ética

ASSUNTO: Projeto de Pesquisa - "Estudo de Bioequivalência de 3
Formulações de Ácido Ascórbico em Voluntários Sadios"

INTERESSADO: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

RELATOR: Profa. Dra. Rosa Inês Costa Pereira

PARECER

O projeto foi analisado, e por estar de acordo com os preceitos da ética médica, e incluiu esclarecimentos aos participantes, assegurar seu livre arbítrio para desistir a qualquer momento e apresentar Termo de Consentimento Pós-Informação bastante completo, foi aprovado por esta Comissão em reunião do dia 18.05.95. Deverá constar no Termo de Consentimento os telefones da Comissão de Ética Médica e dos Pesquisadores para contato.

Rosa Inês Costa Pereira
Profa. Dra. Rosa Inês Costa Pereira
MEMBRO RELATOR

M. Baptista
Dra. Maria Tereza M. Baptista
PRESIDENTE DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA
HC UNICAMP