

**LUIS RENATO PIRES DE ABREU**

**ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA**

**COMPARADA EM VOLUNTÁRIOS**

**SADIOS**

*Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia do Farmacêutico – Luis Renato Pires de Abreu.*

*Campinas, 03 de abril de 2003.*

*Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior  
- Orientador -*

**Prof. Dr. José Pedrazzoli Jr**

**-Orientador-**

***LUIS RENATO PIRES DE ABREU***

**ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA**  
**COMPARADA EM VOLUNTÁRIOS**  
**SADIOS**

Tese de Doutorado, apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia

Orientação: Prof. Dr. José Pedrazzoli Jr.

Campinas

UNICAMP - 2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Abreu, Luis Renato Pires de  
Estudos de farmacocinética comparada em voluntários  
sadios / Luis Renato Pires de Abreu.  
Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador: José Pedrazzoli Júnior  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Medicamentos. 2. Plasma. 3. Espectrometria de massas.  
4. Farmacocinética. I. José Pedrazzoli Júnior. II. Universidade  
Estadual de Campinas. II. Faculdade de Ciências Médicas. III.  
Título.

UNIDADE	80
Nº CHAMADA	UNICAMP
	AB 86 e
V	EX
TOMBS BCI	54403
PRDC.	124/03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/06/03
Nº CPD	

CM00184831-1

313 ID 293063



UNICAMP

## Banca Examinadora da Tese de Doutorado

### Orientador:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

### Membros:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

Prof. Dr. Renato do Rego de Araujo Faro

Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes

Profa. Dra. Neila Maria Cassiano

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

Data: 03/04/2003

70611076

***“A criatividade é mais importante do que a própria inteligência”.***

Albert Einstein  
(1879-1955)

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a minha querida família pelo amor e dedicação com que acompanharam o desenvolvimento de mais esta jornada.

Ao Professor Dr. José Pedrazzoli Jr., orientador e responsável maior por este trabalho científico.

Ao Professor Dr. Gilberto de Nucci, por ter mostrado que a cada minuto algo novo pode ser descoberto e ensinado.

À Profa. Dra. Silvana A. Calafatti, por participar dos trabalhos que originaram esta tese.

Aos colegas da UNIFAG, com os quais tenho mantido um relacionamento entremeado de trabalho e amizade.

Aos funcionários da secretaria, em especial ao Wanderley, pelos inúmeros préstimos.

Aos voluntários que se apresentaram e confiaram em nosso trabalho.

A todos o meu mais sincero obrigado.

# Sumário

Sumário.....	ix
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de figuras.....	xv
Abreviaturas.....	xvii
Resumo.....	xix
<b>1 Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>1.1. Aspectos farmacológicos.....</b>	<b>02</b>
1.1.1. Absorção de fármacos.....	04
1.1.2. Distribuição de fármacos.....	05
1.1.3. Biotransformação de fármacos.....	07
1.1.4. Eliminação de fármacos.....	09
1.1.5. Farmacocinética clínica.....	11
1.1.5.1. Depuração.....	12
1.1.5.2. Volume de distribuição.....	13
1.1.5.3. Meia-vida ( $t_{1/2}$ ).....	14
1.1.6. Aplicações dos estudos farmacocinéticos.....	15
<b>1.2. Medicamentos genéricos.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3. Estudos de bioequivalência.....</b>	<b>22</b>
1.3.1. Etapa clínica.....	23
1.3.2. Etapa analítica.....	25
1.3.3. Etapa estatística.....	26
<b>1.4. Medicamentos analisados.....</b>	<b>27</b>
1.4.1. Amoxicilina.....	27
1.4.2. Azitromicina.....	34
<b>1.5. Métodos de quantificação de fármacos.....</b>	<b>42</b>
1.5.1. Espectrometria de massas: (LC-MS-MS).....	48
<b>1.6. Procedimentos de extração da amostra.....</b>	<b>50</b>
1.6.1. Extração por precipitação de proteínas.....	51
1.6.2. Extração líquido-líquido.....	51
1.6.3. Extração líquido-sólido.....	53
<b>1.7. Padronização Interna e padronização externa.....</b>	<b>54</b>
<b>2-Objetivos.....</b>	<b>55</b>
<b>3-Materiais e Métodos.....</b>	<b>57</b>
3.1. Segurança.....	58
3.2. Equipamentos.....	58
3.3. Solventes e reagentes.....	58
3.4. Padrões.....	60
3.5. Material biológico.....	60
3.6. Preparo das soluções.....	61
3.7. Preparo dos padrões de calibração e dos controlos de qualidade.....	61

4.3.1. Inventário e retenção dos medicamentos.....	99
4.3.1.1. Amostras formulação referência.....	99
4.3.1.2. Amostras formulação teste.....	100
4.3.2. Local para a retenção das formulações.....	100
4.3.3. Análise das concentrações plasmáticas de azitromicina.....	100
<b>4.4. Análise da amoxicilina.....</b>	<b>104</b>
4.4.1. Validação do método e resultados.....	104
4.4.1.1. Validação pré-estudo.....	104
4.4.1.2. Especificidade.....	105
4.4.1.3. Curva de calibração.....	107
4.4.1.4. Determinação dos Limites de quantificação e exatidão.....	107
4.4.1.5. Linearidade.....	108
4.4.1.6. Precisão e exatidão.....	110
4.4.1.7. Determinação das concentrações dos controles de qualidade.....	111
4.4.1.8. Validação intra-dia.....	111
4.4.1.9. Validação inter-dias.....	112
4.4.1.10. Recuperação.....	113
<b>4.5. Estudo de bioequivalência da amoxicilina cápsulas 500 mg.....</b>	<b>114</b>
4.5.1. Inventário e Retenção dos Medicamentos.....	114
4.5.2. Análise das concentrações plasmáticas de amoxicilina.....	114
<b>4.6. Estudo de Bioequivalência da amoxicilina suspensão oral 250 mg/5mL.....</b>	<b>117</b>
4.6.1. Inventário e retenção dos medicamentos.....	118
4.6.2. Análise das concentrações plasmáticas de amoxicilina.....	118
<b>4.7. Discussão dos resultados obtidos.....</b>	<b>121</b>
<b>5-Conclusões.....</b>	<b>127</b>
<b>6-Summary.....</b>	<b>131</b>
<b>7-Referências Bibliográficas.....</b>	<b>134</b>
<b>8-Anexo.....</b>	<b>142</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros utilizados na validação do método.....	26
<b>Tabela 2.</b> Descrição dos equipamentos utilizados.....	59
<b>Tabela 3.</b> Sistema de HPLC.....	59
<b>Tabela 4.</b> Componentes do espectrômetro de Massas.....	60
<b>Tabela 5.</b> Condições do plasma utilizado no preparo da matriz para preparar as curvas de calibração e controles de qualidade.....	60
<b>Tabela 6.</b> Tempos de retenção característicos das amostras.....	73
<b>Tabela 7.</b> Tempos de retenção característicos das amostras.....	76
<b>Tabela 8.</b> Padrões de referência certificados.....	85
<b>Tabela 9.</b> Amostras do fluido biológico (plasma).....	86
<b>Tabela 10.</b> Estudo da estabilidade da azitromicina em plasma (normal, hemolisado e lipêmico).....	86
<b>Tabela 11.</b> Dados da curva de calibração obtida.....	90
<b>Tabela 12.</b> Definição dos controles de qualidade (CQ).....	92
<b>Tabela 13.</b> Análise dos controles de qualidade intra-dia.....	93
<b>Tabela 14.</b> Análise dos controles de qualidade inter-dias.....	94
<b>Tabela 15.</b> Análise da porcentagem de recuperação (n=3).....	94
<b>Tabela 16.</b> Validação dos lotes analisados.....	97
<b>Tabela 17.</b> Média dos parâmetros farmacocinéticos para 24 voluntários depois da administração de azitromicina comprimidos revestidos 500 mg (teste) e Zitromax® (padrão).....	98
<b>Tabela 18.</b> Análise estatística para a razão da $ASC_{(0-216h)}$ e $C_{max}$ da azitromicina comprimidos revestidos 500 mg (teste) e Zitromax® (padrão).....	98
<b>Tabela 19.</b> Análise da diferença individual de $t_{max}$ (teste-referência).....	99
<b>Tabela 20.</b> Validação dos lotes analisados.....	101
<b>Tabela 21.</b> Média dos parâmetros farmacocinéticos para 24 voluntários depois da administração de azitromicina suspensão oral (200mg/5ml) e Zitromax® suspensão oral (200mg/5ml).....	102
<b>Tabela 22.</b> Análise estatística para a razão da $ASC_{(0-216h)}$ e $C_{max}$ da azitromicina suspensão oral 200mg/5ml (teste) e Zitromax® suspensão oral 200mg/5ml (Pfizer -padrão).....	103
<b>Tabela 23.</b> Análise da diferença individual de $t_{max}$ (teste-referência).....	103
<b>Tabela 24.</b> Padrões de referência certificados.....	105
<b>Tabela 25.</b> Amostras do fluido biológico (plasma).....	105
<b>Tabela 26.</b> Dados da curva de calibração obtida.....	109
<b>Tabela 27.</b> Definição dos controles de qualidade (CQ).....	111
<b>Tabela 28.</b> Análise dos controles de qualidade intra-dia.....	112
<b>Tabela 29.</b> Análise dos controles de qualidade inter-dias.....	113
<b>Tabela 30.</b> Análise da porcentagem de recuperação dos controles de qualidade.....	114
<b>Tabela 31.</b> Validação dos lotes analisados.....	116
<b>Tabela 32.</b> Média dos parâmetros farmacocinéticos para 24 voluntários depois da administração de amoxicilina (500 mg) e Amoxil® (500 mg).....	116
<b>Tabela 33.</b> Análise estatística para a razão da $ASC_{(0-8h)}$ e $C_{max}$ da amoxicilina cápsulas 500 mg (teste) e Amoxil® cápsulas 500 mg (padrão).....	117
<b>Tabela 34.</b> Análise da diferença individual de $t_{max}$ (teste-referência).....	117
<b>Tabela 35.</b> Validação dos lotes analisados.....	119
<b>Tabela 36.</b> Média dos parâmetros farmacocinéticos para 24 voluntários depois da administração de amoxicilina suspensão - teste (250mg/5ml) e Amoxil® suspensão (250mg/5ml).....	120
<b>Tabela 37.</b> Análise estatística para a razão da $ASC_{(0-8h)}$ e $C_{max}$ da amoxicilina suspensão-(teste) e Amoxil® suspensão (padrão).....	121
<b>Tabela 38.</b> Análise da diferença individual de $t_{max}$ (teste-referência).....	121

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Farmacocinética e farmacodinâmica.....	2
<b>Figura 2.</b> Processo de absorção de formas farmacêuticas sólidas.....	4
<b>Figura 3.</b> Distribuição de fármacos no organismo.....	6
<b>Figura 4.</b> Biotransformação de fármacos.....	8
<b>Figura 5.</b> Anatomia do néfron.....	9
<b>Figura 6.</b> Excreção renal de fármacos.....	10
<b>Figura 7.</b> Estruturas da amoxicilina, ampicilina e cefadroxil.....	29
<b>Figura 8.</b> Estruturas da azitromicina e eritromicina.....	35
<b>Figura 9.</b> Cromatografia em coluna clássica.....	43
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do cromatógrafo a gás.....	45
<b>Figura 11.</b> Fotografia do cromatógrafo a gás.....	45
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática do cromatógrafo a líquido.....	46
<b>Figura 13.</b> Fotografia do cromatógrafo a líquido.....	46
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática do cromatógrafo a fluido supercrítico.....	47
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática do espectrômetro de massas.....	49
<b>Figura 16.</b> Fotografia do espectrômetro de massas.....	50
<b>Figura 17.</b> Extração por precipitação de proteínas.....	51
<b>Figura 18.</b> Extração líquido-líquido.....	52
<b>Figura 19.</b> Extração líquido-sólido.....	53
<b>Figura 20.</b> Padrão de fragmentação da azitromicina e eritromicina (Padrão Interno).....	80
<b>Figura 21.</b> Espectro de massas da eritromicina (energia do cone 20V e 40V).....	80
<b>Figura 22.</b> Espectro de massas da azitromicina (energia do cone 20V e 40V).....	81
<b>Figura 23.</b> Análise da azitromicina. A) plasma branco normal; B) plasma branco normal + padrão interno (eritromicina 100 ng/ml); C) plasma normal com azitromicina (1500 ng/ml concentração nominal) + padrão interno.....	87
<b>Figura 24.</b> Curva de calibração da azitromicina.....	91
<b>Figura 25.</b> Curva da concentração plasmática média ( $\pm$ EPM) de 24 voluntários vs. tempo (h) submetidos ao estudo entre Azitromicina (teste) e Zitromax® (padrão).....	97
<b>Figura 26.</b> Curva da concentração plasmática média ( $\pm$ EPM) de 24 voluntários vs. tempo (h) submetidos ao estudo entre Azitromicina-suspensão oral 200mg/5ml (teste) e Zitromax® suspensão oral 200mg/5ml (padrão).....	101
<b>Figura 27.</b> Análise da amoxicilina A) plasma branco; B) plasma branco + padrão interno (cefadroxil 15 $\mu$ g/ml); C) plasma com amoxicilina (20 $\mu$ g/ml) e padrão interno.....	106
<b>Figura 28.</b> Curva de calibração da amoxicilina.....	110
<b>Figura 29.</b> Curva da concentração da plasmática média ( $\pm$ EPM) de 24 voluntários vs tempo (h) submetidos ao estudo entre amoxicilina cápsulas 500 mg (teste) e Amoxil® (Padrão).....	115
<b>Figura 30.</b> Curva da concentração plasmática média ( $\pm$ EPM) de 24 voluntários vs tempo (h) submetidos ao estudo entre Amoxicilina suspensão oral 250mg/5ml (teste) e Amoxil® (padrão)..	119

## Lista de Abreviaturas

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ASC** – Área sob a curva farmacocinética da substância

**CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa

**C<sub>max</sub>** – Pico de concentração plasmática máxima do medicamento

**CONEP** – Conselho Nacional de Ética em Pesquisa

**CLAE ou HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**FDA** – *Food and Drug Administration* – Agência de controle de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos da América.

**LC-MS-MS** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa.

**ES** - *Electrospray Ionization*.

**FCM** – Faculdade de Ciências Médicas

**HUSF** – Hospital da Universidade São Francisco

**IS** – *Internal Standard* – Padrão Interno.

**min** – Minuto (s)

**MRM** – *Multiple Reaction Monitoring*

**m/z** – Relação entre a massa de um íon e sua carga

**CQ** – Controle de qualidade

**T<sub>max</sub>** – Tempo do pico de concentração de um fármaco

**UNICAMP** – Universidade de Campinas

**UNIFAG** – Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia

**UV** - Ultravioleta

---

---

## ***Resumo***

A adoção de uma política de medicamentos genéricos, envolvendo a produção, a garantia de qualidade, a prescrição, a dispensação e o uso dos mesmos é parte fundamental de uma diretriz para promoção e o uso racional de medicamentos em nosso País. A promoção do uso racional de medicamentos é, também, uma das principais diretrizes preconizadas pela Organização Mundial da Saúde-OMS.

A fim de alcançar esse objetivo, é fundamental a realização de estudos de farmacocinética comparada de fármacos, para verificar se existe bioequivalência entre o medicamento teste e o medicamento referência adotado como padrão pelo Ministério da Saúde. Também se torna necessário o desenvolvimento de metodologias de baixo custo e fácil aplicação, com sensibilidade e seletividade adequados para realização desse tipo de estudo. Assim sendo, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de metodologia analítica apropriada para realização de quatro ensaios de farmacologia clínica, determinando diversos parâmetros farmacocinéticos e utilizando-os para comparar duas formulações do mesmo fármaco, com diferentes origens, em cada ensaio.

Para realização do estudo, foram utilizados oito grupos de voluntários sadios. Cada estudo será composto por dois grupos de 12 voluntários, que se alternarão, submetendo-se a dois períodos de internação cada. Desta maneira todos os voluntários receberão as duas formulações do fármaco em estudo, sempre respeitando um período entre as internações. Este período garantirá a total eliminação do fármaco de uma formulação antes da administração da próxima.

Estando os resultados deste estudo em acordo com as especificações exigidas, razão entre as médias de  $ASC_{0-t}$  e  $C_{max}$  entre 80-125%, pode-se concluir que as formulações azitromicina comprimidos revestidos (teste) e Zitromax<sup>®</sup> comprimidos revestidos (padrão) e azitromicina suspensão oral (teste) e Zitromax<sup>®</sup> suspensão oral (padrão) comparadas, são bioequivalentes.

Da mesma maneira, as formulações amoxicilina cápsulas (teste) e Amoxil<sup>®</sup> cápsulas (padrão) e amoxicilina suspensão oral (teste) e Amoxil<sup>®</sup> suspensão oral (padrão) comparadas, são bioequivalentes.

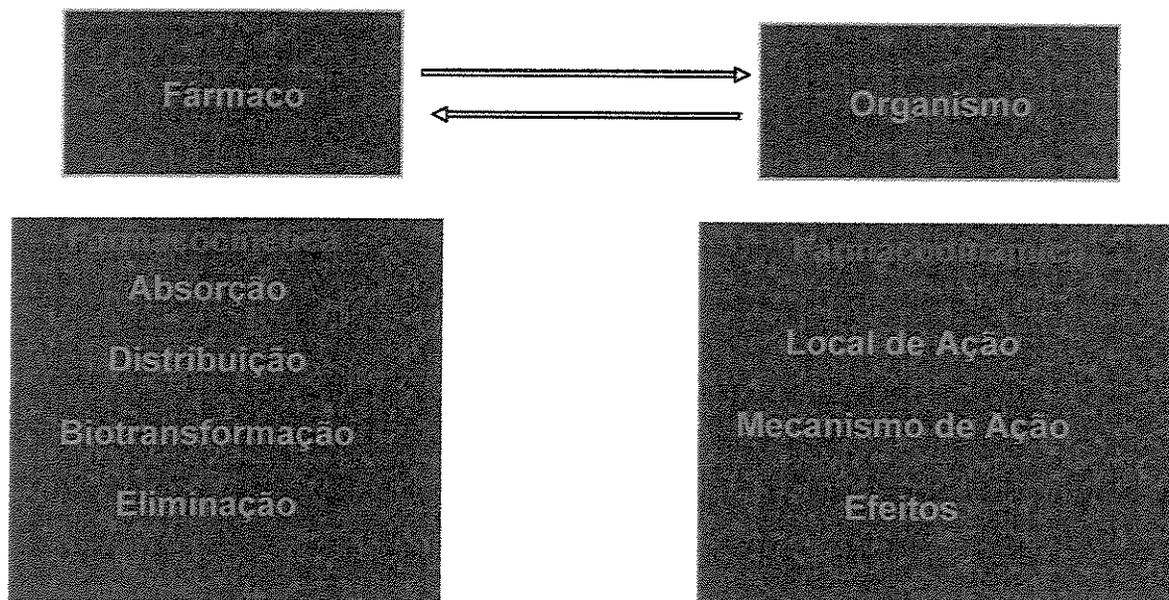
---

---

# ***Introdução***

## 1.1.Aspectos Farmacológicos.

Quando um fármaco é introduzido num organismo vivo, este apresenta propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. A farmacodinâmica estuda o efeito desses compostos no organismo bem como os mecanismos através dos quais elas atuam. A farmacocinética é a parte da farmacologia encarregada de estudar os fenômenos envolvidos nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um medicamento (Page *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Farmacocinética e farmacodinâmica.

A absorção, a distribuição, a biotransformação e a eliminação de uma substância envolvem a sua passagem através das membranas celulares. As características mais importantes de um fármaco são sua estrutura e massa molecular, sua solubilidade no local de absorção, o grau de ionização e a lipossolubilidade relativa de suas formas ionizadas e não-ionizadas (Goodman & Gilman, 1991).

Quando uma substância penetra numa célula, precisa atravessar a membrana plasmática celular, na qual as moléculas protéicas globulares também penetram ou a atravessam por completo uma dupla camada fluida de fosfolípido (Singer & Nicholson, 1972).

Cada molécula de lipídio, na camada dupla, consegue mover-se lateralmente conferindo à membrana fluidez, flexibilidade, elevada resistência elétrica e impermeabilidade relativa às moléculas extremamente polares. Complexos de proteínas intrínsecas da membrana e lipídios conseguem formar canais hidrofóbicos e hidrofílicos que permitem o transporte de moléculas com características diferentes (Ridout *et al.*, 1988).

Os fármacos atravessam as membranas tanto através de processos passivos como por mecanismos que envolvem a participação ativa dos componentes da membrana. No primeiro caso, a molécula do fármaco costuma atravessar por difusão passiva através de um gradiente de concentração graças à sua solubilidade na camada lipídica. Esta transferência é diretamente proporcional à magnitude dos gradientes de concentração através da membrana e a lipossolubilidade do fármaco. Quanto mais lipossolúvel, maior é a concentração do fármaco na membrana e mais rápida é a sua difusão. Após ter atingido um estado de equilíbrio dinâmico, a concentração de fármaco livre é igual de ambos os lados da membrana. No caso de compostos iônicos, as concentrações no estado de equilíbrio dinâmico dependerão de diferenças de pH através da membrana, que influenciam a ionização da molécula de cada lado da membrana e o gradiente eletroquímico do íon. A maioria das membranas biológicas é relativamente permeável à água, seja por difusão ou pelo fluxo que resulta de diferenças

hidrostáticas ou osmóticas através da membrana. Este fluxo de água pode carrear consigo pequenas substâncias hidrossolúveis. De modo geral, essas substâncias não atravessam as membranas celulares quando suas massas moleculares são superiores a 100 uma (Brodie, 1964; Prescott, 1981).

### 1.1.1. Absorção de fármacos.

A absorção descreve a velocidade com a qual o fármaco deixa seu local de administração e a magnitude com que isto ocorre. Muitas variáveis, além dos fatores físico-químicos que afetam o transporte através das membranas, influenciam a absorção dos fármacos (Goodman & Gilman, 1991).

As substâncias administradas em solução aquosa são absorvidas mais rapidamente que aquelas administradas em soluções oleosas, suspensões ou forma sólida; porque se misturam mais facilmente com a fase aquosa no local de absorção. No caso de substâncias administradas na forma sólida, a velocidade de dissolução será o fator limitante da sua absorção (Prescott, 1981).

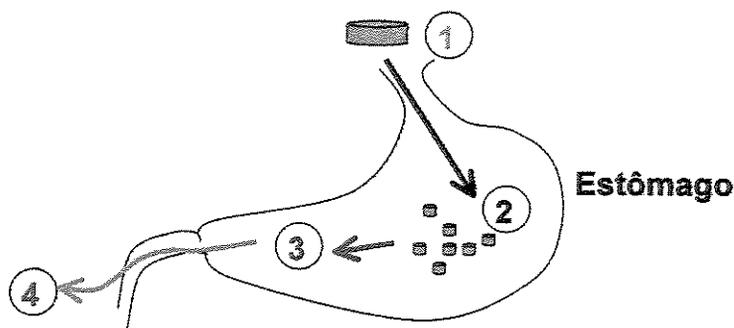


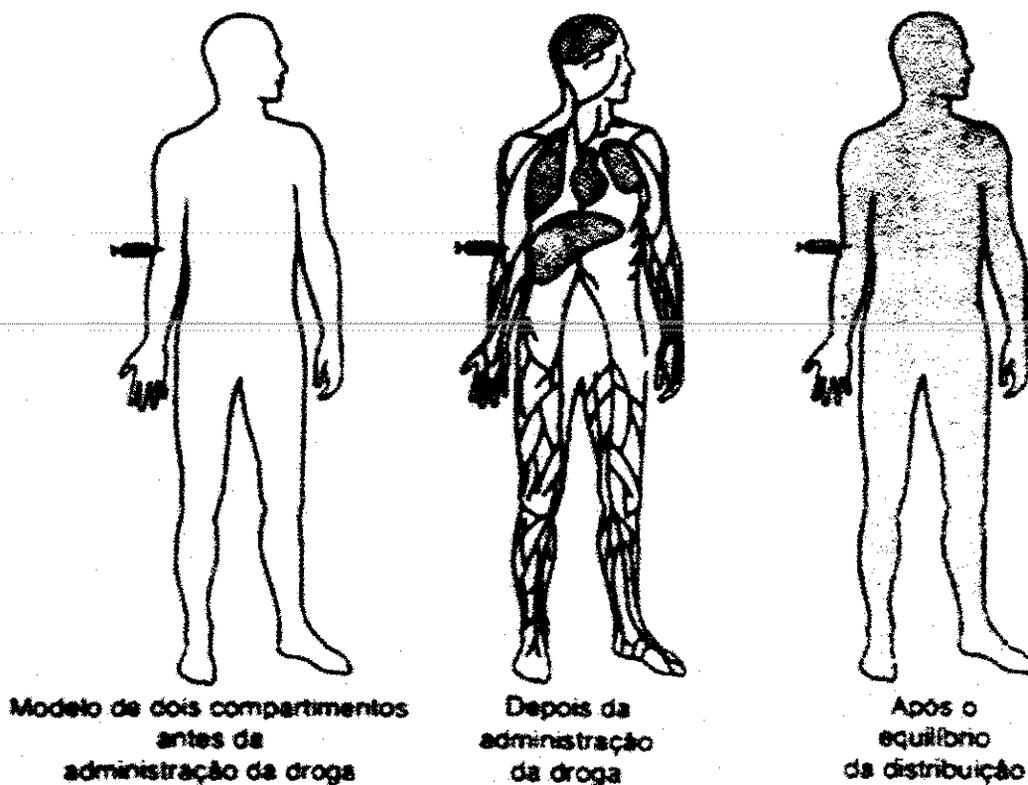
Figura 2. Processo de absorção de formas farmacêuticas sólidas.

A concentração de um fármaco influencia a velocidade de sua absorção. Os agentes ingeridos ou injetados em soluções de concentração elevada são absorvidos mais rapidamente do que aqueles em solução de baixa concentração. A circulação para o local da absorção também afeta a absorção do fármaco. O maior fluxo sanguíneo aumenta a velocidade de absorção do fármaco, enquanto a redução do fluxo sanguíneo, diminui a absorção (Prescott, 1981).

A área de superfície absorvente à qual um fármaco é exposto é um dos determinantes mais importantes da velocidade de absorção. As substâncias são absorvidas muito rapidamente a partir de grandes superfícies, como a mucosa intestinal. Como a maior parte da absorção pelo trato gastrointestinal ocorre através de processos passivos, a absorção é favorecida quando o fármaco se encontra na forma não-ionizada, que é mais lipofílica (Brodie, 1964).

#### 1.1.2. Distribuição de fármacos.

Após ser absorvido ou injetado na corrente sanguínea, o fármaco distribui-se para os líquidos intersticial e celular. Pode ser diferenciada uma fase inicial de distribuição que reflete o débito cardíaco e o fluxo sanguíneo regional. O coração, o fígado, os rins, o cérebro e outros órgãos bem perfundidos recebem a maior parte dos fármacos durante os primeiros minutos após a sua absorção. O aporte do fármaco à musculatura, à maioria das vísceras, à pele e ao tecido adiposo é mais lento, e estes tecidos exigem de minutos a algumas horas para atingir o estado de equilíbrio (Benet, 1978).



**Figura 3.** Distribuição de fármacos no organismo.

Uma segunda fase de distribuição do fármaco pode então ser percebida e está também limitada pelo fluxo sanguíneo; envolvendo uma fração muito maior da massa corporal do que a primeira. Os fármacos, que não são lipossolúveis e penetram mal nas membranas têm sua distribuição limitada e, portanto, seus locais de ação potenciais também são limitados. Além disso, a distribuição pode ser limitada por uma ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas, sobretudo à albumina (no caso dos fármacos ácidos) e à  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (no caso de substâncias básicas). Um agente que apresenta ligação extensa e forte com as proteínas plasmáticas tem acesso limitado aos locais de ação celulares e é

metabolizado e eliminado lentamente. Os fármacos podem acumular-se nos tecidos em concentrações maiores do que o esperado nos equilíbrios de difusão, como resultado do gradiente de pH, ligação com componentes intracelulares ou distribuição em lipídios (Roberts *et al.*, 1988). Os fármacos que se acumulam em determinado tecido podem servir como reservatório que prolonga suas ações do fármaco no mesmo tecido ou num local distante atingido através da circulação (Nebert & Gozalez, 1987).

Uma terceira fase de distribuição destes fármacos origina-se da lenta captação do fármaco pelo tecido adiposo (limitada pelo fluxo sanguíneo). Esses pontos podem tornar-se reservatórios para a manutenção da concentração plasmática (Benet, 1978).

### 1.1.3. Biotransformação de fármacos.

A biotransformação enzimática de fármacos em metabólitos mais polares e menos lipossolúveis aumenta sua excreção e reduz seu volume de distribuição. Tal biotransformação alivia a carga de substâncias químicas estranhas e é essencial à sobrevivência do organismo (Goldstein *et al.*, 1974).

Os sistemas enzimáticos responsáveis pela biotransformação de muitos fármacos estão localizados no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos no fígado (fração microssômica). Tais enzimas também são encontradas em outros órgãos como rins, pulmões e epitélio gastrointestinal. Os fármacos absorvidos pelo intestino estão, portanto, sujeitos ao efeito de primeira passagem. Isto representa a ação combinada de enzimas epiteliais gastrointestinais e hepáticas, que

algumas vezes podem impedir que concentrações efetivas do fármaco ativo atinjam a circulação sistêmica após a administração oral, como já foi comentado antes (Nebert & Gozalez, 1987).

As reações químicas da biotransformação enzimática são classificadas com reações em fase I ou II. As reações de fase I convertem o fármaco original em um metabólito mais polar através de oxidação, redução ou hidrólise. O metabólito resultante pode ser farmacologicamente inativo, menos ativo ou mais ativo que a molécula original. Quando o próprio metabólito é a forma ativa, o composto original é denominado pró-fármaco. As reações de fase II, que também são denominadas reações de conjugação ou de síntese, envolvem a ligação do fármaco ou de seu metabólito polar a um substrato endógeno como glicuronato, sulfato, acetato ou um aminoácido (Page *et al.*, 2002).

<i>Reações Fase I</i>	<i>Reações Fase II</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Oxidação</li><li>• Redução</li><li>• Hidrólise</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Conjugação com ácido glucorônico</li><li>• Conjugação com peptídeos</li><li>• Conjugação com sulfatos</li><li>• Metilação</li><li>• Acetilação</li><li>• Síntese de ácido mercaptúrico</li></ul>

Figura 4. Biotransformação de fármacos.

Os estudos de biotransformação em animais de laboratório mostram que um grande número de fatores genéticos, ambientais e fisiológicos afetam a metabolização de um fármaco. No homem, os fatores mais importantes são

polimorfismos geneticamente determinados nas oxidações e conjugações dos fármacos, influências ambientais, incluindo uso concomitante de outras substâncias que induzam ou inibam enzimas metabolizadoras de fármacos, e a existência de doenças hepáticas, quase sempre associadas à grave desnutrição (Bridges, 1987).

#### 1.1.4. Eliminação de fármacos.

Os fármacos são eliminados do organismo tanto na forma inalterada como na forma de metabólitos. Os órgãos excretores, com a exclusão dos pulmões, eliminam os compostos polares de forma mais eficiente do que as substâncias com lipossolubilidade elevada. Os fármacos lipossolúveis, portanto, não são eliminados até serem metabolizados em compostos mais polares. O rim é o órgão mais importante de eliminação de fármacos e metabólitos (Guyton, 1973).

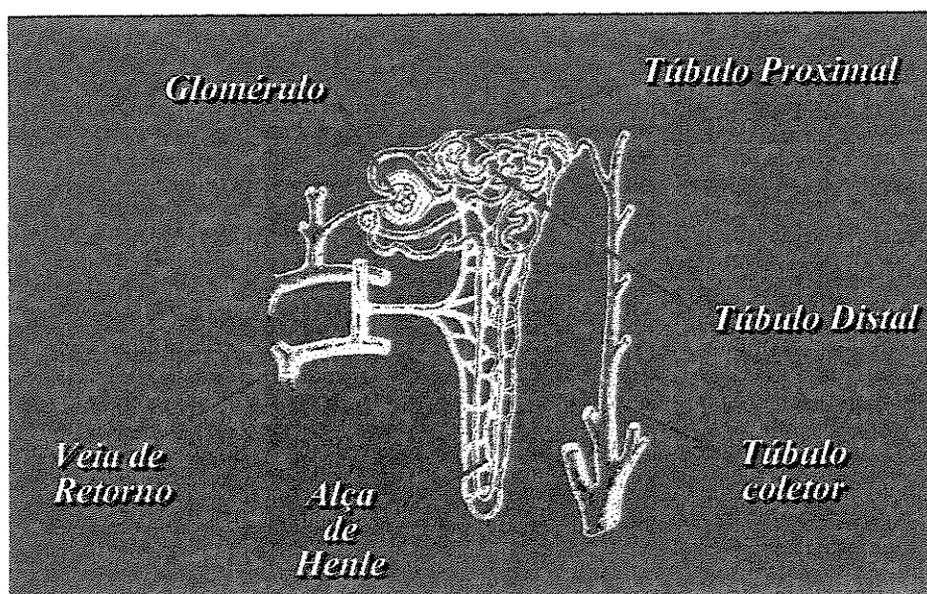
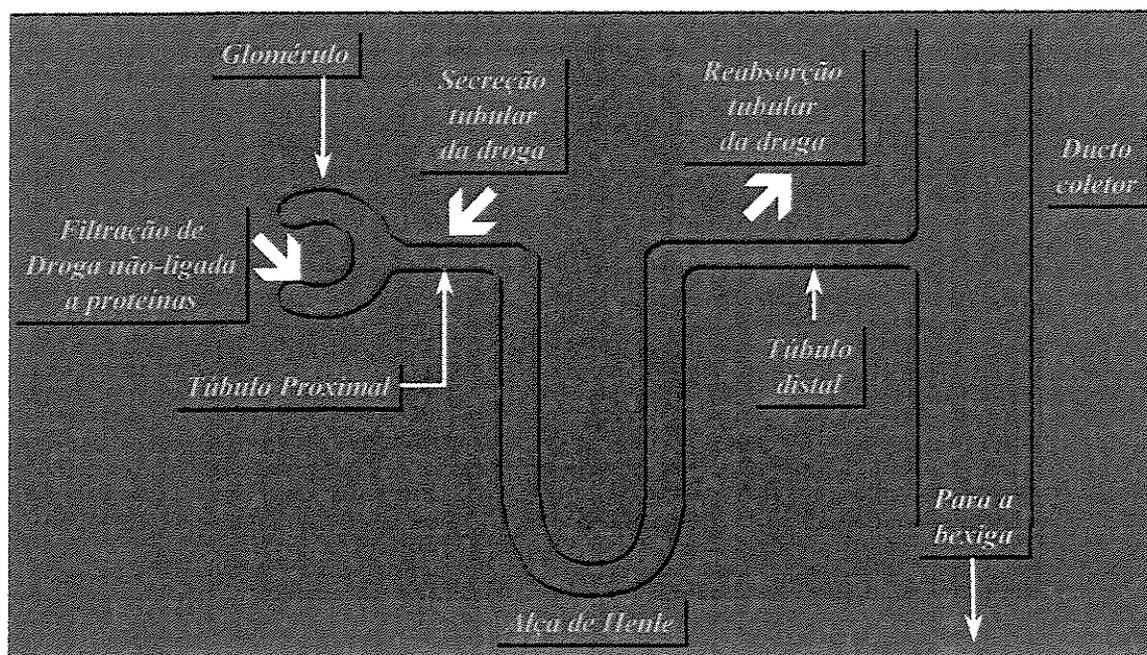


Figura 5. Anatomia do néfron.

As substâncias eliminadas nas fezes são, sobretudo, aquelas administradas por via oral e que não são absorvidas ou metabólitos excretados na bile que não são reabsorvidos pelo trato gastrointestinal. A excreção pulmonar é importante, sobretudo, para eliminação de vapores e gases anestésicos e, às vezes, pequenas concentrações de outros fármacos ou metabólitos são eliminados por esta via (Guyton, 1973). A eliminação de fármacos e metabólitos na urina envolve três processos: filtração glomerular, secreção ativa e reabsorção tubular passiva (Atkinson *et al.*, 1988).

A concentração de fármaco que penetra na luz tubular por filtração depende de sua ligação protéica plasmática fracional e da velocidade de filtração glomerular. No túbulo renal proximal, determinados ânions e cátions orgânicos são adicionados ao filtrado glomerular através de secreção tubular ativa mediada por carreadores (Atkinson *et al.*, 2001; Guyton, 1973).



**Figura 6.** Excreção renal de fármacos.

Os sistemas carreadores são relativamente não seletivos e íons orgânicos de carga elétrica semelhante competem pelo transporte. Os sistemas de transporte também podem ser bidirecionais e pelo menos alguns fármacos são secretados e ativamente reabsorvidos. Todavia, o transporte da maioria dos íons exógenos é predominantemente secretório. Nos túbulos proximais e distais, as formas não ionizadas de ácidos e bases fracas sofrem reabsorção passiva final. O gradiente de concentração da retrodifusão é criado pela reabsorção da água com Na<sup>+</sup> e outros íons inorgânicos. Como as células tubulares são menos permeáveis às formas ionizadas que ao eletrólito fraco, a reabsorção passiva dessas substâncias é pH dependente. Quando a urina tubular se torna mais alcalina, os ácidos fracas são eliminados mais rapidamente, basicamente porque estão mais ionizados e diminuem a reabsorção passiva. Quando a urina tubular é acidificada, diminui a excreção de ácidos fracas. A alcalinização e a acidificação da urina têm efeitos opostos sobre a excreção de bases fracas (Goodman & Gilman, 1991).

Muitos metabólitos formados no fígado são eliminados na bile para o trato intestinal. Esses metabólitos podem ser excretados nas fezes, reabsorvidos para o sangue e por fim eliminados na urina. A excreção de fármacos pelo suor, saliva, pelas lágrimas e leite materno não é importante do ponto de vista quantitativo (Atkinson *et al.*, 1988).

#### 1.1.5. Farmacocinética clínica.

Uma hipótese fundamental da farmacocinética clínica é que existe uma correlação entre a resposta farmacológica ou tóxica a um fármaco e a sua concentração na circulação sistêmica e que está relacionada à sua concentração nos seus locais de ação (Page *et al.*, 2002).

As inúmeras variáveis fisiológicas e fisiopatológicas que ditam os ajustes posológicos em pacientes, freqüentemente o fazem como resultado de uma modificação dos parâmetros farmacocinéticos. Os três parâmetros mais importantes são: depuração (uma medida da capacidade do organismo de eliminar o fármaco), volume de distribuição (uma medida no espaço aparente do corpo disponível para conter o fármaco) e biodisponibilidade (a fração do fármaco absorvida como tal na circulação sistêmica) (Atkinson *et al.*, 1988; Shorget & Andrew, 1941).

#### 1.1.5.1. Depuração.

O conceito de depuração (Clearance - CL) é extremamente valioso na farmacocinética clínica, porque a eliminação de determinado fármaco costuma ser constante na amplitude de concentrações encontradas clinicamente. Em níveis simples, a depuração de um fármaco é a taxa de eliminação por todas as vias normalizadas de acordo com a concentração do fármaco (C) em algum líquido biológico (Klotz *et al.*, 1975):

$$CL = \text{Taxa de eliminação} / C$$

É importante observar que a depuração não indica quanto do fármaco está sendo eliminado, mas sim o volume de líquido biológico, como o sangue e o

plasma, que precisaria estar completamente livre do agente para contribuir para sua eliminação. A depuração é expressa como volume por unidade de tempo. Em geral, a depuração costuma ser definida como depuração sanguínea ( $CL_b$ ), depuração plasmática ( $CL_p$ ) ou depuração baseada na concentração de fármaco livre ( $CL_u$ ), dependendo da concentração medida ( $C_b$ ,  $C_p$  ou  $C_u$ ) (Benet, 1984; Atkinson *et al.*, 2001).

A depuração através de vários órgãos de eliminação é aditiva. A eliminação do fármaco pode ser decorrente dos processos que ocorrem nos rins, no fígado e em outros órgãos. A divisão da taxa de eliminação por cada órgão por uma concentração do fármaco (concentração plasmática) fornecerá a depuração respectiva deste órgão. Em conjunto, tais depurações separadas serão iguais à depuração sistêmica total (Goodman & Gilman, 1991; Shorget & Andrew, 1941):

$$CL_{\text{renal}} + CL_{\text{hepática}} + CL_{\text{outros}} = CL_{\text{sistêmica}}$$

Para uma única dose de um fármaco com biodisponibilidade completa e cinética de eliminação de primeira ordem, a depuração sistêmica total poderia ser (Klotz *et al.*, 1975):

$$CL = \text{Dose}/AUC$$

Na qual AUC é a área total sob a curva que descreve a concentração do fármaco na circulação sistêmica em função do tempo (de zero até o infinito) (Klotz *et al.*, 1975).

#### 1.1.5.2. Volume de distribuição.

O volume é um segundo parâmetro fundamental na discussão dos processos de distribuição farmacológica. O volume de distribuição (V) relaciona a concentração de fármaco no organismo com a concentração de fármaco (C) no sangue e no plasma, dependendo do líquido medido. Este volume não se refere necessariamente a um volume fisiológico identificável, mas apenas ao volume de líquido que seria necessário para conter todo o fármaco no organismo, na mesma concentração em que se encontra no sangue ou no plasma (Benet & Galeazzi, 1979):

$$V = \text{Quantidade de fármaco no organismo} / C$$

O volume de plasma de um homem normal de 70 kg é de 3 litros, o volume sangüíneo é de aproximadamente 5,5 litros, o volume de líquido extracelular fora do plasma é de 12 litros e o volume de água corporal total é de aproximadamente 42 litros. Entretanto, muitos fármacos exibem volumes de distribuição muito superiores a estes valores. No caso de substâncias que apresentam ligação substancial com as proteínas plasmáticas, mas que não se ligam aos componentes teciduais, o volume de distribuição aproximar-se-á do volume plasmático. Em contrapartida, determinados fármacos apresentam volume de distribuição elevado, embora a maior parte do fármaco na circulação esteja ligada à albumina, porque tais fármacos também são seqüestrados em outros pontos do organismo (Benet *et al.*, 1984; Shorget & Andrew, 1941).

#### 1.1.5.3. Meia -vida ( $t_{1/2}$ ).

É o tempo que leva para a concentração plasmática ou a concentração da substância no corpo ser reduzida em 50 %. No caso mais simples, o modelo monocompartimental, a meia-vida pode ser determinada rapidamente e usada para tomar decisões sobre posologia do fármaco (Benet, 1984).

A meia-vida é um parâmetro que varia de acordo com a depuração e o volume de distribuição. Uma correlação aproximada entre a meia-vida clinicamente importante, a depuração e o volume de distribuição é dada por (Goodman & Gilman, 1991):

$$t_{1/2} = 0.693 \times V / CL$$

A depuração é a medida da capacidade do organismo em eliminar uma substância. Entretanto, os órgãos de eliminação só podem retirar o fármaco do sangue ou do plasma com o qual estão em contato direto (Atkinson *et al.*, 2001; Shorget & Andrew, 1941).

Embora possa ser um indicador satisfatório da eliminação do fármaco, a meia-vida realmente é um bom indicador do tempo necessário para atingir um estado de equilíbrio dinâmico (Klotz *et al.*, 1975).

#### 1.1.6. Aplicações dos estudos farmacocinéticos.

O comportamento farmacocinético de uma nova droga é, normalmente, determinado em animais antes de ser utilizado em humanos. Os testes em animais de laboratório seguem até o ponto em que se faz necessário obter resultados em experimentos clínicos envolvendo seres humanos, pois existem

variações nos parâmetros farmacocinéticos quando comparamos resultados obtidos em animais e em humanos (Roberts *et al.*, 1988).

Um número cada vez maior de novas substâncias com potencial terapêutico, bem como a comercialização de produtos similares por diferentes empresas, têm estimulado o desenvolvimento de novos métodos para o controle de qualidade. Os ensaios clínicos tornaram-se importantes ferramentas para avaliar isolada ou de forma comparativa as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Atkinson *et al.*, 2001).

O desenvolvimento e a regulamentação destes ensaios clínicos tornaram-se reconhecidamente mais importantes a partir da década de 50, quando passaram a ser conduzidos de acordo com os interesses científicos e éticos (Atkinson *et al.*, 2001). Entretanto, foi em 1753 que Lind planejou e desenvolveu um dos primeiros ensaios clínicos de que se tem notícia. Em seu trabalho, utilizou 12 pacientes portadores de escorbuto, dividindo-os em grupos e tratamentos diferentes. Louis também executou importante estudo, demonstrando que a terapia de sangria, quando efetuada para tratamento de pneumonia (78 casos) erisipela (33 casos) e inflamação de garganta (23 casos), não causa qualquer benefício quando comparado ao grupo controle. Este resultado foi fundamental para o fim de tal prática (Louis, 1834). Sutton realizou o primeiro trabalho descrito, com uso de placebo como controle e demonstrou a tendência natural de cura em alguns casos de febre reumática (Sutton, 1865). Holmes indicou a necessidade de progressos nas pesquisas clínicas dos Estados Unidos, para diminuir a incidência de auto medicação, num público que “insiste em ser envenenado” (Holmes, 1891). Em 1915, Greenwood e Yule demonstraram a importância da distribuição dos

pacientes em grupos para a validação de resultados (Greenwood & Yule, 1915). Fergusson e colaboradores, em 1927, foram provavelmente os primeiros a introduzir o conceito de “cego” aos estudos clínicos, fazendo testes com vacinas (Fergusson *et al.*, 1927).

Na década de 30, as principais áreas geradoras de ensaios clínicos eram as sulfonamidas e as drogas antimaláricas. Colebrook e Perdie mostraram uma redução na mortalidade de 22 para 8%, com uso de sulfonamidas na febre pós-parto, comparando com o grupo de controle, com o histórico de pacientes tratados no mesmo hospital (Colebrook & Perdie, 1937).

A descoberta da penicilina pode ser considerada o mais importante avanço terapêutico do século vinte, levando à elaboração de um ensaio clínico com grande número de pacientes e médicos colaboradores que teve lugar no norte da África. Após os primeiros resultados, os médicos passaram a utilizá-la em pacientes mais graves do que aqueles propostos, quase chegando a prejudicar o resultado final do estudo (Blumberg & Strominger, 1974).

É geralmente aceito que o primeiro ensaio clínico, com um grupo de controle aleatório (randomizado), foi realizado para estreptomicina, em tratamento de tuberculose pulmonar. Este ensaio foi notável pelo grau de cuidado com o planejamento, execução e relato, traços desejados nos ensaios clínicos atuais. Vários centros foram utilizados, além da distribuição aleatória para o tratamento. Os grupos foram divididos em tratados com a droga e repouso e apenas repouso. Colocadas em envelopes lacrados, as radiografias foram avaliadas por três médicos, de forma independente e sem conhecimento prévio de outros laudos e do tratamento aplicado ao paciente. Os resultados validaram amplamente o uso

de estreptomicina. Outro estudo, por sua vez, demonstrou que o uso de anti-histaminícos no tratamento da gripe não apresenta vantagens ao ser comparado com o placebo. Neste estudo foi introduzido o duplo cego, onde nem médico nem paciente tinham conhecimento prévio da formulação administrada (Bull, 1959).

Sir Austin Bradford Hill foi o principal pesquisador envolvido com ensaios clínicos no “Medical Research Council” tendo organizado vários estudos clínicos e publicado diversos artigos sobre condução destes protocolos, demonstrando a importância da escolha dos pacientes, randomização, avaliação objetiva e análise estatística (Atkinson *et al.*, 2001).

Os motivos que retardaram o progresso dos ensaios clínicos foram “reverência à autoridade, relacionamento entre médico e paciente, poucos registros, falta de facilidades para investigação e falta de remédios ativos”. A razão mais importante para o desenvolvimento de novos estudos foi a crescente preocupação com o tratamento de doenças não transmissíveis (Bull, 1959).

A indústria farmacêutica sofreu uma enorme expansão nos últimos 40 anos, e com isso novas drogas foram descobertas e sintetizadas. Antes da II Guerra Mundial não havia qualquer controle para que uma droga fosse livremente comercializada. Contudo nos Estados Unidos já existia, desde 1938, legislação para uso de drogas em animais. Foi apenas na década de 60, com a catástrofe da talidomida, que tanto os Estados Unidos como a Inglaterra, intensificaram as regulamentações para execução de ensaios em humanos. A partir de 1963 é obrigatória uma aprovação oficial para que a droga inicie um ensaio clínico e, posteriormente, nova aprovação para ser comercializada no Reino Unido. Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration) desenvolveu e aplicou

diretrizes (a partir da década de 70) para a elaboração de um modelo seguro de pesquisa clínica, seguido por muitos outros países, diferindo do modelo britânico, principalmente por valorizar sobremaneira a documentação dos dados obtidos (Atkinson *et al.*, 2001).

É, sem dúvida, verdadeira a afirmação de que hoje se faz mais ensaios clínicos do que em outras épocas, sendo em sua grande maioria financiados pela própria indústria farmacêutica. Na última década tem-se investido principalmente em três linhas de drogas: as de ação antiinfeciosa, as que atuam no sistema nervoso central e as ativas sobre o sistema cardiovascular. Apenas uma em dez mil drogas sintetizadas atinge a fase de ensaio clínico, isso explica porque é gasto mais com ensaios pré-clínicos do que com clínicos. Além disso, apenas cerca de 20 % destas são geralmente comercializadas. Todo este processo gasta cerca de 7 a 10 anos para colocar uma droga nova no mercado, com um custo estimado de 54 milhões de dólares (Atkinson *et al.*, 2001).

No Brasil, houve um grande salto (tanto qualitativo quanto quantitativo) nos trabalhos científicos relacionados à farmacologia clínica, com o surgimento da nova política de medicamentos genéricos (ANVISA, 2001).

Os ensaios clínicos são classificados dentro de quatro grupos, chamados fases. Estas quatro fases formam uma diretriz geral para que programas de pesquisa, visando novo tratamento, possam desenvolver-se (Atkinson *et al.*, 2001).

Os ensaios clínicos, de fase I, têm como principal objetivo o conhecimento sobre toxicidade da droga e não, particularmente, eficácia. Usualmente são utilizados voluntários sadios. O primeiro objetivo é determinar uma dosagem única

aceitável da droga, ou seja, o quanto de determinada droga pode ser administrado a um indivíduo sem causar efeitos colaterais severos. Tal informação é geralmente obtida com escalonamento de doses. A fase I envolve também estudos de biodisponibilidade e metabolismo da droga. Posteriormente, estudos com múltiplas doses serão empregados para determinar um programa apropriado de doses para a fase II. Os ensaios de fase II são geralmente em pequena escala, determinando a eficácia e segurança de uma droga, requerendo monitoramento junto a cada paciente. Os ensaios de fase II servem como um processo de separação, a fim de selecionar as drogas com real potencial terapêutico das inativas ou tóxicas. Os ensaios de fase III envolvem a avaliação em escala completa de tratamento, após uma droga ter mostrado ser inegavelmente eficaz. É essencial a sua comparação com outros eventuais tratamentos. Para alguns pesquisadores, o termo ensaio clínico refere-se especificamente à fase III, que é o mais rigoroso e extenso tipo de investigação clínica científica de um novo tratamento. Após o principal programa de pesquisas, para a droga ser aprovada para comercialização, restam ainda investigações referentes a efeitos adversos e adicionais em larga escala, além de efeitos tardios de morbidade e mortalidade que fazem parte dos ensaios de fase IV (Atkinson *et al.*, 2001).

## **1.2. Medicamentos genéricos.**

No Brasil, a questão dos genéricos começa a tomar fôlego, a partir da Lei 9.787, sancionada pelo presidente da República Fernando Henrique Cardoso, em

10 de fevereiro de 1999, que estabelece o que é medicamento genérico e dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos, sob fiscalização da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Essa legislação foi revista e atualizada com o objetivo de melhor esclarecer as exigências, em relação aos medicamentos genéricos através da RDC 10 de janeiro de 2001. Posteriormente, foi editada a RDC 84, de março de 2002, com o intuito de detalhar as regulamentações já previstas na RDC 10. Esta nova resolução transforma os anexos da RDC 10 em Guias publicados na forma de resoluções (RE), como por exemplo, a RE 478-Guia para provas de bioequivalência de medicamentos Genéricos (Ribeiro, 2000).

O objetivo dessa Legislação é aumentar a oferta de medicamentos, o que resultará numa maior concorrência entre os fabricantes e na diminuição dos gastos da população com os mesmos (ABIFAM, 2001).

O surgimento dos produtos denominados genéricos aparece como uma alternativa aos produtos tradicionais e podem revolucionar as questões inerentes à falta de recursos dos governos para subsidiar a população de baixa renda (ABIFAM, 2001).

Do ponto de vista econômico, fala-se de um bem substituto à altura dos concorrentes, tendo sua intercambialidade garantida pelos estudos de bioequivalência, com preços competitivos e que podem mudar o cenário atual de consumo da população brasileira, principalmente referindo-se aos menos favorecidos (Ribeiro, 2000).

### 1.3. Estudos de bioequivalência.

A Biodisponibilidade refere-se à quantidade de determinada droga encontrada no sangue, após sua absorção no local onde foi administrada. Os valores de concentração no sangue de uma droga administrada por via oral, quando comparados com os valores da mesma droga administrada por via intravenosa, dá-nos o parâmetro conhecido como biodisponibilidade absoluta. Quando a comparação é feita com outra droga, chamada de padrão, administrada pela mesma via, chamamos de biodisponibilidade relativa. Diversos fatores relacionados com a droga em teste – meia-vida, indução enzimática, sinergismo – ou com o paciente – idade, sexo, jejum, uso de outros medicamentos – podem causar importantes alterações na biodisponibilidade (Atkinson *et al.*; 2001, Fink, 1988; FDA, 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993; Goodman & Gilman, 1991; Page *et al.*, 2002).

Dois medicamentos são considerados equivalentes farmacêuticos quando possuem os mesmos ingredientes ativos e são idênticos quanto à formulação e via de administração. Para que possam ser considerados bioequivalentes devem apresentar taxa e extensão de absorção do princípio ativo, bem como excreção, dentro de limites aceitos por estatística adequada. Para tanto, os seguintes parâmetros farmacocinéticos devem ser levados em consideração (ANVISA, 2001; Atkinson *et al.*; 2001, Fink, 1988; FDA, 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993; Goodman & Gilman, 1991; Page *et al.*, 2002):

$C_{max}$  – Pico de concentração da droga no sangue, referindo –se ao valor máximo atingido pela droga após sua administração .

$T_{max}$  – Tempo no qual ocorre o pico de concentração da droga no sangue após sua administração.

AUC – Área sob a curva de concentração numa unidade de tempo. Enquanto  $C_{max}$  e  $T_{max}$  são obtidos apenas montando–se o gráfico das dosagens da droga, a AUC pode ser determinada utilizando-se a regra da soma dos trapézios.

Segundo a resolução da ANVISA, RDC Nº 10, de 2 de janeiro de 2001, que estabelece os critérios para provas de bioequivalência de medicamentos genéricos, estas deverão contemplar três etapas: clínica, analítica e estatística (ANVISA, 2001).

### 1.3.1. Etapa clínica.

Os medicamentos a serem submetidos ao estudo de biodisponibilidade deverão, inicialmente, ser analisados segundo sua monografia inscrita na Farmacopéia Brasileira e, na falta desta, em outros códigos autorizados pela legislação vigente. O estudo de biodisponibilidade é realizado, geralmente, por meio da quantificação do fármaco ou do metabólito ativo na circulação (freqüentemente em plasma ou soro), ou através de sua quantificação na urina, quando justificado (ANVISA, 2001; Fink, 1988; FDA, 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

O estudo de biodisponibilidade é do tipo aberto, aleatório, cruzado. Os voluntários recebem os medicamentos teste e referência (medicamento

administrado por via intravenosa ou, quando não for indicada, uma solução oral do fármaco) em ocasiões separadas (períodos), em esquema de dose simples ou múltipla. O intervalo entre os períodos deve ser de, no mínimo, sete meias-vidas de eliminação do fármaco, ou do metabólito, quando o mesmo for ativo (ANVISA, 2001; Fink, 1988; FDA, 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

O cronograma de coleta das amostras deve contemplar um tempo igual ou superior a 3-5 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco, ou do metabólito, quando o mesmo for ativo e o número mínimo de voluntários sadios deverá ser de 24, com idade entre 18 e 50 anos e capazes de fornecer seu consentimento livre e esclarecido. Os estudos podem ser conduzidos com voluntários do sexo masculino, feminino ou ambos, sendo que neste caso, o número de homens e mulheres deve ser o mesmo. A ANVISA pode exigir um número maior de voluntários para fármacos que apresentem grande variabilidade (ANVISA, 2001).

O peso dos voluntários deve estar em um limite de  $\pm 15\%$  do peso considerado normal, levando-se em consideração a altura e estrutura física. Deve-se evitar indivíduos fumantes e com histórico de abuso de álcool ou drogas. Caso sejam incluídos fumantes, os mesmos devem estar identificados (ANVISA, 2001; Fink, 1988; FDA, 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

O projeto de pesquisa, o protocolo experimental e o termo de consentimento livre e esclarecido devem ser submetidos a um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), credenciado no Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde/MS (ANVISA, 2001).

Os voluntários participantes dos estudos clínicos, que necessitem de confinamento, devem permanecer em local apropriado que atenda às Boas

Práticas de Clínica (BPC), sob a responsabilidade de um médico (ANVISA, 2001; Fink, 1988; FDA, 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

### 1.3.2. Etapa analítica.

Todas as etapas do estudo devem ser realizadas de acordo com as normas internacionais de Boas Práticas de Laboratório (BPL) e os métodos analíticos devem ser validados. O protocolo analítico deve conter os critérios para reanálise das amostras. Não mais do que 20% das amostras podem ser reanalisadas e a perda de amostras em qualquer etapa do processo analítico deve ser justificada (Causon, 1997).

A análise das amostras pode ser efetuada nas seguintes condições: sem réplica, em duplicata ou triplicata. Para análise de amostras em duplicata, deve-se utilizar o valor médio, e para triplicata, a média dos dois valores mais próximos (ANVISA, 2001).

A determinação da adequabilidade e confiabilidade de um método analítico para a realização de um estudo de bioequivalência, é realizada através da averiguação de sua sensibilidade, especificidade, linearidade, exatidão, precisão e reprodutibilidade, levando-se ainda em conta a estabilidade dos compostos que estejam sendo empregados (ANVISA, 2001; Fink, 1988; FDA, 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

A Tabela 1 apresenta os parâmetros utilizados para a validação do método desenvolvido (Chasin *et al.*, 1994).

**Tabela 1.** Parâmetros utilizados na validação do método.

<b>Parâmetro</b>	<b>DEFINIÇÃO</b>	<b>Unidade</b>
<b>Recuperação</b>	Eficiência do processo de extração.	%
<b>Linearidade</b>	Faixa de concentração plasmática com relação linear entre concentração e resposta.	ng/mL ou µg/mL
<b>Repetibilidade</b>	Precisão intra-ensaio: variação dos resultados em análises realizadas no mesmo dia. Precisão interensaios: variação dos resultados em análises realizadas em dias consecutivos.	CV %
<b>Exatidão</b>	Avalia a variação entre o valor real e o valor obtido experimentalmente.	%
<b>LQ</b>	Limite de quantificação: menor concentração do fármaco quantificado com erro inferior a 20 %.	ng/mL ou µg/mL
<b>Seletividade</b>	Interferentes endógenos.	min

\*C.V.= coeficiente de variação.

### 1.3.3. Etapa estatística.

Os parâmetros farmacocinéticos são obtidos das curvas de concentração sanguínea do fármaco versus tempo e analisados, estatisticamente, para determinação da biodisponibilidade. Os seguintes parâmetros farmacocinéticos devem ser determinados (ANVISA, 2001; Fink, 1988; FDA, 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993):

-Área sob a curva de concentração sanguínea versus tempo, calculada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao tempo  $t$  ( $ASC_{0-t}$ ), onde  $t$  é o tempo relativo à última concentração determinada experimentalmente.

-Área sob a curva de concentração sanguínea versus tempo, calculada do tempo zero ao tempo infinito ( $ASC_{0-inf}$ ), onde  $ASC_{0-inf} = ASC_{0-t} + C_t/l_z$ , onde  $C_t$  é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente e  $l_z$  é a constante de eliminação da fase terminal. A  $ASC_{0-t}$  deve ser igual ou superior a 80% da  $ASC_{0-inf}$ .

-O pico de concentração máxima ( $C_{max}$ ) do fármaco e/ou metabólito e o tempo para atingir este pico ( $T_{max}$ ) devem ser obtidos diretamente sem interpolação dos dados.

-A depuração ( $D$ ), o volume aparente de distribuição ( $V_d$ ) e a meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) do fármaco e/ou metabólito também devem ser determinados, embora não haja necessidade de tratamento estatístico.

-A biodisponibilidade absoluta ( $F$ ) do medicamento deve ser determinada e corresponde à fração da dose administrada do fármaco efetivamente absorvida.

## **1.4. Medicamentos analisados.**

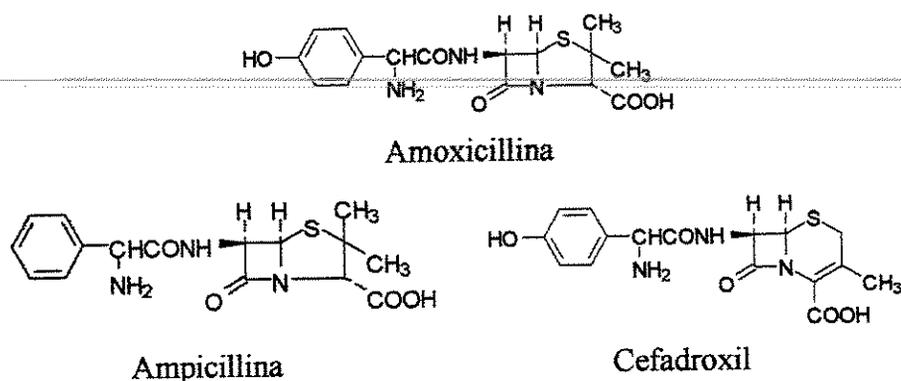
### **1.4.1. Amoxicilina.**

A penicilina é o protótipo dos antibióticos betalactâmicos. É o agente antimicrobiano de escolha para o tratamento e profilaxia de várias enfermidades infecciosas. A sensibilidade de um microorganismo aos antibióticos betalactâmicos

depende de sua capacidade de penetrar na parede bacteriana e ligar-se em sua forma ativa ao local visado. O mecanismo de ação destes antibióticos ainda não é totalmente conhecido, mas acredita-se que eles são capazes de interferir na síntese da parede bacteriana dos organismos em atividade (Tomasz, 1979a; Tomasz, 1979b).

Após penetrar na bactéria, o antibiótico betalactâmico inativa transpeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases, interferindo na síntese da parede celular (Blumberg & Strominger, 1974; Waxman & Strominger, 1983). A amoxicilina (alfa-amino-p-hidroxibenzilpenicilina) é uma penicilina semi-sintética estruturalmente relacionada com a ampicilina que apresenta atividade oral, sendo que seu espectro de atividade é semelhante ao da ampicilina (Figura 7). Seu núcleo consiste de um anel tiazolidinico, ligado a um anel  $\beta$ -Lactâmico com uma cadeia lateral. Esta cadeia lateral determina a maior parte da atividade farmacológica e antimicrobiana da penicilina em questão. No caso da amoxicilina, a presença de um anel benzil na cadeia lateral estende sua atividade antimicrobiana a bactérias gram-negativas. Pode ser utilizada por via oral e parenteral (sal sódico- $C_{16}H_{18}N_3NaO_5S$ ) (Gordon *et al.*, 1972; Gordon & Winshell, 1970; Neu & Winshell, 1970; Sutherland & Rolinson, 1970). A amoxicilina apresenta elevada absorção após administração oral, sendo que esta não é alterada pela ingestão concomitante a alimentos. Mostra baixa ligação com proteínas plasmáticas (17%) e é rapidamente distribuída pelo corpo, exibindo uma meia vida de eliminação de 1h. A eliminação da droga se dá preferencialmente pelos rins, com cerca de 60% da dose administrada por via oral e 75% da parenteral

sendo excretadas inalteradas (Barr *et al.*, 1994; Gordon *et al.*, 1972; Gordon & Winshell, 1970; Handsfield *et al.*, 1973; Kosmidis *et al.*, 1972; Neu & Winshell, 1970; Neu, 1974; Paintaud *et al.*, 1992; Simon & Stile, 1985).



**Figura 7.** Estruturas da amoxicilina, ampicilina e cefadroxil.

As concentrações plasmáticas máximas de amoxicilina são duas a duas vezes e meia maiores que as da ampicilina após administração oral da mesma dose. Essas concentrações são obtidas em duas horas e atingem, em média cerca de 4µg/mL quando se administram 250 mg. Apesar da meia-vida semelhante da amoxicilina e da ampicilina, as concentrações plasmáticas eficazes da amoxicilina administrada por via oral são detectáveis por um período duas vezes maior do que quando se administrada a ampicilina, por causa da absorção mais completa (Goodman & Gilman, 1991).

O espectro antimicrobiano da amoxicilina é essencialmente idêntico ao da ampicilina, com importante exceção de que a amoxicilina parece ser menos eficaz do que a ampicilina no tratamento da siguelose (Neu, 1979).

A ampicilina e as aminopenicilinas correlatas são bactericidas para bactérias gram-positivas e gram-negativas. São um pouco menos ativas do que a penicilina G contra cocos gram-positivos sensíveis à última droga. Os meningococos, pneumococos e *List. Monocytogenes* são sensíveis à droga. Em geral, *Haemophilus influenzae* e o grupo viridans de estreptococos são inibidos por concentrações muito baixas de ampicilina. Todavia em crianças com meningite foram recuperadas cepas de *H. influenzae* do tipo B altamente resistentes à ampicilina. Estima-se que 25 a 30% dos casos de meningite por *H. influenzae* sejam causados por cepas resistentes à ampicilina. Os enterococcus são cerca de duas vezes mais sensíveis à ampicilina numa base ponderal do que à penicilina G (a concentração inibidora mínima para ampicilina é, em média, de 1,5 µg/mL). Embora a maioria das cepas de *E. coli*, *Pr. Mirabilis*, *Salmonella* e *Shigella* tenham se mostrado altamente suscetível quando a ampicilina foi utilizada pela primeira vez no início da década de 60, uma percentagem crescente dessas espécies tornou-se resistente. No momento atual, cerca de 30 a 50% de *E. coli*, uma porcentagem significativa de *Pr. Mirabilis* e praticamente todas as cepas de *Enterobacter* são insensíveis. Em várias partes do mundo foram recuperadas cepas resistentes de *Salmonella* (mediadas por plasmídios) com frequência cada vez maior. Na atualidade, a maioria das cepas de *Shigella* é resistente. A maior parte das cepas de *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Acinetobacter* e *Proteus*

indol-positivo também se mostra resistente a esse grupo de penicilinas, que são menos ativas contra *B.fragilis* do que a penicilina G. Todavia, a administração concomitante de um inibidor da beta-lactamase, como clavulanato ou sulbactama, amplia acentuadamente o espectro de atividade dessas drogas (Goodman & Gilman, 1991).

A ampicilina e a amoxicilina são ativas contra *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e a maioria das cepas de *H. influenzae*, que constituem os principais patógenos bacterianos das vias respiratórias superiores. Tais drogas proporcionam um tratamento eficaz contra a sinusite, a otite média, as exacerbações agudas da bronquite crônica e a epiglote. Em algumas áreas, o *H. influenzae* resistente à ampicilina pode constituir um problema (Goodman & Gilman, 1991).

Sem dúvida alguma, as reações de hipersensibilidade constituem os efeitos adversos mais comuns das penicilinas, de modo que esses antibióticos representam provavelmente as causas mais comuns de alergia medicamentosa. Não há provas convincentes de que uma dada penicilina seja diferente do grupo, na sua potencialidade de produzir verdadeiras reações alérgicas. Por ordem aproximada de frequência decrescente, as manifestações de alergia às penicilinas incluem exantemas maculopapular, exantema urticariforme, febre, broncoespasmos, vasculite, doença do soro, dermatite esfoliativa, Síndrome de Stevens-Johnson e anafilaxia. A incidência global dessas reações às penicilinas varia de 0,7 a 10% em diferentes estudos (Idspøe *et al.*, 1968).

Podem ocorrer reações de hipersensibilidade com qualquer forma posológica de penicilina. A alergia a determinada penicilina expõe o paciente a maior risco de reações se for administrada outra penicilina. Por outro lado, a ocorrência de um efeito adverso não significa necessariamente a sua nova ocorrência, com exposições subseqüentes à droga. As reações de hipersensibilidade podem aparecer na ausência de exposição anterior conhecida à droga. Esse processo pode dever-se a uma exposição previa não reconhecida à penicilinas no ambiente (por exemplo, em alimentos de origem animal ou fungo produtor de penicilina). Apesar da suspensão do antibiótico produzir geralmente o rápido desaparecimento das manifestações alérgicas, elas podem persistir por uma ou duas semanas ou mais após a retirada do tratamento (Goodman & Gilman, 1991).

As penicilinas e seus produtos de degradação atuam como haptenos após reação covalente com proteínas. O intermediário antigênico mais importante da penicilina parece ser o componente peniciloil, que é formado quando se abre o anel beta-lactâmico (Goodman & Gilman, 1991).

É possível detectar anticorpos anti-penicilina em praticamente todos os pacientes que receberam a droga e em muitos que, pelo que consta, nunca foram expostos a ela (Klaus & Fellner, 1973).

As penicilinas possuem toxicidade direta mínima. Os efeitos tóxicos aparentes que foram relatados incluem depressão da medula óssea, granulocitopenia e hepatite. Independente da via de administração da droga, porém tipicamente quando é administrada por via oral, a penicilina modifica a composição da microflora ao eliminar os microrganismos sensíveis. Em geral, este

fenômeno não tem importância clínica, e verifica-se o restabelecimento da microflora normal pouco depois da suspensão da terapia. Todavia, em alguns indivíduos, as alterações da flora resultam em superinfecção. A administração oral ou, com menos frequência, o uso parenteral de penicilinas tem sido acompanhados de colite pseudomembranosa, relacionada ao crescimento excessivo e à produção de uma toxina pelo *Clostridium difficile* (Goodman & Gilman, 1991).

Reações alérgicas típicas como urticária e rash cutâneo também podem ocorrer, na mesma proporção em que ocorrem nestes fármacos. Exantemas podem ainda ser observados após administração prolongada. Podem revelar reação cruzada com outras penicilinas (Simon & Stille, 1985).

A amoxicilina é atualmente o antibiótico mais utilizado a nível mundial. Para a determinação dos parâmetros farmacocinético da amoxicilina em humanos é necessário utilizar um método quantitativo confiável.

Os métodos mais utilizados para a quantificação da amoxicilina em fluidos biológicos empregam a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sendo que na maior parte destes métodos é aplicada detecção no UV em baixos comprimentos de onda,  $\lambda=225-330$  nm (Muth *et al.*, 1996; Hoizey *et al.*, 2002; Sourgens *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 1995; Krauwinkel *et al.*, 1993; Charles & Chulavatnatol, 1993). O LQ mais baixo obtido por essas metodologias foi 50ng/ml. Contudo, os tempos de eluição da amoxicilina e do padrão interno, cefadroxil, foram 31.8 e 32.8 min, respectivamente, o que dificulta sua aplicação na análise de rotina (Muth *et al.*, 1996). A formação de um derivado para detecção por

por fluorimetria (Marscher & Kikuta, 1990; Wibawa *et al.*, 2002; Miyazaki *et al.*, 1983), reagentes de formação de par-iônico e técnicas especiais de detecção como derivação pós-coluna ou acoplamento de colunas (Muth *et al.*, 1996; Marscher & Kikuta, 1990; Carlqvist & Westerlund, 1985) também tem sido empregadas para aumentar a sensibilidade e a seletividade, porém são procedimentos caros, trabalhosos e que consomem muito tempo.

Diferentes métodos de extração da amostra tem sido aplicados antes da análise cromatográfica, sendo que a maioria é baseada na precipitação de proteínas (Hoizey *et al.*, 2002; Charles & Chulavatnatol, 1993; Marscher & Kikuta, 1990), extração líquido-líquido (Wibawa *et al.*, 2002) ou procedimentos mais complicados como a extração em fase sólida (Yuan *et al.*, 1995; Krauwinkel *et al.*, 1993; Maurer, 1998; Henion *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2001). Dentre estas abordagens a extração por precipitação foi selecionada por ser a mais simples, rápida e barata.

Assim sendo, tornou-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia adequada para a realização de um estudo de bioequivalência, adaptada para as condições encontradas em nosso laboratório.

#### 1.4.2. Azitromicina.

A azitromicina é o primeiro de uma nova classe de antibióticos, os azalídeos, que se originaram dos macrolídeos. Foi sintetizada a partir da eritromicina sendo acrescentado um átomo de nitrogênio ao anel lactâmico. Esta alteração aumentou a sua biodisponibilidade nos tecidos e a sua difusão e, com isto, a azitromicina



demonstram que ela pode atuar também através da diminuição da adesão da bactéria nas mucosas (Barr, *et al.*, 1994; DEF, 1999; PDR, 1999).

A azitromicina demonstra atividade “*in vitro*” contra uma grande variedade de bactérias, incluindo:

-Bactérias aeróbias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos beta-hemolíticos do grupo A), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium diphtheriae*. A azitromicina demonstra resistência cruzada contra cepas Gram positivas resistentes à eritromicina, incluindo *Streptococcus faecalis* (enterococo) e a maioria das cepas de estafilococos meticilino-resistentes (Lopez, 1997; Michetti, 1995; P. R. Vade Mécum, 1999; Soriano, 1995).

A produção da beta-lactamase não tem efeito na atividade da azitromicina.

-Bactérias aeróbias Gram negativas: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Acinetobacter sp.*, *Yersinia sp.*, *Shigella sp.*, *Pasteurella sp.*, *Vibrio cholerae* e *parahaemolyticus*, *Chlamidia trachomatis*, *Pleisiomans shiguelloides* (Goodman & Gilman, 1991).

-Outros microrganismos: *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium avium* e *intracellulare*.

A azitromicina demonstra “*in vitro*” uma concentração inibitória mínima (CIM) de 2.0 mcg/ml ou menos, contra a maioria das cepas das bactérias citadas a seguir. Contudo, a segurança e a eficácia da azitromicina ainda não foram estabelecidas (DEF, 1999; Lopez, 1997; P. R. Vade Mécum, 1999; Michetti, 1995; Soriano, 1995; Torano & Guchelaar, 1998; Verhoest, 1997).

-Bactérias aeróbias Gram positivas: *Streptococcus* (Grupos C, F, G); grupo *Streptococcus viridans*.

-Bactérias aeróbias Gram negativas: *Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus ducreyi*, *Legionella pneumophila*.

-Bactérias anaeróbias: *Bacteróides bivivus*, *Clostridium perfringens*, *Peptostreptococcus sp.*

-Outros microrganismos: *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*.

Em estudos animais com doses altas, após administração da droga com concentração 40 vezes maior do que a usada na prática clínica, observou-se que a azitromicina causa fosfolipidose reversível, geralmente sem consequências toxicológicas visíveis. Não há evidências de que isto seja relevante para uso normal da azitromicina em humanos (Michetti, 1995; Soriano, 1995; Verhoest, 1997).

Após a administração oral em humanos, a azitromicina é amplamente distribuída pelo organismo. Apresenta maior absorção em pH maior ou igual a 7.4, isto é, no intestino delgado, a sua biodisponibilidade é de aproximadamente 37%. O tempo necessário para alcançar os picos de concentrações plasmáticas é de 2-3 horas. A meia-vida plasmática terminal reflete bem a meia-vida de depleção tecidual, sendo de 2 a 4 dias. Não foi observada qualquer diminuição significativa na biodisponibilidade quando comprimidos revestidos de azitromicina foram administrados concomitantemente a uma refeição rica em gorduras, podendo ser administrado a qualquer hora do dia, inclusive com as refeições. Os estudos têm

demonstrado níveis acentuadamente maiores de azitromicina nos tecidos, que no plasma (até 50 vezes a concentração máxima observada no plasma), indicando que a droga é fortemente ligada aos tecidos. As concentrações nos tecidos alvos: os pulmões, amígdalas e próstata, excedem a CIM 90 para a maioria dos patógenos, após dose única de 500 mg. Aproximadamente 12% da dose administrada intravenosamente é excretada na urina em até 3 dias como droga inalterada, sendo a maioria nas primeiras 24 horas. Altíssimas concentrações da droga inalterada têm sido encontradas na bile humana, acompanhadas por 10 diferentes metabólitos. Comparações das análises microbiológicas e HPLC, nos tecidos sugerem que os metabólitos não participam da atividade microbiológica da azitromicina. Em estudos animais têm sido observadas altas concentrações de azitromicina nos fagócitos. Em modelos experimentais, maiores concentrações de azitromicina são liberadas durante a fagocitose ativa do que pelos fagócitos não estimulados. Isto resulta em altas concentrações de azitromicina liberadas para os locais de infecção (Michetti, 1995; P. R. Vade Mécum, 1999; Soriano, 1995; Torano & Guchelaar, 1998; Verhoest, 1997; Fouda & Schneider, 1995).

Os efeitos terapêuticos ocorrem quando os níveis plasmáticos atingem uma concentração acima da concentração inibitória mínima (CIM) do organismo infectante. Para a azitromicina o valor da CIM, geralmente, está acima de 90 para a maioria dos patógenos, após dose única de 500 mg (Guyton, 1973).

Raramente são relatadas reações alérgicas sérias, incluindo angioedema e anafilaxia. Algumas destas reações observadas com o uso da azitromicina resultaram em sintomas recorrentes e necessitaram de um maior período de observação no tratamento. O tratamento com agentes antibacterianos altera a

flora normal do intestino e pode permitir o crescimento de *Clostridium sp.* levando a colite pseudo-membranosa. Em casos leves, há uma boa resposta com a suspensão do fármaco; em casos mais graves considerar a internação com tratamento de suporte mais antibioticoterapia específica (Goodman & Gilman, 1991; Fink, 1988).

A administração oral de azitromicina é geralmente bem tolerada, apresentando baixa incidência de reações adversas, sendo a maioria dos efeitos observados de natureza leve a moderada. Cerca de 0,7% dos pacientes descontinuou o tratamento devido às reações adversas. A maioria destas foi de origem gastrointestinal: diarreia, fezes amolecidas, desconforto abdominal (dor/cólica), náuseas, vômitos e flatulência. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis. Em doses maiores e com utilização por períodos mais prolongados, observou-se diminuição auditiva reversível foi observada em alguns pacientes. Elevações reversíveis nas transaminases hepáticas são observadas ocasionalmente, enquanto que icterícia colestática aparece raramente. Episódios transitórios de leve redução nas contagens de neutrófilos ocorrem ocasionalmente, embora uma relação causal com azitromicina ainda não tenha sido estabelecida. Reações alérgicas com rash cutâneo, fotossensibilidade têm ocorrido (DEF, 1999; Goodman & Gilman, 1991; P. R. Vade Mécum, 1999; Lopez, 1997; PDR, 1999; Verhoest, 1997).

A correção da dose da azitromicina torna-se necessária somente naqueles com depuração de creatinina < ou igual a 40 ml/min. Em graus leves e moderados

de insuficiência renal não se faz necessária tal correção (Goodman & Gilman, 1991).

Sua posologia deve ser avaliada somente em pacientes com insuficiência hepática grave. Estudos preliminares não evidenciaram teratogenicidade. Mas por ser um produto novo, o seu uso não é aconselhado durante o período de gravidez. Não existe nenhuma restrição para o uso do medicamento neste período, desde que tenha a função hepato-renal preservada (DEF, 1999; Vade Mécum, 1999; PDR, 1999).

Foi realizado um estudo prospectivo, por 1 ano, de pacientes que procuraram um serviço hospitalar e tiveram diagnóstico clínico e radiológico de pneumonia adquirida na comunidade. No total, foram estudados 60 pacientes ambulatoriais e 119 pacientes internados. As doenças de base mais freqüentes foram: DPOC (20,7 %), diabetes (7,3 %) e câncer (3,4 %). O agente mais comum nos pacientes ambulatoriais foi o *Mycoplasma pneumoniae* (32,8 %), enquanto nos pacientes que necessitaram internação foi a *Legionella pneumophila* (11,7 %). Em termos de tratamento, os autores utilizaram e recomendam um macrolídeo tal como a Azitromicina, por sua eficácia, facilidade de administração e baixo custo (Michetti, 1995).

Em um estudo microbiológico, a susceptibilidade de 265 cepas de *Corynebacterium sp.* e outros bacilos Gram-positivos não formadores de esporos foi testada em relação a 18 agentes antimicrobianos. A maioria dos agentes foi susceptível à vancomicina, doxiciclina e ácido fusídico; em relação à Azitromicina, somente as espécies *Corynebacterium xerosis* e *minutissimum* tiveram, habitualmente, resistência. A fosfomicina e a nitrofurantoína apresentaram altos

níveis de resistência. Os autores concluíram que a susceptibilidade destas espécies aos antimicrobianos é muito variável e os testes são necessários, a nível individual, para definir a melhor terapêutica a ser realizada (Soriano, 1995).

Para a determinação dos parâmetros farmacocinético da azitromicina em humanos é necessário utilizar um método quantitativo confiável.

Vários métodos de detecção foram utilizados em conjunto com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para a quantificação da azitromicina em fluídos biológicos, com o intuito de superar a limitação imposta pela baixa absorvância desse tipo de composto na região do ultravioleta (Fouda & Schneider, 1995). Métodos bastante sensíveis utilizando a detecção por fluorescência estão descritos na literatura, porém tais métodos necessitam de derivação antes de detecção (Kees *et al.*, 1988). Sheppard utilizou métodos eletroquímicos para a detecção de azitromicina em tecido humano e animal. Desde então o método eletroquímico tornou-se padrão para a caracterização farmacocinética da azitromicina em humanos. Porém, os tempos de eluição da azitromicina e do padrão interno eram muito longos. Além disso, o detector somente recupera a sensibilidade após a limpeza da cela e algumas vezes somente após um longo período de pausa. Um outro problema é que a deterioração dos eletrodos pode ser observada após um dia de trabalho (Marzo & Dal Bo, 1998). Estas limitações desencorajam o uso dessas metodologias em estudos que requerem a análise de um grande número de amostras. Um estudo utilizando uma coluna C<sub>18</sub> e detecção por espectrometria de massas utilizando o método de ionização química a pressão atmosférica (APCI) também foi descrito. O estudo apresentou resultados exatos e precisos na faixa de concentrações de 10 a

250 ng/ml, sendo apropriado somente para estudos de farmacocinética realizado em crianças (Fouda & Schneider, 1995).

Assim sendo, tornou-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia adequada para a realização de um estudo de bioequivalência, adaptada para as condições encontradas em nosso laboratório.

---

### **1.5. Métodos de quantificação de fármacos.**

Entre os modernos métodos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade de efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesmas ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (Atkinson *et al.*, 2001).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases de modo que cada um dos componentes seja seletivamente retido pela fase estacionária, resultando nas migrações diferenciais destes componentes (Quattrocchi, *et al.*, 1992).

Os termos "cromatografia", "cromatograma" e "método cromatográfico" são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, que, em 1906, utilizou

estes termos em dois trabalhos descrevendo suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas e gema de ovo, onde usou colunas de vidro recheadas com vários sólidos, finamente divididos, e arrastou os componentes com éter de petróleo (Collins *et al.*, 1995).

O nome deriva-se das palavras gregas "chrom" (cor) e "graphe" (escrever), embora o processo não dependa da cor, exceto, para facilitar a identificação dos compostos separados.

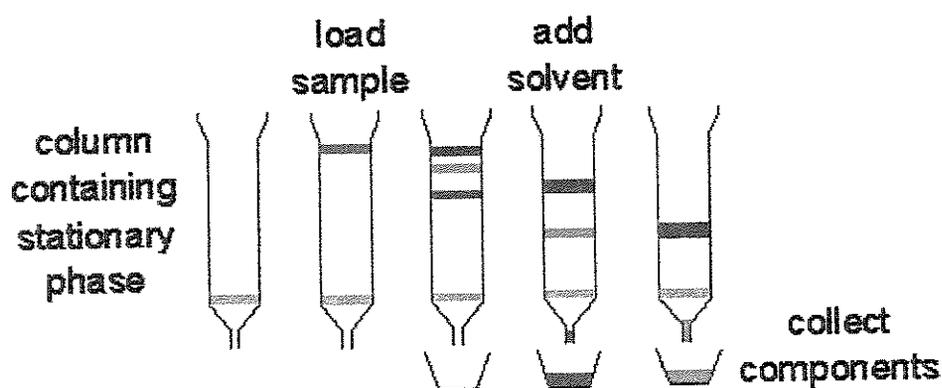


Figura 9. Cromatografia em coluna clássica.

Todavia, nesta época, os processos aplicando a migração diferencial, já eram bastante conhecidos. Paralelo aos desenvolvimentos de Tsewett, Reed, na Inglaterra, e Day, nos Estados Unidos, aplicaram colunas contendo sólidos para a separação de sais orgânicos e amostras de petróleo, respectivamente. Bem antes destes, Runge descreveu os "desenhos" feitos por misturas de sais e por tintas, que foram colocadas no centro de um papel de filtro e depois espalhadas pela passagem de um solvente; enquanto Schoenbein fez experiências similares com tiras de papel mergulhadas em solventes. O uso de sólidos em camada delgada sobre vidro, no lugar de papel, para o desenvolvimento circular de misturas de sais

inorgânicos foi experimentado por Beyerinck em 1889 (Bonato, 1995; Quattrocchi, *et al.*, 1992).

Apesar dessas experiências, considerou-se que a época moderna da cromatografia começou na década de 30, quando Kuhn e Lederer "redescobriram" e aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, repetindo as experiências de Tswett, separando e identificando as xantofilas da gema de ovo, usando uma coluna recheada de carbonato de cálcio pulverizado e éter de petróleo como fase móvel (Collins *et al.*, 1995).

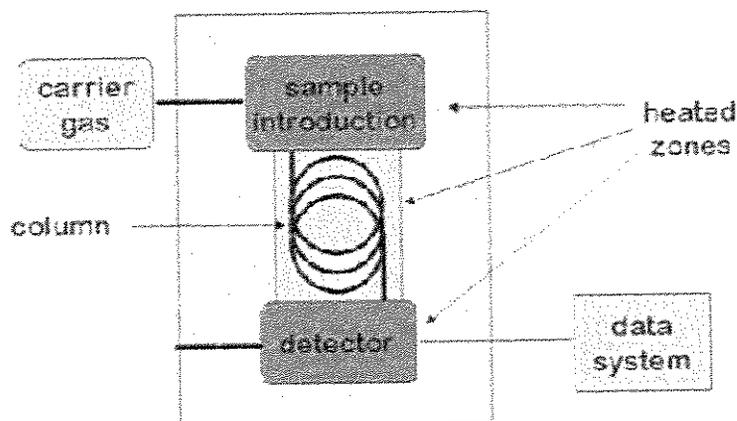
Em 1941 Martin e Synge publicaram um trabalho no qual descreveram a cromatografia por partição (cromatografia líquido-líquido), aplicando o conceito de altura equivalente a um prato teórico à cromatografia e antecipando o surgimento de duas cromatografias: a gasosa e a líquida de alta eficiência. Por este trabalho receberam o Prêmio Nobel em 1952. Martin também participou de outros desenvolvimentos importantes na história da cromatografia: com Consden e Gordon, reintroduzindo a cromatografia em papel; com Howard, desenvolvendo a cromatografia líquida através das chamadas "fases reversas"; e com James, atualizando a cromatografia gás-líquido (Bonato, 1995).

A cromatografia gás-sólido foi descrita pela primeira vez em 1941, por Hesse e col., que separam dois ácidos graxos, no vapor, a 100 °C, arrastando-os sobre sílica com o gás dióxido de carbono, enquanto Cremer e Prior foram os primeiros a descreverem um cromatógrafo a gás completo (Bonato, 1995; Quattrocchi, *et al.*, 1992).

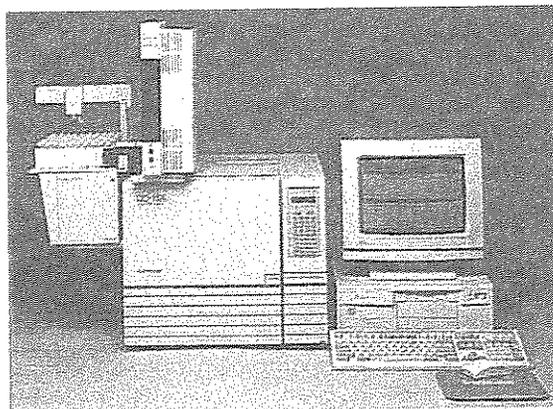
O desenvolvimento, quase simultâneo, do detector por ionização em chama por Pretorius e cols. e por Mc Williams e Dewar, ampliou a sensibilidade do método

cromatográfico, enquanto que a introdução de colunas capilares por Golay ampliou os seus poderes analíticos, ao ponto de tornar a cromatografia gasosa o método analítico de separação e determinação mais usado no mundo.

A cromatografia gasosa apresenta grande eficiência, devido à possibilidade de utilização de colunas com dezenas de metros, e é bastante sensível quando se emprega injeções no modo splitless e detectores seletivos; porém esta técnica fica restrita a compostos voláteis. Compostos não voláteis necessitam de derivação para obtenção de compostos mais voláteis (Bonato, 1995; Quattrocchi, *et al.*, 1992).



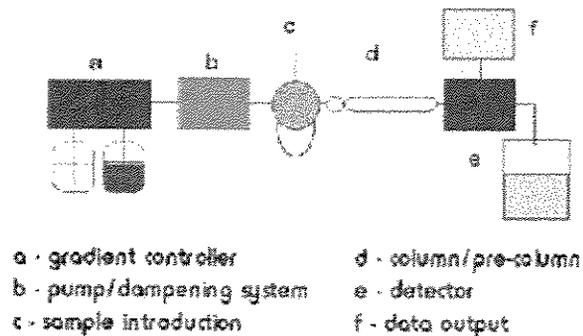
**Figura 10.** Representação esquemática do cromatógrafo a gás.



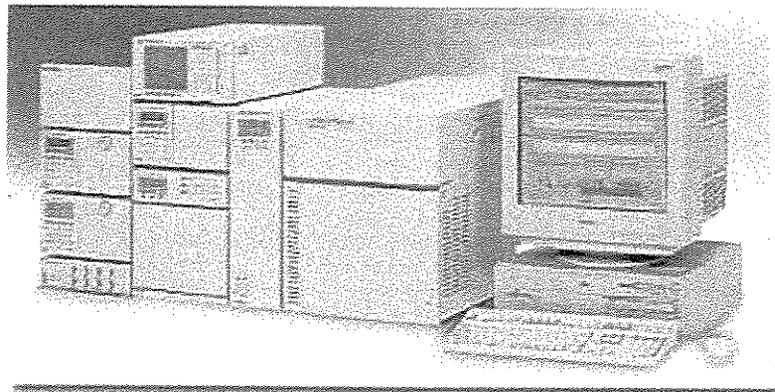
**Figura 11.** Fotografia do cromatógrafo a gás.

Em 1959, este sistema para análise de aminoácidos foi modificado por Hamilton e Andrews, com a introdução de uma bomba tipo pistão, similar às usadas ainda hoje em cromatografia líquida de alta eficiência (Collins *et al.*, 1995).

Outros desenvolvimentos na década de 60, por Karr e cols., Jentoft e Gouw, Huber e Hulsman, Snyder, Kirkland e outros aperfeiçoaram o sistema de bombeamento e detecção de cromatografia líquida de alta eficiência, comprovando que o uso desses equipamentos, operando com fase móvel líquida sob pressão e com métodos de detecção sensíveis possibilita análises de rapidez comparável às de cromatografia gasosa, com resultados altamente satisfatórios (Collins *et al.*, 1995; Quattrocchi, *et al.*, 1992).



**Figura 12.** Representação esquemática do cromatógrafo a líquido.



**Figura 13.** Fotografia do cromatógrafo a líquido.

Paralelamente, os recheios das colunas usadas na cromatografia líquida de alta eficiência foram sendo desenvolvidos. Inicialmente os peliculares (partículas superficialmente porosas) por Halasz e por Horvath, e posteriormente as partículas completamente porosas, de diâmetro pequeno, por Kirkland e outros. O desenvolvimento por Nickless e cols., de fases estacionárias contendo grupos alquilas quimicamente ligados ao suporte permitiu a aplicação da chamada "fase reversa" (fase estacionária apolar), ampliando as aplicações dessa técnica; enquanto a introdução de colunas de diâmetro interno menores (as "microbores" e as "capilares recheadas") por Scott e por Novotny viabilizaram o uso de cromatografia líquida de alta eficiência para qualquer tipo de análise quer orgânica quer inorgânica (Henion *et al.*, 1998).

Outra técnica cromatográfica, que deve seu crescimento ao desenvolvimento das fases com grupos alquilas quimicamente ligadas, é a cromatografia usando um fluido supercrítico como fase móvel. Esta técnica, que foi aplicada com sucesso por Klesper e cols., em 1962, quando se usou um cromatógrafo a gás modificado, recebeu várias outras alterações por Gouw e Jentoft no decorrer dos anos seguintes. Somente em 1983 é que foi lançado o primeiro aparelho comercial dedicado a essa técnica (Collins *et al.*, 1995).

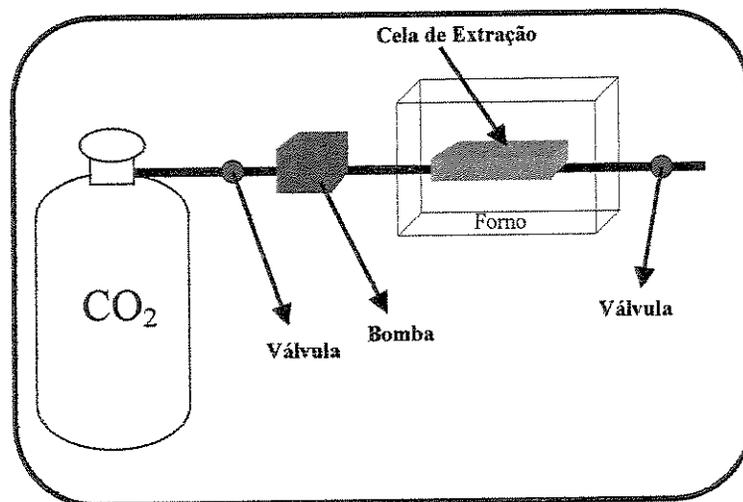


Figura 14. Representação esquemática do cromatógrafo a fluido supercrítico.

A quantificação de concentrações de fármacos ativos em matrizes biológicas pode ser realizada através de diversas metodologias, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência ou absorção no ultravioleta, a mais freqüentemente utilizada na atualidade. No entanto, outras metodologias como a utilização da cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS-MS) tem aumentado progressivamente, inclusive no Brasil. Fatores implicados nesse aumento são a alta sensibilidade, precisão, exatidão e rapidez do método (Maurer, 1998; Loo, 1998).

#### 1.5.1. Espectrometria de massas: (LC-MS-MS).

Em espectrometria de massas existem diversas interfaces de ionização conhecidas: impacto de elétrons (EI), bombardeamento rápido de átomos (FAB), desorção em matrizes assistidas por laser (MALDI), ionização química (CI) e a pressão atmosférica (API), sendo esta última subdivida em electrospray (ESI) e por ionização química (APCI). Para a detecção ou quantificação adequadas de uma substância ou íon através de espectrometria de massa, alguns parâmetros devem ser avaliados. Dentre estes parâmetros, a ionização e a eficiência da fragmentação são os mais importantes. Além disso, a abundância de molécula protonada pode ser influenciada pela formação de cargas múltiplas ( $z \neq 1$ ), pois o sinal do analito é dividido em vários valores de massa. A técnica de espectrometria de massas mais utilizada na análise de fármacos é a que utiliza electrospray, podendo ser utilizado de modo positivo (ES+) ou negativo (ES-). Para tal, promove-se a adição ou abstração de um próton ao composto. Assim,

após a separação pela cromatografia líquida de alta eficiência, a amostra a ser analisada é introduzida no espectrômetro de massas. A passagem da fase líquida para gasosa (dessolvatação) é realizada com auxílio do gás nitrogênio, formando-se um "spray" eletrolítico. O capilar por onde passa a amostra encontra-se carregado eletricamente daí a origem do nome electrospray. O composto assim vaporizado é captado pelo cone do espectrômetro e é introduzido na câmara de vácuo (Atkinson, *et al.*, 2001; Loo, 1998).

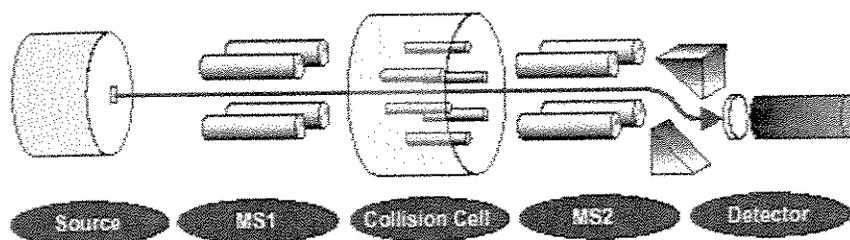
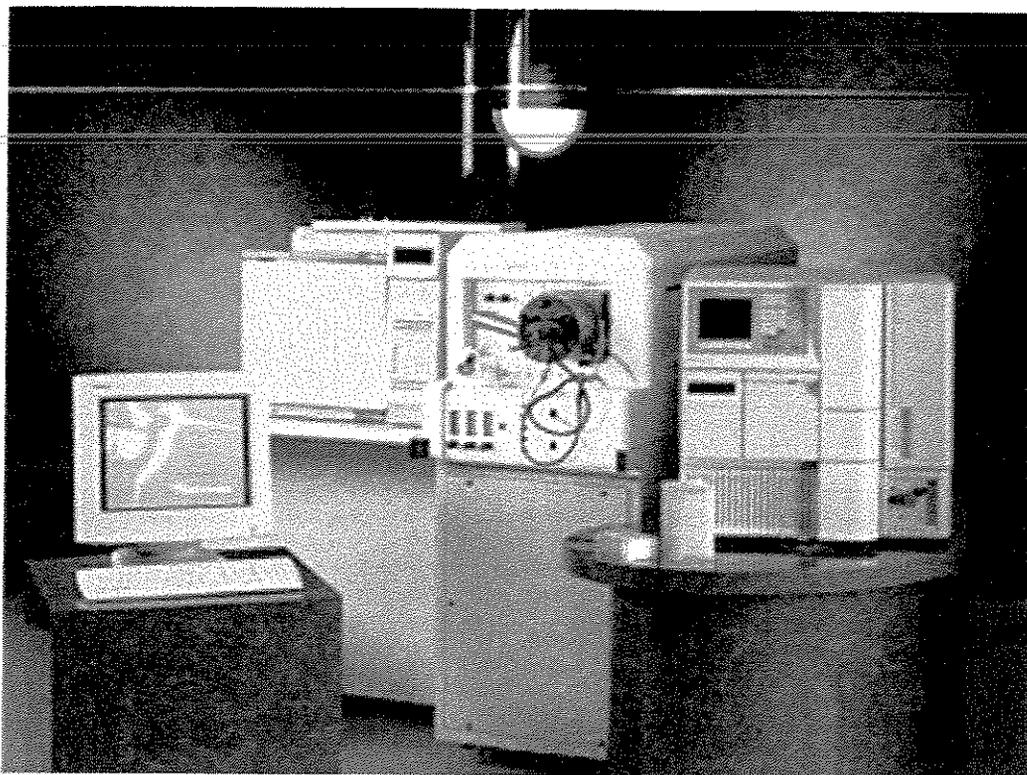


Figura 15. Representação esquemática do espectrômetro de massas.

Após a passagem pelo cone, o analito penetra em uma série de compartimentos dispostos em fileira única (tandem) para a quantificação e seleção dos íons. O primeiro compartimento é onde acontece a seleção dos íons precursores-compartimento Q1 (pressão de  $10^{-5}$  mBar). Um segundo compartimento (Q2) apresenta pressão de  $10^{-3}$  mBar e é onde a fragmentação ocorre pela colisão dos íons precursores com moléculas do gás de colisão (geralmente Argônio). A partir daí, os íons produto penetram em outro compartimento onde são novamente selecionados e finalmente o íon que sai deste último compartimento é detectado por uma célula fotomultiplicadora. O número de contagens por segundo é registrado na forma de um gráfico (cromatograma) e a

área sob essa curva é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, e é assim que acontece o processo de quantificação (Verhoest,1997; Waxman & Strominger, 1983).



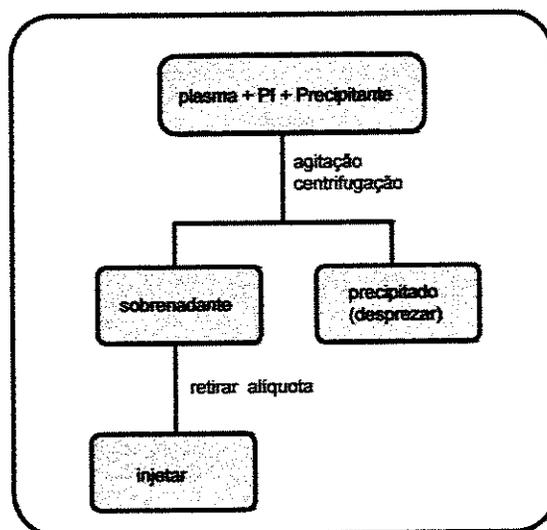
**Figura 16.** Fotografia do espectrômetro de massas.

## **1.6. Procedimentos de extração da amostra.**

Uma vez estabelecidas as condições para a separação cromatográfica dos compostos, a etapa seguinte constará da avaliação dos procedimentos de preparação da amostra visando a recuperação máxima do analito e minimizando a extração de interferentes do plasma (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1994; Maurer, 1998; Klink, 2000).

### 1.6.1. Extração por precipitação de proteínas.

A extração por precipitação de proteínas é bastante utilizada para extração de fármacos de matrizes complexas. Este é o tipo de extração mais simples, uma vez que apresenta apenas um passo principal. Basicamente um agente precipitante é adicionado ao plasma e a amostra é então homogeneizada. Após a homogeneização, as proteínas precipitadas são removidas através de centrifugação, e uma alíquota do sobrenadante é injetada no sistema cromatográfico. O esquema abaixo mostra o procedimento geral empregado para extração de fármacos diretamente do plasma (Henion *et al.*, 1998; Klink, 2000).

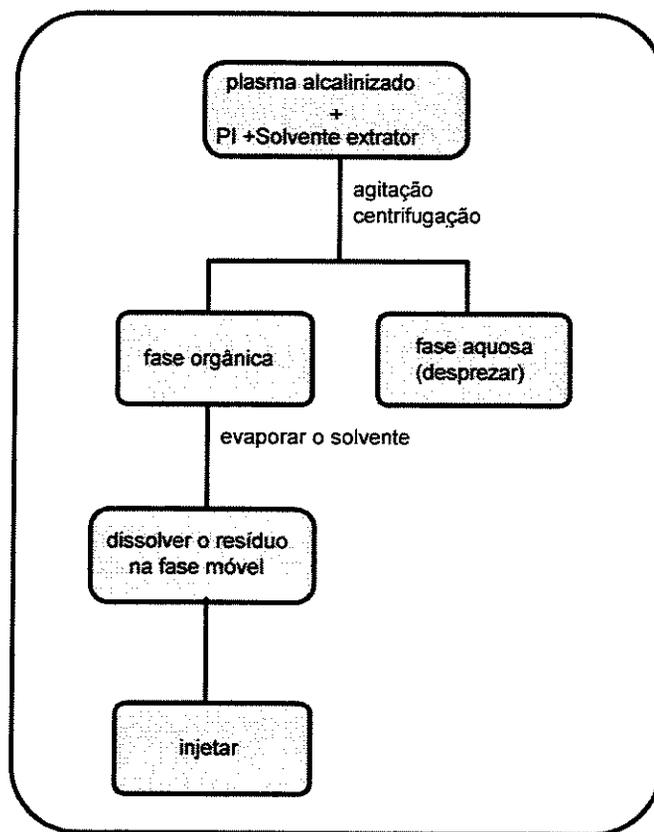


**Figura 17.** Extração por precipitação de proteínas.

### 1.6.2. Extração líquido-líquido.

Este processo baseia-se na diferente solubilidade do analito em dois solventes imiscíveis. Este princípio é bastante utilizado para preparação de amostras para

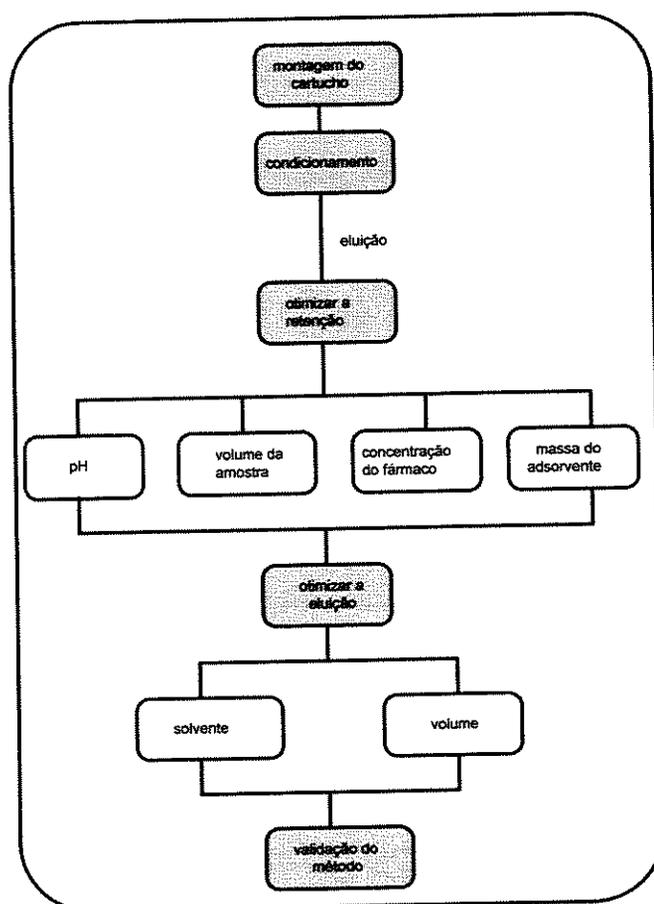
análise cromatográfica, principalmente pelo baixo custo e fácil operação. Este método é eficiente na remoção de interferentes e aumenta a concentração do analito na amostra. Geralmente, adiciona-se um solvente orgânico (pouco polar) imiscível à amostra aquosa (polar), num valor adequado de pH. A mistura é agitada e posteriormente centrifugada. Remove-se a fase orgânica e seca-se sob fluxo de ar ou nitrogênio. Resuspende-se o resíduo na amostra e injeta-se no sistema cromatográfico. O esquema abaixo mostra o procedimento geral empregado para extração com solvente orgânico, diretamente do plasma. Mais de um passo de extração da fase aquosa ou orgânica também pode ser realizada, caso haja problemas com interferentes endógenos (Henion *et al.*, 1998; Idsøe *et al.*, 1968; Maurer, 1998; Morrison & Boyd, 1990).



**Figura 18.** Extração líquido-líquido.

### 1.6.3. Extração líquido-sólido.

Segundo este procedimento, o cartucho de extração deve ser primeiramente condicionado, ou seja, ativado. À seguir, a amostra é aplicada à pressão atmosférica e o cartucho é lavado sob pressão para eliminar as impurezas retidas durante a aplicação. Após a lavagem, o excesso de água é eliminado sob pressão reduzida e o soluto é eluído com o solvente adequado. O esquema abaixo mostra o procedimento que será seguido para estabelecer as condições de preparação da amostra para determinação das concentrações total e ligada, empregando a extração líquido-sólido (Henion *et al.*, 1998; Klink, 2000; Maurer, 1998).



**Figura 19.** Extração líquido-sólido.

## 1.7. Padronização Interna e padronização externa.

Dentre todos os métodos de quantificação, a padronização interna é a que possui maior capacidade de eliminar erros técnicos, sendo selecionada para a quantificação dos fármacos em fluidos biológicos. Este método consiste em comparar a relação entre a área /altura obtida do composto e a do padrão interno, empregando diversas concentrações do composto em estudo e uma concentração fixa do padrão interno. Ou seja, adiciona-se uma quantidade conhecida do padrão interno à amostra e determina-se a relação entre as áreas/alturas, eliminando os erros decorrentes do procedimento de extração (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1994). O objetivo de usar um padrão interno durante a análise quantitativa é minimizar os possíveis erros que porventura possam acontecer como, por exemplo, perdas durante a extração e erros de injeção. O método da padronização interna consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância padrão na amostra a ser analisada, e relacionar as duas áreas ou alturas obtidas. O padrão interno ideal corresponde a uma substância similar à substância a ser quantificada, que tenha um tempo de retenção diferente do fármaco analisado, mas que seja próximo a ele, e que não influencie a análise (Collins *et al.*, 1995). O padrão interno deve possuir propriedades químicas semelhantes ao composto analisado, estar presente em concentrações similares, ter tempo de retenção próximo ao composto problema sem causar interferência, ser inerte e não fazer parte da amostra (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1995).

A padronização externa consiste em comparar a área ou altura do pico correspondente a quantidades conhecidas do composto problema com a do mesmo composto na amostra cuja concentração se deseja determinar (ANVISA, 2001).

---

---

# ***Objetivos***

O objetivo do estudo é, numa primeira etapa, desenvolver metodologia analítica com sensibilidade e seletividade adequadas para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos da amoxicilina em humanos e, em primeiro lugar, verificar se existe bioequivalência entre amoxicilina 500 mg cápsulas teste e a amoxicilina (AMOXIL<sup>®</sup>) 500 mg cápsulas produzida pela SmithKline Beecham. Em segundo lugar, avaliar se existe bioequivalência entre a formulação de amoxicilina teste (suspensão 250 mg/5mL) e o produto referência (amoxicilina suspensão 250 mg/5mL) elaborado pelo laboratório SmithKline Beecham. (AMOXIL<sup>®</sup>).

O objetivo da segunda etapa do estudo é desenvolver metodologia analítica com sensibilidade e seletividade adequadas para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos da azitromicina em humanos e, primeiramente, avaliar se existe bioequivalência entre a formulação de azitromicina teste (comprimidos revestidos de 500mg) e a azitromicina (comprimidos revestidos de 500mg) do produto de referência elaborado pelo Laboratório PFIZER Ltda. (ZITROMAX<sup>®</sup>). Posteriormente, avaliar se existe bioequivalência entre a formulação de azitromicina teste (suspensão 200 mg/5mL) e a azitromicina (suspensão 200 mg/5mL) do produto de referência elaborado pelo Laboratório PFIZER Ltda. (ZITROMAX<sup>®</sup>).

---

---

# ***Materiais e Métodos***

### **3.1. Segurança.**

O uso de aventais foi obrigatório durante todo o procedimento laboratorial, luvas e óculos de proteção foram utilizados durante o manuseio de qualquer material biológico. As normas de segurança laboratorial foram seguidas, bem como os procedimentos adequados para a eliminação de resíduos (ANVISA, 2001; Causon, 1997; 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

### **3.2. Equipamentos.**

Os métodos propostos requerem os equipamentos, reagentes padrões e materiais biológicos descritos a seguir. Outros equipamentos, padrões ou reagentes podem substituir os relacionados abaixo, desde que sejam de especificação equivalentes. Os equipamentos necessários estão relacionados nas tabelas 2, 3 e 4.

### **3.3. Solventes e reagentes.**

Os solventes, grau cromatografia, empregados na preparação das fases móveis foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) ou da EM Science (Gibbstown, NJ, EUA). O Fosfato Dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) foi obtido da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O metanol e o éter etílico empregados nos procedimentos de extração dos fármacos das amostras de plasma foram obtidos da EM Science (Gibbstown, NJ, EUA). As soluções empregadas nos

procedimentos foram preparadas com água purificada no sistema MILLI-Q-plus, e filtrada em membranas de 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA).

**Tabela 2.** Descrição dos equipamentos utilizados.

<b>Descrição</b>	<b>fabricante / país de origem</b>
Pipetas de volume variável (volume)	Gilson / França
Misturador (vortex)	Phoenix / Brasil
Ponteiras de pipeta descartáveis (volume 200µl) amarelas	Unilab / Brasil
Ponteiras de pipeta descartáveis (volume 1000µl) azuis	Unilab / Brasil
Tubos de ensaio descartáveis de vidro	Unilab / Brasil
Pipetas descartáveis (plástico)	Sigma / EUA
pHmetro	Orion / EUA
Balança analítica	Precisa 402 m / Alemanha
Centrífuga refrigerada	Ibras / Alemanha
Centrífuga	Excelsa / Brasil

**Tabela 3.** Sistema de HPLC.

<b>Componente</b>	<b>marca / modelo</b>
Bomba analítica	SHIMADZU / LC10AD
Auto-injetor	SHIMADZU / SIL-10AD VP
Forno para coluna	SHIMADZU / CTO – 10AS VP
Detector	SHIMADZU / SPD-10A VP
Sistema controlador	SHIMADZU / ACL- 10 A VP
Desgaseificador	SHIMADZU / DGU-2 A
Software	SHIMADZU / CLASS – VP 5.32

**Tabela 4.** Componentes do espectrômetro de Massas.

<b>Componente</b>	<b>marca / modelo</b>
Espectrômetro de Massas	Micromass / Quattro II
Computador	Digital Personal Workstation 266i
Software	Micromass / Mass Lynx 3.2

### **3.4. Padrões.**

As substâncias amoxicilina anidra e azitromicina, foram obtidas junto à USP Pharmacopeia e as substâncias eritromicina e cefadroxil foram obtidas junto à SIGMA-Aldrich (New York, NY, EUA).

### **3.5. Material biológico.**

Quantidades necessárias de plasma humano foram coletadas de indivíduos diferentes, sob as condições descritas na tabela 5.

**Tabela 5.** Condições do plasma utilizado no preparo da matriz para preparar as curvas de calibração e controles de qualidade.

<b>CONDIÇÕES</b>
PLASMA HUMANO NORMAL
PLASMA HUMANO LIPÊMICO
PLASMA HUMANO HEMOLISADO

### **3.6. Preparo das Soluções.**

Todas as soluções padrão preparadas foram transferidas para frascos de vidro âmbar, rotulados, com tampa de rosca e batoque bem como substituídas de acordo com os prazos de validade pré-determinados.

Em não havendo informações disponíveis sobre testes de estabilidade, todas as soluções foram mantidas a 4 °C e substituídas após 7 dias. Nestas situações o acompanhamento cuidadoso dos dados foi observado para avaliar a necessidade de substituição das mesmas, com maior ou menor intervalo de tempo. Todas as soluções utilizadas nas fases móveis foram preparadas de acordo com a necessidade e substituídas a cada lote analisado (ANVISA, 2001; Causon, 1997; 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

### **3.7. Preparo dos padrões de calibração e dos controles de qualidade.**

As concentrações dos padrões bem como dos controles de qualidade foram definidas em função da faixa prevista para as concentrações das amostras. Assim, estas concentrações correlacionam-se com a dose para qual o método foi desenvolvido. A utilização de outra dosagem pode levar a uma revisão destas concentrações, se a faixa prevista de concentrações da amostra não for a mesma (ANVISA, 2001; Causon, 1997; 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

### **3.8.Preparo dos padrões de calibração.**

A curva de calibração consiste em uma amostra branca (amostra basal analisada sem adição de padrão interno), uma amostra zero (amostra basal analisada com adição de padrão interno) e amostras não zero contendo a faixa prevista de concentrações que foram determinadas. As amostras de calibração foram obtidas adicionando-se soluções padrão contendo a substância a ser analisada no plasma humano (ANVISA, 2001; Causon, 1997; 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

### **3.9.Preparo dos controles de qualidade.**

Os controles de qualidade (CQ) têm 2 objetivos distintos, sendo que os definidos por LQ e LD foram utilizados para determinar, respectivamente, o limite de quantificação e limite de detecção do método analítico. O LD é a menor concentração de um analito na qual o procedimento bioanalítico pode seguramente diferenciar do ruído de fundo. Para determinação do LD foram analisadas amostras de plasma contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável que apresente uma relação sinal:ruído de 3:1. O LQ é a menor quantidade de um analito na amostra que pode ser quantitativamente determinado com aceitável precisão e exatidão. Também é conhecido como limite inferior de quantificação. Para determinação do LQ foram analisadas amostras de plasma contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Os controles

de qualidade baixo (CQB), controles de qualidade médio (CQM) e controles de qualidade alto (CQA) foram utilizados para monitorar a precisão e sensibilidade do método de quantificação, durante os ensaios. Os controles de qualidade (CQ) foram preparados adicionando-se soluções padrão, contendo a substância a ser determinada no plasma humano.

### **3.10. Realização das análises.**

Cada lote conteve as seguintes amostras (ANVISA, 2001; Causon, 1997; 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993):

Uma curva de calibração composta por uma amostra branca, um padrão zero e padrões não zero. Cada amostra, desde a amostra branca, até o último padrão foi inclusa (no mínimo em duplicata). A curva foi checada toda vez que utilizada para quantificação de amostras desconhecidas. Uma nova curva de calibração foi armazenada no software, para cada dia de trabalho, sendo periodicamente averiguada com os controles de qualidade. Estando estes dentro das especificações da curva a mesma foi usada; no mais, outra curva será construída. As amostras de concentrações desconhecidas foram quantificadas, sem replicatas. Controles de qualidade (CQB, CQM, CQA), foram intercalados com as amostras determinadas (ANVISA, 2001).

## NOTAS:

- I. Os controles de qualidade foram analisados antes, durante e depois de cada lote.
- II. Um lote de análises foi determinado com pelo menos dois CQ de mesma concentração.
- III. Todas as amostras de um mesmo indivíduo foram analisadas em um mesmo dia.

### 3.11. Validação do método.

Para padronização do método analítico, utilizando plasma como matriz biológica, foram necessários os seguintes ensaios: curva de calibração, linearidade, recuperação, precisão, exatidão, sensibilidade, especificidade e estabilidade (ANVISA, 2001; Causon, 1997; 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

Especificidade – É a busca individualizada do sinal de uma espécie única do analito. Para determinação da especificidade, realizou-se a investigação, quanto à presença de interferência, utilizando-se o procedimento proposto para a extração de amostras. Foram utilizados 4 plasmas colhidos em jejum de diferentes indivíduos colhidos, 1 plasma hiperlipêmico e 1 plasma hemolisado. A especificidade foi comprovada pela determinação de inexistência de interferência significativa, no tempo de retenção do fármaco, metabólitos ou padrão interno; comparando-se visualmente os cromatogramas obtidos com aquele produzido

pela análise de uma solução aquosa do fármaco em análise, em concentração próxima ao Limite de Quantificação.

Sensibilidade – É o grau de diferenciação entre duas concentrações próximas. Utilizou-se para a avaliação da sensibilidade o Limite de Quantificação (LQ), de forma a considerar não somente a sensibilidade em si, mas também os critérios de precisão e exatidão do método. O LQ foi aprovado se satisfeitos os seguintes critérios:

-Inexistência de interferência ou resposta de 3 vezes maior que qualquer interferência existente em brancos de plasma nos tempos de retenção em uso;

-Pico do fármaco identificável e claro com uma boa precisão ( $CV \leq 20\%$ ), calculada através do coeficiente de variação do valor quantificado para no mínimo 3 alíquotas, provenientes de um mesmo controle padrão, bem como da correspondente duplicata da curva de calibração em uso.

-Exatidão de 80% a 120% em relação ao valor nominal da concentração do controle padrão utilizado.

Linearidade – É a faixa de concentração onde a resposta é linear, e foi avaliada em função da linearidade da curva de calibração empregada. A curva de calibração, cujos pontos foram quantificados no mínimo em duplicata, foi aprovada se satisfeitos os seguintes critérios:

-Pelo menos 3 padrões de cada concentração nominal, incluindo o standard correspondente ao LQ e o standard de maior concentração, com desvio menor do

que 15% da concentração nominal (menor que 20% para o LQ) em pelo menos uma das duplicatas;

-Coeficiente de correlação da curva  $\geq 0,95$ .

Precisão e Exatidão – A precisão de um método analítico descreve a proximidade entre as diferentes medidas individuais de um fármaco. A repetibilidade da precisão é obtida quando as amostras são preparadas nas mesmas condições de manuseio. A exatidão de um método analítico descreve a proximidade dos resultados médios obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro (concentração) do fármaco. A precisão e exatidão foi avaliada a partir da quantificação de pelo menos 3 concentrações padrão distintas (controles de qualidade CQB, CQM, CQA), determinadas em função da faixa de concentrações esperadas, tomando-se como base pelo menos 3 alíquotas de cada concentração, quantificadas durante um único lote (repetibilidade e exatidão intra-ensaio). Seguem-se os critérios utilizados para aprovação destes quesitos:

-Repetibilidade: Para verificação da repetibilidade fez-se a análise de três concentrações (baixa, média e alta) dentro da faixa de limite esperado, realizando-se pelo menos 3 réplicas. O CV não deve exceder 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. Análises foram realizadas em um único dia e em 3 dias (ensaios intra-dia e inter-dias).

-Exatidão: Para verificação da exatidão foram analisadas amostras contendo quantidades conhecidas de fármaco, em três concentrações (controles de qualidade CQB, CQM, CQA), dentro da faixa de limite esperado, realizando-se pelo menos 3 réplicas. O desvio não deve exceder 15%, exceto para o LQ, para o

qual se admite valores menores ou iguais a 20%. As análises foram realizadas em um único dia e em 3 dias.

Reprodutibilidade – Quando as amostras são preparadas com diferentes condições de manuseio, o parâmetro de precisão medida é a reprodutibilidade. Foi avaliada a partir da determinação da precisão e exatidão de 3 lotes provenientes de matrizes biológicas distintas (precisão e exatidão inter-ensaio) através da quantificação, para cada um dos lotes, de pelo menos 3 concentrações padrão distintas (controles de qualidade CQB, CQM, CQA), determinadas em função da faixa de concentrações esperadas, tomando-se como base pelo menos 3 alíquotas de cada concentração.

Recuperação – A recuperação de um fármaco de uma matriz biológica é a quantidade do analito obtido após o processo de separação. A quantificação é comparada com a concentração nominal de um padrão adicionado à matriz biológica antes do processo de separação. A recuperação indica a eficiência de todos os processos envolvidos no método analítico e deve ser tratada dentro de um limite de variabilidade. Para avaliar a recuperação do método analítico verificou-se o limite de variação. Porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, por exemplo, de 50 a 60%, desde que a recuperação seja precisa e exata. Este teste foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (controles de qualidade CQB, CQM, CQA), com resultados obtidos a partir de soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

Estabilidade – É a estabilidade química de um analito em uma dada matriz dentro de condições específicas e em determinados intervalos de tempo. A estabilidade foi determinada em função do tempo necessário para preparação de amostras e respectiva quantificação bem como das temperaturas de armazenamento usualmente empregadas. Para sua realização foram utilizadas duas concentrações distintas do fármaco a ser dosado, cujas amostras foram submetidas aos seguintes testes:

*Estabilidade no auto-injetor* – Determinou-se a estabilidade do fármaco e do padrão interno, na temperatura encontrada no auto-injetor, por período de tempo igual ou superior ao da análise de um lote de amostras;

*Congelamento e descongelamento* – Determinou-se a estabilidade do fármaco em plasma após 3 ciclos de congelamento por 24 horas e descongelamento em temperatura ambiente;

*Estabilidade de curto período em temperatura ambiente*: Foi determinado a estabilidade do fármaco em plasma à temperatura ambiente, por período de tempo igual ou superior ao necessário para o preparo de amostras de um lote;

*Estabilidade de longo período*: Determinou-se a estabilidade do fármaco em plasma, na temperatura de congelamento das amostras, pelo período de tempo igual ou superior ao primeiro dia de coleta de amostras e o dia da análise da última amostra;

*Estabilidade das soluções de trabalho*: Determinou-se a estabilidade do fármaco e do padrão interno a partir das soluções de trabalho preparadas na

temperatura em que foram armazenadas (4°C), e por período de tempo equivalente à sua utilização durante a condução do estudo.

### **3.12. Seleção dos voluntários.**

Vinte e quatro voluntários sadios (doze do sexo masculino e doze do sexo feminino) entre 19 e 50 anos, peso entre  $\pm 10\%$  do peso corporal ideal, ajustado para altura e estrutura física, participaram do estudo. Todos os voluntários assinaram o termo de consentimento esclarecido (vide APÊNDICE), cujo protocolo clínico foi aprovado pelo CEP-USF e CEP Hospital Aviccena.

Os voluntários não apresentaram sinais ou sintomas evidentes de doença cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica ou psiquiátrica; com base na história clínica, nos exames físico e psiquiátrico e nos seguintes exames laboratoriais: glicemia, uréia, creatinina, SGOT, SGPT, fosfatase alcalina, gamma GT, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células brancas, exame de urina e protoparasitológico. As voluntárias do sexo feminino não estavam grávidas ou planejando engravidar durante o período do estudo.

### **3.13. Análise estatística.**

a) Foi realizada análise de variância (ANOVA) dos parâmetros farmacocinéticos  $AUC_{0-t}$  e  $C_{max}$  para avaliar os efeitos de sequência (grupo), de voluntários, de período e de tratamento.

b) Como o estudo empregou uma única dose dos medicamentos teste e de referência, a ANOVA foi realizada com os dados de  $AUC_{0-t}$  e  $C_{max}$  transformados logaritmicamente. A distribuição dos dados transformados aproxima-se mais de uma distribuição normal do que os dados não transformados.

---

c) Foram empregados para análise de  $AUC_{0-t}$  e  $C_{max}$ , dois testes  $t$  unicaudais, com nível de significância de  $p=0,05$ , construindo-se um intervalo de confiança (IC) de 90% para a razão entre as médias dos valores obtidos com os medicamentos teste e referência. Para cada um destes parâmetros, utilizou-se os dados transformados logaritmicamente.  $T_{max}$  que foram analisados como diferença individual: teste – referência, construindo-se um intervalo de confiança (IC) de 90%, utilizando-se teste não paramétrico.

d) Os medicamentos foram considerados bioequivalentes quando o IC de 90% para a razão entre as médias de  $AUC_{0-t}$  e de  $C_{max}$  foi compreendido entre 80 e 125%. Se clinicamente relevante  $T_{max}$  foi também considerado (ANVISA, 2001; Causon, 1997; 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

e) No caso de voluntários que apresentaram comportamento discrepante (*outliers*) nos parâmetros de absorção, em relação aos demais voluntários, sua exclusão do estudo foi justificada.

Os seguintes softwares foram utilizados: Winnonlin e Equivtest.

### **3.14. Estudo de bioequivalência da amoxicilina.**

#### 3.14.1. Preparo da solução padrão de amoxicilina.

Uma massa correspondente a 0,0500 g de amoxicilina foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (50 ml) e preparada em água:ACN (95:5 v/v) para a obtenção de uma solução de concentração igual a 1 mg/ml. Após a mistura, assegurou-se que o composto estava em solução.

#### 3.14.2. Preparo da solução padrão de cefadroxil.

Uma massa correspondente a 0,0500 g de cefadroxil foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (50 ml) e diluída em metanol para a obtenção de uma solução de concentração igual a 1 mg/ml. Após mistura, assegurou-se que o composto estava em solução.

#### 3.14.3. Preparo da solução tampão.

Preparou-se uma quantidade necessária para a realização do experimento programado. Para um litro de solução pesou-se exatamente 1,4196 g de fosfato dissódico e solubilizou-se em água até completar o volume para 1000 ml. Ajustou-se o pH para 4,83 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (14,0 mol/l). Esta solução poderá ser usada durante 48 horas, devendo ser guardada em geladeira.

#### 3.14.4. Preparo da fase móvel de trabalho.

Para fase móvel de trabalho, preparou-se uma solução constituída por 95 ml de tampão fosfato dissódico (pH = 4,83) e 50 ml de acetonitrila para um volume final de 1000 ml. As soluções foram misturadas e guardadas na geladeira até o momento de uso.

#### 3.14.5. Procedimento de extração das amostras.

Os procedimentos descritos abaixo foram aplicados não apenas para as amostras que foram analisadas, mas também para a extração de curvas padrão e controles de qualidade. Para a desproteínização das amostras de plasma contendo amoxicilina os seguintes passos foram seguidos:

- 1) Colocou-se o plasma humano (200  $\mu$ l) em tubos eppendorf.
- 2) Adicionou-se o padrão interno (15 $\mu$ l) cefadroxil 1mg/ml mantido em metanol. Misturou-se as amostras em vortex por 15 s.
- 3) Adicionou-se o agente precipitante (400  $\mu$ l) de metanol gelado. Misturou-se as amostras em vortex por 15 s.
- 4) As amostras foram levadas à geladeira (4°C) por 10 minutos e depois centrifugadas durante 12 min., a 12.000 rpm em centrifuga refrigerada.
- 5) Transferiu-se a solução para os vials com inserts de vidros descartáveis.
- 6) Os inserts foram acondicionados em vials fechados e colocados em estantes de tubos para auto-injetor SHIMADZU.

### 3.14.6. Condições cromatográficas.

As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna analítica: Lichrosorb RP-18 10 $\mu$ m (250 x 4,0 mm) e uma pré coluna Securityguard<sup>tm</sup> C<sub>18</sub> 10 $\mu$ m (4 x 3,0 mm). A pressão do sistema não ultrapassou 65-70 Kgf com pré-coluna nova e usando um fluxo de 1ml/min. A coluna foi operada a uma temperatura de 27 °C. A temperatura do auto-injetor foi mantida a 23 °C e o volume de injeção em 10  $\mu$ l.

O tempo total de corrida foi ajustado para 6,0 min. Os tempos característicos de retenção são apresentados na tabela 6.

**Tabela 6.** Tempos de retenção característicos das amostras.

PADRÕES	TEMPO DE RETENÇÃO (min)
AMOXICILINA	4,20
CEFADROXIL (PI)	5,20

### 3.14.7. Condições de detecção no ultravioleta.

Os parâmetros de interface foram otimizados, de forma que os cromatogramas exibissem alturas integradas consistentes, bem como uma razão satisfatória entre o sinal e o nível de ruído. O detector ultravioleta foi periodicamente avaliado, para confirmação de calibração. Para a análise de amoxicilina o comprimento de onda selecionado foi 229 nm.

### 3.14.8. Protocolo clínico.

O estudo foi conduzido segundo um delineamento aleatório cruzado de dois períodos, com um período de 7 dias entre cada uma das doses ("washout").

Ao longo de cada período, grupos de 8 ou 12 voluntários foram internados às 23:00 h da véspera do início de cada fase, após um jantar padrão, na Enfermaria de Convênios do Hospital Universitário São Francisco - HUSF. Depois de uma noite em jejum, receberam (às 8:00 h) uma dose única de amoxicilina 500 mg Teste ou SmithKline Beecham (Amoxil<sup>®</sup>-cápsulas) no primeiro estudo e uma dose única de Amoxicilina Teste-suspensão oral 250 mg/5 ml ou (Amoxil<sup>®</sup>-suspensão oral 250 mg/5 ml ) no segundo estudo, com 200 ml de água potável. Quatro horas após a administração, um almoço padrão foi servido. Não foi permitida a ingestão de outros alimentos durante o período de internação. Após o almoço, a ingestão de líquidos foi *ad libitum*, mas bebidas contendo xantinas (incluindo chá, café e coca-cola) foram evitadas. No mínimo uma semana após, o mesmo procedimento foi utilizado, só que, os voluntários receberam o medicamento da marca ainda não administrada. Voluntários que apresentaram quaisquer efeitos adversos devido à administração de amoxicilina, bem como aqueles que se recusaram a continuar participando, foram excluídos do estudo.

### 3.14.9. Análise das concentrações plasmáticas de amoxicilina.

As amostras de sangue (3 ml) foram coletadas através de "butterfly" heparinizado colocado em veia antecubital cateterizada, e colocadas em tubos

sem anticoagulante 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8h após a administração da amoxicilina. As amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 g durante 10 min e os plasmas foram separados e guardados à -70 °C até serem analisados. Todas as amostras pertencentes ao mesmo voluntário foram analisadas num mesmo dia.

Para as quantificações foram obtidas as razões das alturas dos picos de amoxicilina/padrão interno. As concentrações plasmáticas das amostras foram derivadas a partir da equação de regressão linear da reta, obtida com a curva padrão (concentração de amoxicilina em função das razões de alturas).

#### 3.14.10. Análise estatística e farmacocinética.

As curvas individuais de concentração plasmática dos fármacos, em função do tempo, foram obtidas para cada uma das formulações. A constante de eliminação terminal de primeira ordem ( $K_e$ ) foi estimada a partir da equação de regressão linear entre o logaritmo da concentração (foram selecionadas aquelas que descrevem uma fase terminal de decaimento linear) e o tempo. A meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ), derivada a partir da constante de eliminação ( $\ln 2/K_e$ ) do fármaco, também será determinada. A concentração máxima ( $C_{max}$ ) e o tempo no qual a mesma foi atingida ( $T_{max}$ ) foram calculadas. As áreas sob as curvas de concentração de amoxicilina -tempo desde 0 a 8 h ( $AUC_{[0-8]}$ ) foram calculadas aplicando a regra linear dos trapézios. A extrapolação desta área a tempo infinito ( $AUC_{[0-inf]}$ ) foi realizada somando o valor  $C_8/K_e$  à  $AUC_{[0-t]}$  previamente calculados

(onde  $C_8$  corresponde à concentração plasmática 8 h após a dose). A  $AUC_{[0-8]}$  deve ser igual ou superior a 80% da  $AUC_{[0-inf]}$ .

### **3.15. Estudo de Bioequivalência da Azitromicina.**

#### **3.15.1. Preparo da solução padrão de azitromicina.**

Uma massa correspondente a 0,0100 g de azitromicina foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (100 ml) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração igual a 100 µg/ml. Após a mistura, assegurou-se que o composto estava em solução.

#### **3.15.2. Preparo da solução padrão de eritromicina.**

Uma massa correspondente a 0,0100 g eritromicina foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (100 ml) e diluída em metanol para a obtenção de uma solução de concentração igual a 100 µg/ml. Após mistura, foi assegurado que o composto estava em solução.

#### **3.15.3. Preparo da solução de ácido fórmico 0,1% (v/v).**

Preparou-se a quantidade necessária para a realização do experimento programado. Para um litro de solução mediu-se 1,0 ml de ácido fórmico e

solubilizou-se em água, completando-se o volume para 1000 ml com água Milli-Q. Esta solução poderá ser usada durante 48 horas, devendo ser guardada em geladeira.

---

#### 3.15.4. Preparo da fase móvel de trabalho.

---

Para fase móvel de trabalho, preparou-se uma solução constituída por 40% de ácido fórmico 0,1% (v/v) e 60% acetonitrila para um volume final de 1000 ml. As soluções foram misturadas, filtradas e guardadas na geladeira até o momento de uso.

#### 3.15.5. Procedimento de extração das amostras.

Os procedimentos descritos abaixo foram aplicados não apenas para as amostras que foram analisadas, mas também para a extração de curvas padrão e controles de qualidade. Para a extração líquido-líquido das amostras de plasma contendo azitromicina os seguintes passos foram seguidos:

- 1) Colocou-se o plasma humano (200  $\mu$ l) em tubos eppendorf .
- 2) Adicionou-se 20  $\mu$ l de NaOH 1mol/l.
- 3) Adicionou-se o padrão interno (20 $\mu$ l) eritromicina 1 $\mu$ g/ml mantido em metanol. Misturou-se as amostras em vórtex por 15 s.
- 4) Adicionou-se 800 $\mu$ l de éter etílico e agitou-se as amostras em vórtex por 15 s.

- 5) As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 3700 rpm.
- 6) Retirou-se 600µl da fase orgânica e transferiu-a, usando pipeta automática com ponteiros descartáveis individuais, para outros tubos eppendorf.
- 7) A fase orgânica foi seca sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi ressuspendido em 800µl de acetonitrila.
- 8) Transferiu-se a solução ressuspendida para vials com inserts de vidros descartáveis.
- 9) Os vials foram fechados e colocados em estantes de tubos para auto-injetor SHIMADZU.

#### 3.15.6. Condições cromatográficas.

As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna analítica: Phenomenex Mercury MS (20,0 x 4,0 mm) e uma pré coluna Securityguard™ C<sub>18</sub> 10µm (4 x 2,0 mm). A pressão do sistema não ultrapassou 70-80 bar com pré-coluna nova usando um fluxo de 0,5ml/min.

A coluna foi operada a uma temperatura ambiente. A temperatura do auto-injetor foi mantida a 20°C e o volume de injeção em 10 µl.

O tempo total de corrida foi ajustado para 2,0 min. Os tempos característicos de retenção estão apresentados na tabela 7.

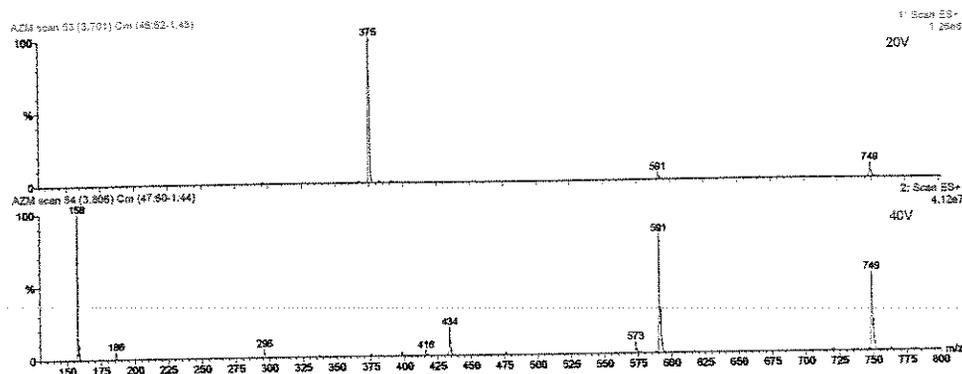
**Tabela 7.** Tempos de retenção característicos das amostras.

<b>PADRÕES</b>	<b>TEMPO DE RETENÇÃO (min)</b>
AZITROMICINA	0,82
ERITROMICINA (PI)	0,85

### 3.15.7. Condições de detecção no espectrômetro de massas.

Os parâmetros de interface foram otimizados, de forma que os cromatogramas exibiram áreas integradas consistentes, bem como uma razão satisfatória entre o sinal e o nível de ruído. O equipamento foi ajustado para o modo de ionização por electrospray positivo (ES+). A análise foi desenvolvida no modo MS/MS com energia do cone 40V, energia de colisão 30eV, capilar 3,5KV. Temperatura da probe 100°C. Nitrogênio como gás secante com fluxo de 40 l/h e como gás de nebulização com fluxo de 10 l/h. Como gás de colisão foi utilizado argônio a uma pressão de  $7,5 \times 10^{-4}$  mBar. Para a azitromicina foi monitorado o íon pai m/z 591 e o íon filho m/z 158. Para a eritromicina foi monitorado o íon pai m/z 576 e o íon filho m/z 158 (Figuras 20-22).





**Figura 22.** Espectro de massas da azitromicina (energia do cone 20V e 40V).

### 3.15.8. Protocolo clínico.

O estudo foi conduzido segundo um delineamento aleatório cruzado de dois períodos, com um período de 14 dias entre cada uma das doses ("washout").

Foi solicitado ao voluntário que se apresentasse, para internação, na Enfermaria do Hospital Avicenna - São Paulo, Capital, aproximadamente às 22:30 horas da véspera do início de cada fase, após um jantar padrão, na enfermaria do mesmo hospital. Os voluntários tiveram assistência e cuidados especializados durante todo o período do estudo. Após um jejum de no mínimo 8 horas, o voluntário recebeu uma dose única de Azitromicina Teste-comprimidos revestidos 500 mg ou (Zitromax<sup>®</sup>-comprimidos revestidos 500 mg) no primeiro estudo e uma dose única de Azitromicina Teste-suspensão oral 200 mg/5 ml ou (Zitromax<sup>®</sup>-suspensão oral 200 mg/5 ml) no segundo estudo, sob supervisão médica, com 200 ml de água potável. Permaneceu mais 4 horas ainda em jejum, quando então recebeu a primeira refeição o almoço (com arroz, feijão, carnes, verduras, gelatinas ou frutas e sucos de frutas), às 14 horas lanche da tarde (suco, chá e bolachas salgadas), em torno das 17:30 horas recebeu o jantar (similar ao almoço)

e às 20 horas novo chá com bolachas ou torradas; não foi servido chá-mate ou chá preto, ou seja, chás que contenham xantinas. Todas as refeições foram servidas em material descartável. Duas semanas após, o mesmo procedimento foi utilizado, só que, os voluntários receberam o medicamento de marca ainda não administrada. Voluntários que apresentaram quaisquer efeitos adversos devido à administração de azitromicina, bem como aqueles que se recusaram a continuar participando, foram excluídos do estudo.

### 3.15.9. Análise das concentrações plasmáticas de azitromicina.

As amostras de sangue (8 ml) foram coletadas através de gelco heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário, e colocadas em tubos sem anticoagulante 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8 e 12, 18, 24, 48, 96, 168 e 216h após a administração da azitromicina. Após as coletas as amostras foram centrifugadas a 4,000 g por 10 min, e o plasma foi removido e estocado a -70 °C até ser utilizado. Todas as amostras de um mesmo voluntário foram analisadas em um mesmo dia.

A curva padrão foi construída a partir de uma amostra do plasma sem azitromicina ao qual foram acrescentadas concentrações conhecidas do padrão.

As concentrações plasmáticas das amostras foram derivadas a partir da equação de regressão da reta obtida com a curva padrão (concentração de azitromicina em função da razão das áreas)

### 3.15.10. Análise estatística e farmacocinética.

As curvas individuais de concentração plasmática de azitromicina em função do tempo foram obtidas para cada uma das formulações. A constante de eliminação terminal de primeira ordem ( $K_e$ ) foi estimada a partir da equação de regressão linear entre o logaritmo da concentração (foram selecionadas aquelas que descrevem uma fase terminal de decaimento linear) e o tempo. A depuração ( $D$ ), o volume aparente de distribuição ( $V_d$ ) e a meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) derivada a partir desta constante de eliminação ( $\ln 2/K_e$ ) do fármaco também foram determinados. A concentração máxima ( $C_{max}$ ) e o tempo no qual a mesma é atingida ( $T_{max}$ ) foram calculados. As áreas sob as curvas de concentração de azitromicina x tempo desde 0 a 216 h ( $AUC_{[0-216]}$ ) foram calculadas aplicando a regra linear dos trapézios. A extrapolação desta área a tempo infinito ( $AUC_{[0-inf]}$ ) foi realizada somando o valor  $C_{216}/K_e$  à  $AUC_{[0-216]}$  previamente calculada (onde  $C_{216}$  corresponde à concentração plasmática 216 h após a dose). A  $AUC_{[0-216]}$  deve ser igual ou superior a 80% da  $AUC_{[0-inf]}$ .

---

---

## ***Resultados e Discussão***

## 4.1. Análise da azitromicina.

### 4.1.1. Validação do método analítico.

Esta etapa do estudo apresenta a validação do método para Determinação de Azitromicina em plasma Humano, utilizando Eritromicina como Padrão Interno. Os procedimentos laboratoriais, utilizados para demonstrar que o método analítico é adequado e confiável para as análises propostas, são apresentados nesta seção. Os resultados obtidos durante estes procedimentos também estão documentados nesta seção (validação pré-estudo, incluindo parâmetros como sensibilidade, especificidade, linearidade, precisão e reprodutibilidade).

#### 4.1.1.1. Validação pré-estudo.

Para a realização destes testes, a boa qualidade dos padrões de referência utilizados no preparo das soluções é indispensável para obtenção de resultados apreciáveis. Foram utilizados padrões de referência com procedência identificável: a origem, o número do lote, bem como a existência ou não de um “Certificado de Análise (CA)”, são descritos na tabela abaixo.

**Tabela 8.** Padrões de referência certificados.

<b>Padrão</b>	<b>Finalidade</b>	<b>Origem</b>	<b>Lote</b>	<b>CA*</b>
Azitromicina	Analito	Padrão de referência USP	H	1
Eritromicina	Padrão interno	Padrão de referência	107H0644	2

\*1. padrões de referência com certificado (USP), 2. Padrões de referência obtidos comercialmente, 3. Sintetizados por laboratório de análise, 4. Fornecido pelo agente financiador.

#### 4.1.1.2. Especificidade.

Para confirmar a especificidade do método, amostras brancas de plasma humano foram obtidas nas seguintes condições:

**Tabela 9.** Amostras do fluido biológico (plasma).

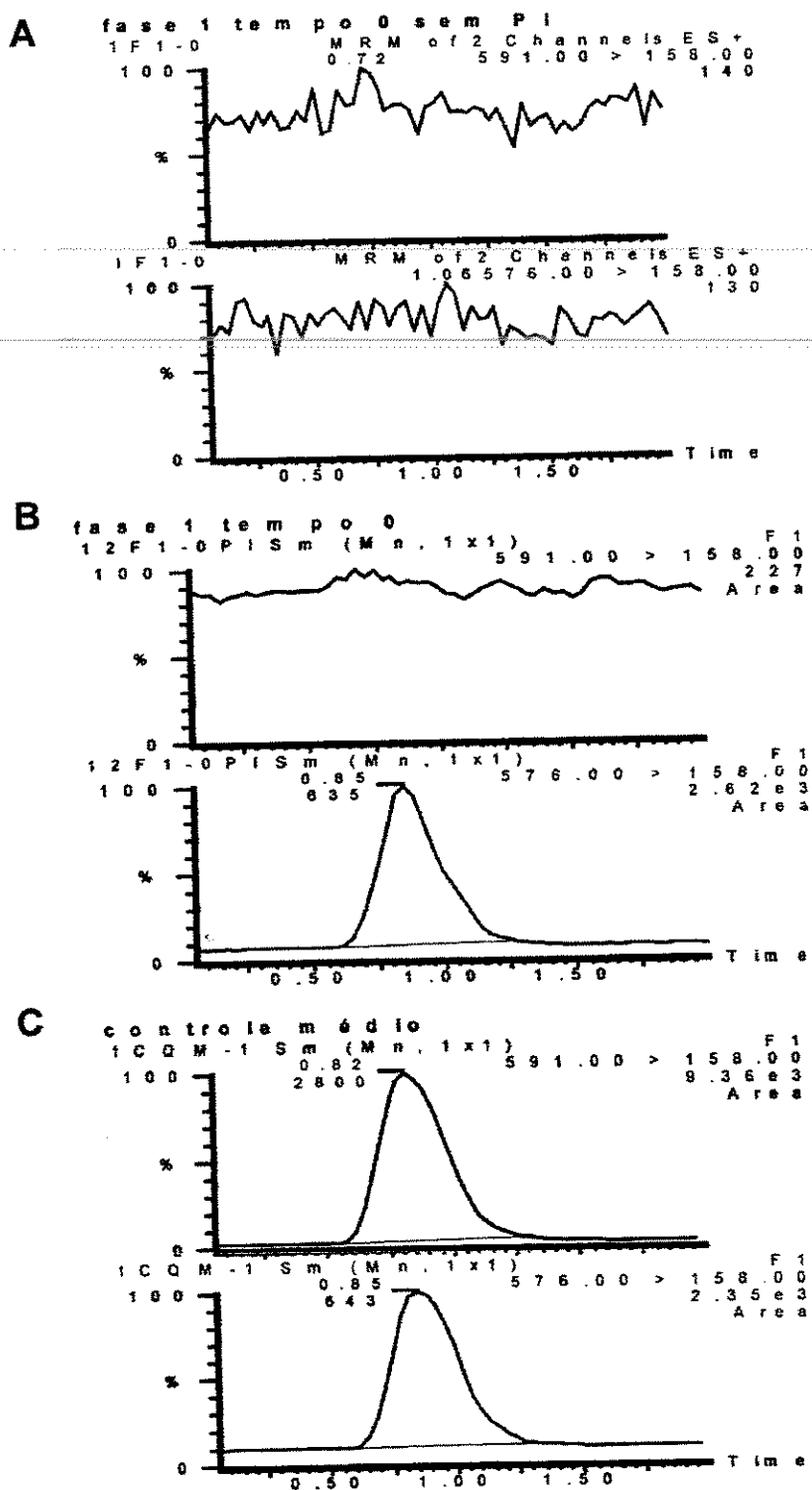
Indivíduo	Descrição	Origem	Lote
1	Plasma Humano Normal	HUSF	Lot-21630/001
2	Plasma Humano Normal	HUSF	Lot-4334/021
3	Plasma Humano Normal	HUSF	Lot-26973/002
4	Plasma Humano Normal	UNIFAG-USF	Lot-R9
5	Plasma Humano Lipêmico	UNIFAG-USF	Lot-SACC/0501
6	Plasma Humano Hemolisado	UNIFAG-USF	Lot-RMOT/0501

Cada amostra branca foi testada para avaliar interferência, utilizando-se os procedimentos de extração e as condições cromatográficas propostas, e comparada com os resultados obtidos a partir de uma solução da substância a ser analisada em concentrações próximas ao LQ. Não foram encontradas interferências nos tempos de retenção da droga ou padrão interno, como demonstrado nos cromatogramas apresentados na Figura 23. Na Tabela 10, estão apresentados os resultados do estudo de estabilidade da Azitromicina (60 e 2700 ng/mL) em pool de plasma normal, lipêmico e hemolisado.

**Tabela 10.** Estudo da estabilidade da azitromicina em pool de plasma (normal, hemolisado e lipêmico).

Controle da Amostra	Plasma Pool			Média	CV (%)	Exatidão (%)
CQB	56,02	53,31	68,24	<b>59,9</b>	<b>13,43</b>	<b>98,65</b>
CQA	2341,53	2875,87	3098,87	<b>2772,09</b>	<b>14,03</b>	<b>102,67</b>

CQA = 2700,0 ng/mL CQB = 60,0 ng/mL (Valores nominais do controle). \*(n=3).



**Figura 23.** Análise da azitromicina. **A)** Plasma branco normal; **B)** Plasma branco normal + padrão interno (eritromicina 100 ng/mL); **C)** Plasma normal + azitromicina (1500 ng/mL concentração nominal) + padrão interno.

#### *4.1.1.3. Curva de calibração.*

Para definir a relação entre a concentração e a resposta, foi preparada uma curva de calibração contendo no mínimo cinco concentrações padrões extraídas das amostras de plasma. A curva de calibração foi feita em replicata, utilizando-se depois para as determinações uma curva média obtida através das réplicas. Os valores específicos foram ajustados a partir de testes previamente realizados, incluindo-se a primeira quantificação de amostras desejadas, tomando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista dos valores a serem encontrados. Os itens subseqüentes relatam os procedimentos realizados para determinar os parâmetros envolvidos, bem como os critérios de validação, e resultados obtidos.

#### *4.1.1.4. Determinação dos Limites de quantificação e detecção.*

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram definidos levando-se em consideração a sensibilidade, precisão e especificidade do método. A sensibilidade do método foi avaliada utilizando o LQ como parâmetro principal, ou seja, a menor concentração do fármaco quantificado com erro inferior a 20%. O limite de detecção foi considerado a partir da concentração que apresenta a altura do pico igual a 3 vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2001; Causon, 1997; 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

Para avaliar a precisão e sensibilidade do método, amostras de controle de qualidade também foram incluídas no procedimento de validação. Tentou-se

repetições de análises, com valores sucessivamente menores, quando os valores inicialmente escolhidos foram detectados com facilidade.

Os seguintes critérios foram seguidos para a definição deste LQ (ANVISA, 2001; CAUSON, 1997; 1985; FDA, 1998A; FDA, 1998B; FDA, 1993):

Verificar a ausência de interferência nas amostras, no tempo de retenção do composto a ser analisado. Também é considerado aceitável uma resposta 3 vezes maior que qualquer interferência, no tempo de retenção do composto a ser analisado.

O pico do composto analisado deverá ser identificável, definido e com uma precisão (CV)  $\leq 20\%$ . Exatidão calculada por meio de padrões, no mínimo em triplicata, entre 80%-120% em relação a concentração nominal do padrão. LQ de amostra de controle de qualidade, com a mesma concentração nominal que a amostra em consideração, atingindo os critérios mencionados acima para sensibilidade e precisão. Desta forma, o LQ e LD foram validados. Os valores encontrados dentro destas condições na validação foram de 20 ng/mL e 10 ng/mL respectivamente.

#### *4.1.1.5. Linearidade.*

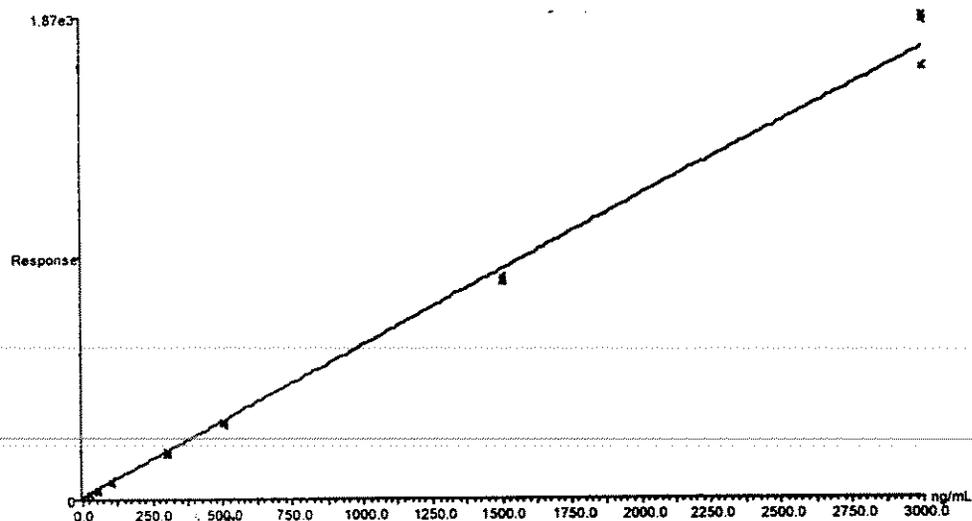
A linearidade da curva de calibração foi desenvolvida dentro dos seguintes parâmetros (29-34): Desvio da concentração nominal no LQ, em pelo menos duas das replicatas  $\leq 20\%$ . Desvio da concentração dos padrões, diferentes do LQ,  $\leq 15\%$  em pelo menos duas das replicatas. As condições anteriormente descritas devem ser atingidas em pelo menos 4 padrões diferentes de zero, incluindo o LQ

como o primeiro padrão de calibração. O coeficiente de correlação será aceito se maior ou igual a 0,95. Os dados detalhados da curva de calibração são apresentados na Tabela 11 e na Figura 24.

**Tabela 11.** Dados da curva de calibração obtida.

<b>Padrão</b>	<b>Concentração Nominal (ng/mL)</b>	<b>Concentração Experimental (ng/mL)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
Azitromicina	20,0	24,03	<b>2,24</b>	120,15	<b>9,86</b>
	20,0	20,15		100,75	
	20,0	24,04		120,20	
Azitromicina	50,0	54,73	<b>5,94</b>	109,46	<b>12,12</b>
	50,0	49,31		98,62	
	50,0	42,87		85,74	
Azitromicina	100,0	108,85	<b>6,67</b>	108,85	<b>6,49</b>
	100,0	103,80		103,80	
	100,0	95,63		95,63	
Azitromicina	300,0	306,25	<b>15,29</b>	102,08	<b>5,16</b>
	300,0	278,64		92,88	
	300,0	303,84		101,28	
Azitromicina	500,0	479,79	<b>8,15</b>	95,96	<b>1,67</b>
	500,0	490,65		98,13	
	500,0	495,75		99,15	
Azitromicina	1500,0	1416,24	<b>15,48</b>	94,42	<b>1,08</b>
	1500,0	1430,63		95,38	
	1500,0	1447,18		96,48	
Azitromicina	3000,0	3182,35	<b>157,10</b>	106,08	<b>102,78</b>
	3000,0	3206,16		106,87	
	3000,0	2861,63		95,39	
<b>Exatidão Média (%)</b>				<b>100,56</b>	
<b>Coefficiente de correlação</b>				<b>R=0,9953</b>	

**Equação da curva média de calibração:  $y=0,581357x+ 8,03672$ .**



**Figura 24.** Curva de calibração da azitromicina.

#### *4.1.1.6. Precisão e exatidão.*

Para avaliar a precisão e exatidão do método, no mínimo 3 concentrações distintas, dentro da faixa esperada de concentrações (incluindo-se LQ e concentrações dos controles de qualidade) foram analisadas, utilizando-se determinações por concentração. A precisão e exatidão foram determinadas em um esquema diário, que definiu estes parâmetros para uma corrida analítica e num esquema de dias diferentes, o que avalia a variabilidade entre dias, relacionada com fatores humanos, diferenças nos reagentes, etc.

#### *4.1.1.7. Determinação da concentração dos controles de qualidade.*

Os valores específicos foram definidos, baseados nos critérios apresentados abaixo, e foram ajustados em testes subseqüentes, incluindo-se aí a primeira quantificação real, e levando-se em consideração a faixa antecipada de valores analíticos. As concentrações finais das amostras, dos controles de qualidade, foram definidas como as apresentadas na Tabela 12.

**Tabela 12.** Definição dos controles de qualidade (CQ).

<b>Tipo do CQ</b>	<b>Identificação Do CQ</b>	<b>Definição de Faixa</b>	<b>Valor Definido (ng/ml)</b>
Amostra CQ-LQ	LQ	Menor concentração determinável com precisão e exatidão	20,0
Amostra CQ baixo	CQB	Menor ou igual 3 x LQ	60,0
Amostra CQ médio	CQM	Intermediário entre CQ elevado e baixo	1500,0
Amostra CQ Alto	CQA	75-90% do padrão de calibração mais elevado ou do maior valor antecipado de concentração	2700,0

#### 4.1.1.8. Validação intra-dia.

A precisão e a exatidão intra-dia das amostras foram determinadas utilizando-se um lote contendo as seguintes amostras: uma curva de calibração contendo padrões conforme definidos anteriormente. Cinco amostras de cada um dos CQ definidos acima. As amostras de controle de qualidade foram feitas de uma solução previamente preparada, mas diferente da utilizada para os padrões.

Os seguintes critérios foram seguidos, para que a precisão e exatidão intra-dia fosse considerada aprovada (ANVISA, 2001; CAUSON, 1997; 1985; FDA, 1998A; FDA, 1998B; FDA, 1993):

Precisão: para cada nível de concentração, o Coeficiente de Variação (CV) não deveria exceder 15% (Tolerância de até 20% na concentração de LQ).

Exatidão: o valor médio das amostras, a cada nível de concentração, deve estar dentro de 15% do valor verdadeiro (Tolerância de até 20% em concentração de LQ). Os resultados das análises Intra-Dia estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Análise dos controles de qualidade intra-dia.

Controle de Qualidade	Concentração (ng/mL) encontrada nas amostras individuais					Validação		
						Média (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
<b>CQLQ</b>	24,03	24,02	20,15	23,37	19,04	22,12	10,64	110,61
<b>CQB</b>	63,23	62,63	56,20	51,82	62,90	59,36	8,63	98,62
<b>CQM</b>	1448,99	1387,09	1505,25	1489,40	1484,46	1463,03	3,22	97,53
<b>CQA</b>	2398,70	2825,69	2741,16	2807,87	2998,90	2754,46	8,00	102,20

CQLQ= 20,0 ng/mL; CQB= 60,0 ng/mL; CQM= 1500,0 ng/mL; CQA= 2700,0 ng/mL (Concentrações nominais).

#### 4.1.1.9. Validação inter-dias.

Os seguintes critérios foram seguidos para considerar a precisão e exatidão inter dias (ANVISA, 2001; CAUSON, 1997; 1985; FDA, 1998A; FDA, 1998B; FDA, 1993):

Precisão: para cada nível de concentração, um CV obtido dos valores médios de cada lote não deve ultrapassar 15% (tolerância até 20% em valores de LQ).

Exatidão: o valor médio de cada lote, em cada nível de concentração, não deve diferir mais de 15% do valor real (tolerância até 20% em valores de LQ). Os dados da validação inter dias são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Análise dos controles de qualidade inter-dias.

Identificação da Amostra	Concentração Média ng/ml			Validação		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
CQB	63,23	60,51	59,17	59,17	1,22	99,46
CQM	1448,99	1496,18	1451,69	1451,69	1,57	98,02
CQA	2754,46	2713,56	2411,44	2411,44	7,13	97,27

CQB= 60,0 ng/mL ; CQM= 1500,0 ng/mL ; CQA= 2700,0 ng/mL (Concentrações nominais).

#### 4.1.1.10. Recuperação.

Para o cálculo da recuperação, a área dos picos das soluções padrão nas concentrações correspondentes ao CQB e CQA foi comparada à área dos picos dos padrões extraídos do plasma (CQB e CQA). Os resultados obtidos estão representados na tabela 15.

A recuperação (R) foi calculada através da fórmula, conforme registro apresentado na tabela 15 (Quattrocchi, *et al.*, 1992):

$$R = \text{concentração obtida} \times 100 / \text{concentração real}$$

**Tabela 15.** Análise da percentagem de recuperação (n=3).

Identificação da Amostra	Recuperação (%)	CV (%)
CQB	67,10	3,3
CQA	76,24	8,6

CQB= 75,0 ng/mL ; CQM= 400,0 ng/mL ; CQA= 700,0 ng/mL (Concentrações nominais).

## 4.2. Estudo de bioequivalência da azitromicina comprimidos revestidos 500 mg.

O objetivo desta etapa do estudo foi submeter os medicamentos teste (Azitromicina) e padrão (Zitromax<sup>®</sup> PFIZER) ao estudo de bioequivalência.

### 4.2.1. Inventário e retenção dos medicamentos.

#### 4.2.1.1. Amostras formulação referência.

##### Zitromax<sup>®</sup> comprimidos revestidos de 500 mg (PFIZER do Brasil LTDA)

- lote n° AO 1410
- fabricação 05/00, validade 4 anos.
- recebemos 2 caixas de Zitromax<sup>®</sup> (comprimidos de 500 mg), cada caixa com 28 comprimidos cada, utilizamos 24 comprimidos.
- **amostras de retenção : 32 comprimidos.**

#### 4.2.1.2. Amostras formulação teste.

##### Azitromicina comprimidos revestidos de 500 mg :

- lote n° 110/00
- fabricação 18/09/00, validade 4 anos.
- recebemos 92 comprimidos, utilizamos 24 comprimidos.
- **amostras de retenção : 68 comprimidos.**

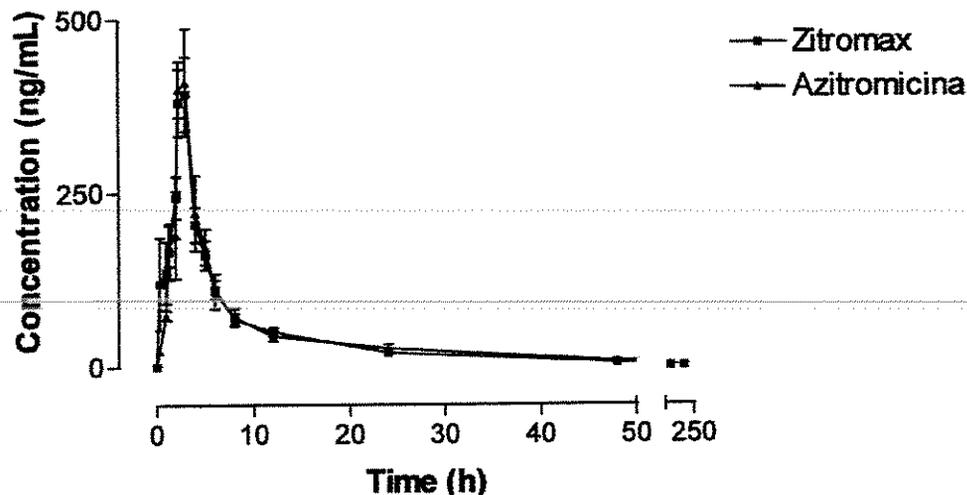
#### 4.2.2. Local para a retenção das formulações.

As amostras de retenção estão guardadas em armário com chave, no Hospital Aviccena, situado à Rua Padre Adelino, 901, Belém – São Paulo-SP. Estas formulações estão sob responsabilidade da **Dra. Elisa Guelere Paris (Coordenadora da Etapa Clínica)**.

#### 4.2.3. Análise das concentrações plasmáticas de azitromicina.

As amostras de sangue (3 ml) foram coletadas através de gelco heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário, e colocadas em tubos sem anticoagulante 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8 e 12, 18, 24, 48, 96, 168 e 216h após a administração da azitromicina comprimidos revestidos 500 mg (Padrão ou Teste). Após as coletas as amostras foram centrifugadas a 4,000 g por 10 min, o plasma foi removido e estocado a -70 C até ser utilizado. Todas as amostras de um mesmo voluntário foram analisadas em um mesmo dia.

A média das concentrações plasmáticas dos fármacos obtidas através da análise dos voluntários está ilustrada na figura 25. Os resultados da validação das corridas analíticas encontram-se descritas na Tabela 16.



**Figura 25.** Curva da concentração plasmática média ( $\pm$  EPM) de 24 voluntários vs. tempo (h) submetidos ao estudo entre Azitromicina (teste) e Zitromax<sup>®</sup> (padrão).

**Tabela 16.** Validação dos lotes analisados.

Validação	Concentração Experimental (ng/mL)		
	CQB	CQM	CQA
<b>Controles</b>			
<b>Média</b>	58,76	1476,97	2664,54
<b>CV (%)</b>	13,08	9,32	10,14
<b>Exatidão (%)</b>	97,93	98,46	98,67
<b>n</b>	48	48	48

CQB= 60,0 ng/mL ; CQM= 1500,0 ng/mL ; CQA= 2700,0 ng/mL (Concentrações nominais).

Na Tabela 17, estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos médios, com intervalo de confiança (IC) de 90%, obtidos das análises plasmáticas de 24 voluntários, submetidos ao estudo entre Azitromicina comprimidos revestidos 500mg (Teste) e Zitromax<sup>®</sup> comprimidos revestidos (Padrão). Na randomização a droga teste foi denominada de Azitromicina e a droga padrão Zitromax<sup>®</sup>.

**Tabela 17.** Média dos parâmetros farmacocinéticos para 24 voluntários depois da administração de Azitromicina 500 mg/comprimido (teste) e ZITROMAX<sup>®</sup> (padrão).

Parâmetros farmacocinéticos	AZITROMICINA	
	Azitromicina (TESTE)	Zitromax <sup>®</sup> (PADRÃO)
<b>ASC<sub>0-216h</sub> (ng*h*ml<sup>-1</sup>)</b> <b>Média geométrica (IC 90%)</b>	2558,96 (2024,41 – 3039,50)	2505,76 (2024,71 – 2986,81)
<b>ASC<sub>0-∞</sub> (ng*h*ml<sup>-1</sup>)</b> <b>Média geométrica (IC 90%)</b>	2786,38 (2211,82 – 3360,94)	2696,44 (2189,05 – 3203,83)
<b>C<sub>max</sub> (ng*ml<sup>-1</sup>)</b> <b>Média geométrica (IC 90%)</b>	639,40 (510,32 – 768,47)	614,79 (521,19 – 708,39)
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b> <b>Média geométrica (IC 90%)</b>	14,27 (10,74 – 17,79)	12,96 (8,08 – 17,85)
<b>T<sub>max</sub> (h)</b> <b>Média geométrica (IC 90%)</b>	2,36 (2,06 – 2,66)	2,21 (1,91 – 2,51)

Na Tabela 18 e Tabela 19 estão apresentados os resultados da análise estatística, comparando-se as razões da ASC<sub>0-216h</sub> e C<sub>max</sub>, bem como a análise da diferença individual de T<sub>max</sub>. (teste-referência) respectivamente.

**Tabela 18.** Análise estatística para a razão da ASC<sub>(0-216h)</sub> e C<sub>max</sub> da azitromicina comprimidos revestidos 500 mg (teste) e Zitromax<sup>®</sup> (padrão).

Razão	Análise Estatística		
	Média Geométrica	90% IC	Bioequivalente
<b>Azitromicina teste / Zitromax<sup>®</sup></b>			
ASC <sub>0-216 h</sub> % razão	99,70	97,78-101,63	SIM
C <sub>max</sub> % razão	99,65	96,72-102,63	SIM

**Tabela 19.** Análise da diferença individual de  $T_{max}$ . (teste-referência).

Diferença de $T_{max}$ (teste-referência)	Análise Estatística IC 90%	Valor de p
0,15	(-0,205-0,505)	0,48

Os programas utilizados para os propósitos acima descritos foram: WinNonlin™, Versão 2.1. Programa de Bioequivalência para estudo de dois períodos Crossover, versão 1.0. Programa Microsoft Excel Versão 97. GraphPad Prism versão 2,0 e WinSTAT versão 2,01.

### **4.3. Estudo de bioequivalência da azitromicina suspensão oral 200 mg/5 ml.**

O objetivo deste estudo foi submeter os medicamentos teste (Azitromicina-suspensão oral 200 mg/5 mL) e padrão (Zitromax® - suspensão oral 200 mg/5 mL PFIZER) ao estudo de bioequivalência.

#### **4.3.1. Inventário e retenção dos medicamentos.**

##### **4.3.1.1. Amostras formulação referência.**

###### Zitromax® suspensão oral 200mg/5ml (PFIZER do Brasil LTDA)

- lote n° 9076470.
- fabricação 03/99, validade 03/02.
- recebemos 18 frascos de Zitromax® suspensão oral Pfizer LTDA (suspensão oral 200mg/5ml), cada frasco com 3 doses. Foram utilizados 10 frascos.
- **amostras de retenção : 8 frascos (24 doses).**

#### 4.3.1.2. Amostras formulação teste.

##### Azitromicina suspensão oral 200mg/5ml:

- lote nº Pi 73/00.
- fabricação 25/07/00, validade 25/07/02.
- recebemos 14 frascos de Azitromicina suspensão oral (suspensão oral 200mg/5ml), cada frasco com 4 doses. Foram utilizados 6 frascos.
- **amostras de retenção : 8 frascos (32 doses).**

#### 4.3.2. Local para a retenção das formulações

As amostras de retenção estão guardadas em armário com chave, no Hospital Avicenna, situado à Rua Padre Adelino, 901, Belém – São Paulo-SP. Estas formulações estão sob responsabilidade da Dra. Elisa Guelere Paris (Coordenadora da Etapa Clínica).

#### 4.3.3. Análise das concentrações plasmáticas de azitromicina.

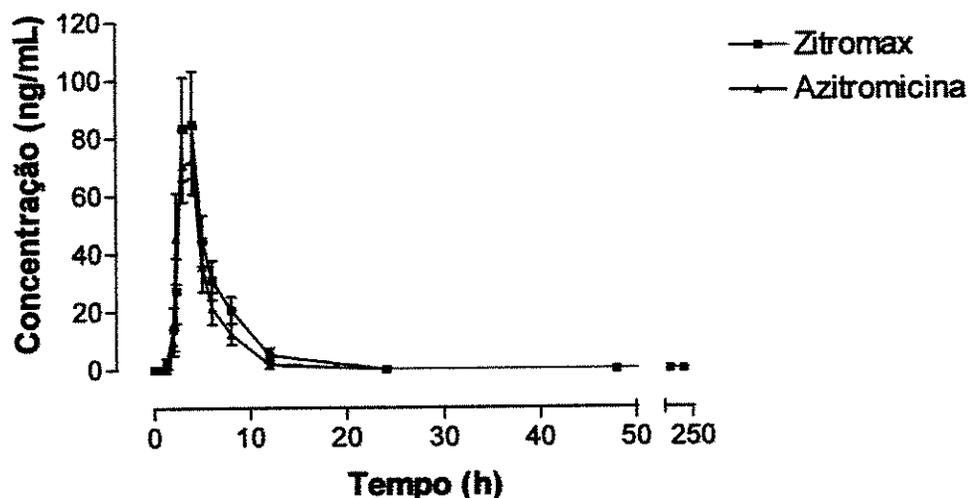
As amostras de sangue (3 ml) foram coletadas através de "butterfly" heparinizado colocado em veia antecubital cateterizada, e colocadas em tubos com anticoagulante 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8 e 12, 18, 24, 48, 96, 168 e 216h, após a administração de Azitromicina suspensão oral 200mg/5ml padrão e teste. As amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 g durante 10 min e os plasmas separados e guardados à -70 °C até serem analisados. Todas as amostras pertencentes ao mesmo voluntário foram analisadas num mesmo dia

(Figura 26). Os resultados da validação das corridas analíticas encontram-se descritas na Tabela 20.

**Tabela 20.** Validação dos lotes analisados.

Validação	Concentração Experimental (ng/mL)		
	CQB	CQM	CQA
<b>Controles</b>			
<b>Média</b>	60,89	1415,44	2454,27
<b>CV (%)</b>	11,51	7,97	6,72
<b>Exatidão (%)</b>	101,1	94,0	98,0
<b>n</b>	48	48	48

CQB= 60,0 ng/mL ; CQM= 1500,0 ng/mL ; CQA= 2700,0 ng/mL (Concentrações nominais).



**Figura 26.** Curva da concentração plasmática média ( $\pm$  EPM) de 24 voluntários vs. tempo (h) submetidos ao estudo entre Azitromicina suspensão oral 200mg/5ml (teste) e Zitromax<sup>®</sup> suspensão oral 200mg/5ml (padrão).

Na Tabela 21, estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos médios, usando um intervalo de confiança (IC) de 90% obtidos das análises das concentrações plasmáticas de 24 voluntários submetidos ao estudo ente Azitromicina-suspensão oral 200mg/5ml (Teste) e Zitromax<sup>®</sup> (Padrão). Na

randomização a droga teste foi denominada de Azitromicina e a droga padrão Zitromax<sup>®</sup>.

**Tabela 21.** Média dos parâmetros farmacocinéticos para 24 voluntários depois da administração de Azitromicina suspensão oral (200mg/5ml) e ZITROMAX<sup>®</sup> suspensão oral (200mg/5ml).

Parâmetros farmacocinéticos	AZITROMICINA	
	Azitromicina (TESTE)	Zitromax <sup>®</sup> (PADRÃO)
<b>ASC<sub>0-216h</sub> (ng*h*ml<sup>-1</sup>) Média geométrica (IC 90%)</b>	359,90 (69,14 – 650,67)	250,22 (188,20 – 312,23)
<b>ASC<sub>0-∞</sub> (ng*h*ml<sup>-1</sup>) Média geométrica (IC 90%)</b>	****	****
<b>C<sub>max</sub> (ng*ml<sup>-1</sup>) Média geométrica (IC 90%)</b>	116,11 (89,89 – 142,33)	136,40 (101,32 – 171,49)
<b>t<sub>1/2</sub> (h) Média geométrica (IC 90%)</b>	****	****
<b>T<sub>max</sub> (h) Média geométrica (IC 90%)</b>	2,61 (2,37 – 2,84)	2,53 (2,23 – 2,82)

\* Não foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos da **ASC<sub>0-∞</sub>** e **t<sub>1/2</sub>** devido à perda dos dados na extrapolação para o cálculo da constante de eliminação de alguns voluntários avaliados (n=12). No entanto, os mesmos não comprometeram os cálculos e resultados finais de **C<sub>max</sub>** e **ASC<sub>0-216h</sub>**, parâmetros estes que vão determinar a comparação e a confirmação ou não da bioequivalência entre as duas formulações em questão.

Na Tabela 22 e Tabela 23 estão apresentados os resultados da análise estatística, comparando-se as razões da  $ASC_{0-216h}$  e  $C_{max}$  e análise da diferença individual de  $T_{max}$ . (teste-referência) respectivamente, entre as formulações teste e padrão.

**Tabela 22.** Análise estatística para a razão da  $ASC_{(0-216h)}$  e  $C_{max}$  da Azitromicina suspensão oral 250mg/5ml (teste) e Zitromax® suspensão oral 250mg/5ml (PFIZER -padrão).

Razão	Análise Estatística		
	Média Geométrica	90% IC	Bioequivalente
Azitromicina teste / Zitromax®			
$ASC_{0-216h}$ % razão	98,18	(89,32-107,73)	SIM
$C_{max}$ % razão	96,73	(90,55-103,38)	SIM

**Tabela 23.** Análise da diferença individual de  $T_{max}$ . (teste-referência).

Diferença de $T_{max}$ (teste-referência)	Análise Estatística IC 90%	Valor de p
0,10	(-0,162-0,352)	0,53

Os programas utilizados para os propósitos acima descritos foram: WinNonlin™ , Versão 2.1. Programa de Bioequivalência para estudo de dois períodos Crossover, versão 1.0. Programa Microsoft Excel Versão 97. GraphPad Prism versão 2,0 e WinSTAT versão 2,01.

## **4.4. Análise da amoxicilina.**

### **4.4.1. Validação do método e resultados.**

---

Nesta etapa do estudo são apresentados os resultados da validação dos procedimentos para determinação de Amoxicilina em plasma Humano, utilizando Cefadroxil como Padrão Interno.

Os procedimentos laboratoriais utilizados para demonstrar que o método analítico é adequado e confiável para as análises propostas, são apresentados nesta seção. Os resultados obtidos durante estes procedimentos também estão documentados nesta seção. Para validação do método analítico os seguintes parâmetros foram avaliados: validação pré-estudo, sensibilidade, especificidade, linearidade, precisão e reprodutibilidade (Gordon *et al.*, 1972; Gordon & Winshell, 1970; Greenwood & Yule, 1915; Guyton, 1973; Handsfield *et al.*, 1973; Henion *et al.*, 1998).

Também estão descritos os procedimentos para definição dos parâmetros do estudo, como limite e quantificação, concentrações dos padrões e controles de qualidade e determinação da estabilidade das amostras.

#### **4.4.1.1. Validação pré-estudo.**

Para a realização destes testes, a qualidade dos padrões de referência utilizados para o preparo de soluções foi fundamental. Padrões de referência com

procedência identificável foram utilizados. A origem, o número do lote, bem como a existência ou não de um "Certificado de Análise (CA)" são descritos na tabela abaixo.

**Tabela 24.** Padrões de referência certificados.

<b>Padrão</b>	<b>Finalidade</b>	<b>Origem</b>	<b>Lote</b>	<b>CA*</b>
Amoxicilina	Analito	Padrão de referência USP	03150-3	1
Cefadroxil	Padrão interno	Bristol-Myers Squibb	9G21756	2

\*1. Padrões de referência com certificado (USP), 2. Padrões de referência obtidos comercialmente, 3. Sintetizados por laboratório de análise, 4. Fornecido pelo agente financiador.

#### 4.4.1.2. Especificidade.

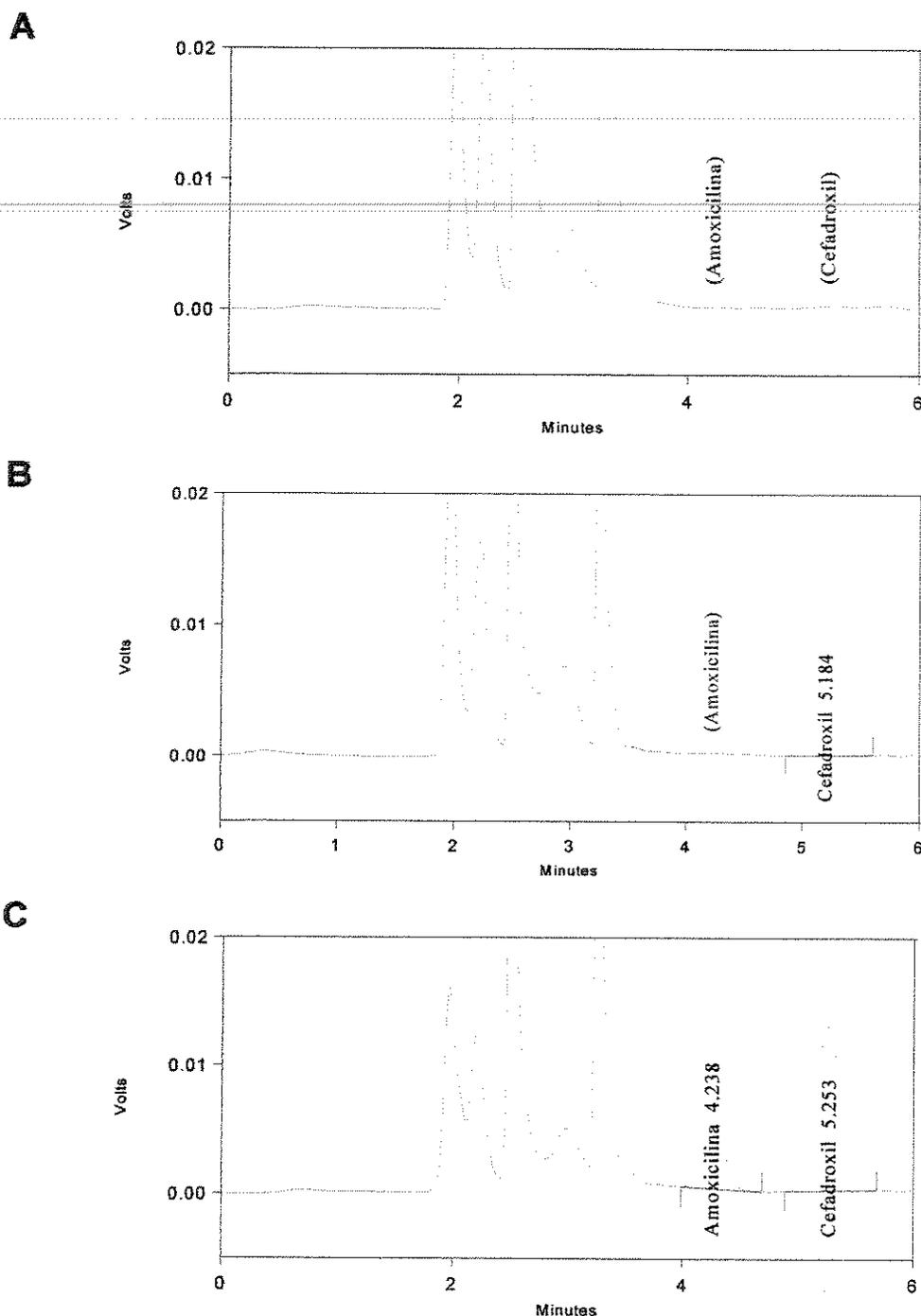
Para confirmar a especificidade do método, amostras de plasma humano foram obtidas nas seguintes condições:

**Tabela 25.** Amostras do fluido biológico (plasma).

<b>Indivíduo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Origem</b>	<b>Lote</b>
1	Plasma Humano Normal	UNIFAG	Lot-R3
2	Plasma Humano Normal	UNIFAG	Lot-R6
3	Plasma Humano Normal	UNIFAG	Lot-J001
4	Plasma Humano Normal	UNIFAG	Lot-P2
5	Plasma Humano Lipêmico	UNIFAG	Lot-S3
6	Plasma Humano Hemolizado	UNIFAG	Lot-S4

Cada amostra foi testada para avaliar interferência, utilizando os procedimentos de extração e as condições cromatográficas propostos, e comparados com aqueles obtidos com uma solução aquosa da substância a ser analisada em concentrações próximas ao LQ. Não foram encontradas

interferências nos tempos de retenção da droga ou padrão interno, como demonstrado nos cromatogramas apresentados na Figura 27.



**Figura 27.** Análise da amoxicilina **A)** plasma branco; **B)** plasma branco + padrão interno (cefadroxil 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); **C)** plasma com amoxicilina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + Padrão interno.

#### *4.4.1.3. Curva de calibração.*

Para definir a relação entre a concentração e a resposta, uma curva de calibração contendo no mínimo cinco não brancos foram preparadas. A curva de calibração foi feita no mínimo em triplicata, para a determinação de uma curva média obtida através das réplicas. Os valores específicos foram ajustados a partir de testes realizados subsequente, inclusive a primeira quantificação de amostras desejadas; tomando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista dos valores a serem encontrados.

Os itens subsequentes relatam os procedimentos realizados para determinar os parâmetros envolvidos, bem como os critérios de validação e resultados obtidos.

#### *4.4.1.4. Determinação dos Limites de quantificação e detecção.*

O limite de detecção foi definido levando-se em consideração a sensibilidade, precisão e especificidade do método. Amostras com baixa concentração, próximas ao Limite de Quantificação foram analisadas. Para avaliar a precisão e sensibilidade do método, amostras de controle de qualidade também foram incluídas no procedimento de validação. Tentou-se assegurar que os menores valores possíveis fossem analisados, por meio de repetições de análises, com valores sucessivamente menores quando os valores inicialmente escolhidos foram detectados com facilidade.

Os seguintes critérios foram seguidos para a definição deste LQ (ANVISA, 2001; CAUSON, 1997; 1985; FDA, 1998A; FDA, 1998B; FDA, 1993):

Deve ser observada a ausência de interferência nas amostras brancas, no tempo de retenção do composto a ser analisado ou uma resposta 3 vezes maior do que qualquer interferência em padrões brancos neste tempo de retenção.

~~O pico do composto analisado deverá ser identificável, definido e com uma~~ precisão de 20% em relação à concentração nominal do padrão. Precisão calculada por meio de padrões em replicata entre 80% -120%. LQ de amostra de controle de qualidade, com a mesma concentração nominal que a amostra em consideração, atingindo os critérios mencionados acima para sensibilidade e precisão.

Desta forma o LQ validado e o LD determinado, dentro destas condições na validação, foi de 1,0 µg/ml e 0,25µg/ml respectivamente.

#### *4.4.1.5. Linearidade.*

A linearidade da curva de calibração foi desenvolvida dentro dos seguintes parâmetros (ANVISA, 2001; CAUSON, 1997; 1985; FDA, 1998A; FDA, 1998B; FDA, 1993):

Desvio da concentração nominal no LQ, em pelo menos uma das replicatas  $\leq 20\%$ . Desvio da concentração dos padrões, diferentes do LQ,  $\leq 15\%$ .

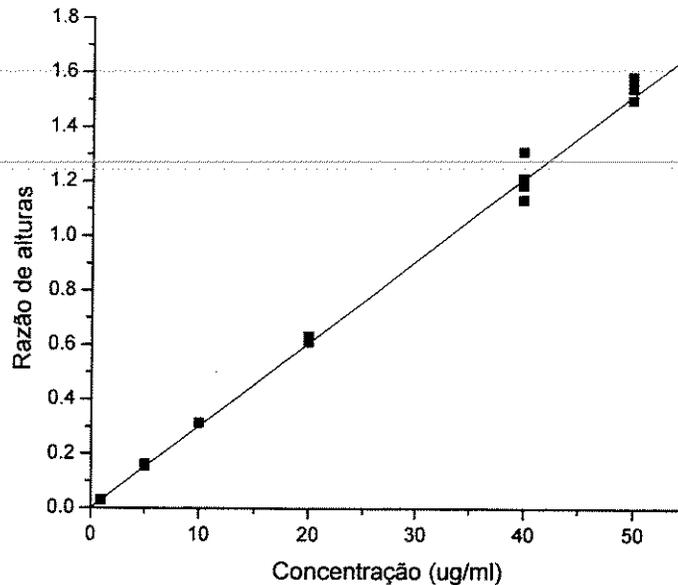
As condições anteriormente descritas devem ser atingidas em pelo menos 4 padrões diferentes de zero, incluindo o LQ como o primeiro padrão de calibração. O coeficiente de correlação da reta deve ser maior ou igual a 0,95.

Os dados detalhados da curva de calibração são apresentados na Tabela 26 e na Figura 28.

**Tabela 26.** Dados da curva de calibração obtida.

Padrão	Concentração Nominal (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Desvio padrão	Exatidão (%)	Coefficiente de variação (%)
Amoxicilina	1,0	0,96	0,024	96,39	2,53
	1,0	0,98		98,45	
	1,0	0,93		92,78	
	1,0	0,95		94,66	
Amoxicilina	5,0	5,05	0,096	101,03	1,87
	5,0	5,12		102,39	
	5,0	5,22		104,39	
	5,0	5,26		105,31	
Amoxicilina	10,0	10,21	0,008	102,16	0,08
	10,0	10,20		101,97	
	10,0	10,20		102,00	
	10,0	10,20		102,00	
Amoxicilina	20,0	20,55	0,330	102,74	1,63
	20,0	20,51		102,55	
	20,0	20,25		101,23	
	20,0	19,83		99,16	
Amoxicilina	40,0	39,47	2,425	98,67	6,15
	40,0	38,58		96,46	
	40,0	36,87		92,18	
	40,0	42,65		106,63	
Amoxicilina	50,0	48,80	1,186	97,5916	2,35
	50,0	51,62		103,24	
	50,0	50,75		101,50	
	50,0	50,17		100,34	
<b>Coefficiente de correlação</b>				<b>R=0,99967</b>	

Equação da curva média de calibração:  $y=0,0307404x + 0$ .



**Figura 28.** Curva de calibração da amoxicilina.

#### 4.4.1.6. Precisão e exatidão.

Para avaliar a precisão e exatidão do método, 3 concentrações distintas, dentro da faixa esperada de concentrações (incluindo-se LQ e concentrações dos controles de qualidade) foram analisadas, utilizando-se determinações por concentração.

A precisão e exatidão foram determinadas em um esquema diário, definindo estes parâmetros para uma corrida analítica e em um esquema de dias diferentes, o que quantifica a variabilidade entre dias, relacionada com fatores humanos, diferenças nos reagentes, etc. Nas próximas seções os procedimentos

realizados para a determinação dos parâmetros envolvidos, bem como critérios de validação e respectivos resultados são apresentados (ANVISA, 2001; CAUSON, 1997; 1985; FDA, 1998A; FDA, 1998B; FDA, 1993).

#### 4.4.1.7. Determinação das concentrações dos controles de qualidade.

Os valores específicos foram definidos baseados nos critérios apresentados abaixo e foram ajustados em testes subseqüentes, incluindo-se aí, a primeira quantificação real, levando-se em consideração a faixa antecipada de valores analíticos. As concentrações finais das amostras dos controles de qualidade foram definidas como apresentadas na Tabela 27.

**Tabela 27.** Definição dos controles de qualidade (CQ).

<b>Tipo do QC</b>	<b>Identificação do CQ</b>	<b>Definição de Faixa</b>	<b>Valor Definido (µg/mL)</b>
Amostra CQ-LQ	LQ	Menor concentração determinável com precisão e exatidão	1,0
Amostra CQ baixo	CQB	Menor ou igual 3 x LQ	3,0
Amostra CQ médio	CQM	Intermediário entre CQ elevado e baixo	25,0
Amostra CQ Alto	QCA	75-90% do padrão de calibração mais elevado ou do maior valor antecipado de concentração	40,0

#### 4.4.1.8. Validação intra-dia.

A precisão e exatidão intra-dia foram determinadas utilizando-se um lote contendo as seguintes amostras (ANVISA, 2001; CAUSON, 1997; 1985; FDA, 1998A; FDA, 1998B; FDA, 1993):

-Uma curva de calibração contendo padrões conforme definidos anteriormente;

-Cinco amostras de cada um dos CQ definidos acima.

As amostras de controle de qualidade foram obtidas a partir de uma solução previamente preparada, mas diferente da utilizada para os padrões.

Os seguintes critérios foram seguidos, para que a precisão e exatidão intra-lote fosse considerada aprovada (ANVISA, 2001; CAUSON, 1997; 1985; FDA, 1998A; FDA, 1998B; FDA, 1993):

-Precisão: para cada nível de concentração, o Coeficiente de Variação (CV) não deveria exceder 15% (Tolerância de até 20% na concentração de LQ).

-Exatidão: o valor médio das amostras, a cada nível de concentração, dentro de 15% do valor verdadeiro (Tolerância de até 20% em concentração de LQ). Os dados da validação intra-dia são apresentados na Tabela 28.

**Tabela 28.** Análise dos controles de qualidade intra-dia.

Controle de Qualidade	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrada nas amostras individuais					Validação		
						Média	CV (%)	Exatidão (%)
CQLQ	1,15	1,04	1,05	1,08	0,94	1,05	7,26	105,08
CQB	3,22	3,16	3,10	2,90	3,19	3,12	4,08	103,84
CQM	26,64	27,21	24,19	27,30	27,42	26,55	5,09	106,22
CQA	43,60	43,33	43,78	44,05	43,64	43,68	0,61	109,20

CQLQ=1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; CQB= 3,0  $\mu\text{g/mL}$ ; CQM= 25,0  $\mu\text{g/mL}$ ; CQA= 40,0  $\mu\text{g/mL}$  (Concentrações nominais).

#### 4.4.1.9. Validação inter-dias.

Os seguintes critérios foram seguidos para considerar a precisão e exatidão inter-dias aprovada (ANVISA, 2001; CAUSON, 1997; 1985; FDA, 1998A; FDA, 1998B; FDA, 1993):

-Precisão: para cada nível de concentração, um CV obtido dos valores médios de cada lote não excedendo 15% (tolerância até 20% em valores de LQ);

-Exatidão: o valor médio de cada lote, em cada nível de concentração, dentro de 15% do valor real (tolerância até 20% em valores de LQ). Os dados da validação inter-dias são apresentados na Tabela 29.

**Tabela 29.** Análise dos Controles de qualidade inter-dias.

Identificação da Amostra	Concentração Média ( $\mu\text{g/mL}$ ) de Cada Dia			Precisão e Especificidade Inter-Dia		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Exatidão (%)
CQB	3,12	2,94	3,10	3,05	3,22	101,73
CQM	26,55	25,16	24,99	25,56	3,36	102,26
CQA	43,68	41,23	39,52	41,44	5,06	103,60

CQB= 3,0  $\mu\text{g/mL}$ ; CQM= 25,0  $\mu\text{g/mL}$ ; CQA= 40,0  $\mu\text{g/mL}$  (Concentrações nominais).

#### 4.4.1.10. Recuperação.

Para o cálculo da recuperação, as alturas dos picos das soluções padrão nas concentrações correspondentes ao CQB, CQM e CQA foram comparadas às alturas dos picos dos CQs extraídos do plasma (Tabela 30).

A recuperação (R) foi calculada através da fórmula (Quattrocchi, *et al.*, 1992):

$$R = \text{Concentração obtida} \times 100 / \text{Concentração real}$$

**Tabela 30.** Análise da percentagem de recuperação dos controles de qualidade.

Identificação da Amostra	Recuperação (%)	CV (%)
CQB	90,0	4,3
CQM	98,6	2,3
CQA	95,3	3,6

CQB= 3,0 µg/mL; CQM= 25,0 µg/mL; CQA= 40,0 µg/mL (Concentrações nominais).

#### 4.5. Estudo de bioequivalência da amoxicilina cápsulas 500 mg.

O objetivo desta fase do estudo foi submeter os medicamentos teste (Amoxicilina-cápsulas 500 mg) e padrão (AMOXIL<sup>®</sup>-cápsulas 500 mg) ao estudo de bioequivalência. Na Tabela 36, estão apresentadas as médias dos parâmetros farmacocinéticos para 24 voluntários depois da administração de duas formulações de Amoxicilina (teste e padrão).

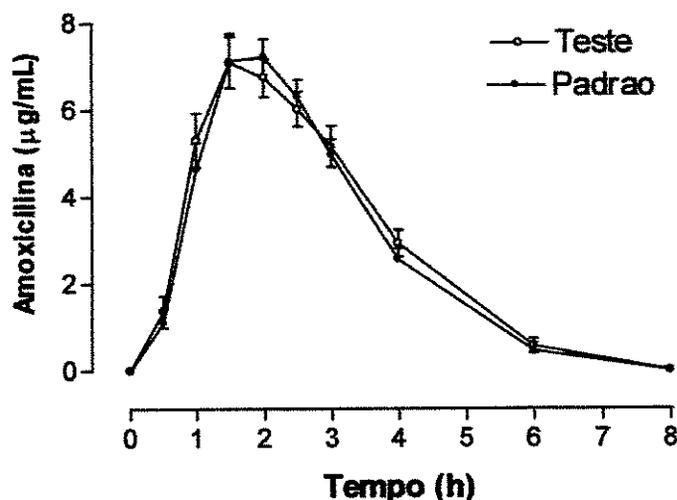
##### 4.5.1. Inventário e Retenção dos Medicamentos.

Para o estudo de bioequivalência da Amoxicilina (500 mg/cápsulas) foram adquiridas 10 caixas (10 un/cx) da formulação teste ( **Lote:AC 309 Fabricação: 03/2000 Validade:03/2002** ) e 5 caixas (21 un/cx) da Amoxil<sup>®</sup> formulação padrão (**Lote:BB0028 Fabricação: 01/2000 Validade:01/2002**). Foram administradas as formulações teste e referência (1 cápsula de 500 mg) aos voluntários (n=24) utilizando-se um total de 24 cápsulas para ambas as formulações. Posteriormente,

amostras de retenção da Amoxil® (38 cápsulas) e Amoxicilina (76 cápsulas) foram devidamente identificadas e armazenadas.

#### 4.5.2. Análise das concentrações plasmáticas de amoxicilina.

As amostras de sangue (3 ml) foram coletadas através de "butterfly" heparinizado colocado em veia antecubital cateterizada, e colocadas em tubos com anticoagulante 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8 h após a administração do Amoxicilina. As amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 g, durante 10 min e os plasmas separados e guardados à -70 °C até serem analisados. Todas as amostras pertencentes ao mesmo voluntário foram analisadas num mesmo dia (Figura 29). Os resultados da validação das corridas analíticas encontram-se descritas na Tabela 31.



**Figura 29.** Curva da concentração plasmática média ( $\pm$  EPM) de 24 voluntários vs. tempo (h) submetidos ao estudo entre amoxicilina cápsulas 500 mg (teste) e Amoxil® (padrão).

**Tabela 31.** Validação dos lotes analisados.

Validação	Concentração Experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	CQLQ	CQB	CQM	CQA
<b>Controles</b>				
<b>Média</b>	1,03	3,10	25,75	42,75
<b>CV (%)</b>	11,03	6,50	5,25	4,86
<b>Exatidão (%)</b>	102,80	103,31	103,01	106,88
<b>N</b>	46	44	41	39

CQLQ=1  $\mu\text{g/mL}$ ; CQB= 3,0  $\mu\text{g/mL}$ ; CQM= 25,0  $\mu\text{g/mL}$ ; CQA= 40,0  $\mu\text{g/mL}$  (Concentrações nominais).

Na Tabela 32, estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos médios, usando um intervalo de confiança (IC) de 90% obtidos das análises plasmáticas de 24 voluntários submetidos ao estudo ente Amoxicilina cápsulas 500 mg (Teste) e AMOXIL<sup>®</sup> cápsulas 500mg (Padrão).

**Tabela 32.** Média dos parâmetros farmacocinéticos para 24 voluntários depois da administração de Amoxicilina (500 mg) e AMOXIL<sup>®</sup> (500 mg).

Parâmetros farmacocinéticos	AMOXICILINA	
	Amoxicilina (Teste)	AMOXIL <sup>®</sup> (Padrão)
<b>ASC<sub>0-8 h</sub> (<math>\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}</math>)</b> <b>Média geométrica (IC 90%)</b>	21,76 (14,17-33,86)	20,90 (10,93-30,23)
<b>ASC<sub>0-∞</sub> (<math>\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}</math>)</b> <b>Média geométrica (IC 90%)</b>	24,32 (15,59-38,84)	23,85 (12,74-50,45)
<b>C<sub>max</sub> (<math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>)</b> <b>Média geométrica (IC 90%)</b>	8,11 (5,18-12,12)	8,15 (3,87-13,91)
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b> <b>Média geométrica (IC 90%)</b>	1,29 (0,80-3,14)	1,27 (0,60-5,22)
<b>T<sub>max</sub> (h)</b> <b>Média geométrica (IC 90%)</b>	1,73 (1,00-3,00)	1,67 (1,00-3,00)

Dois medicamentos serão considerados bioequivalentes quando IC de 90% para a razão entre as médias de  $ASC_{0-t}$  e de  $C_{max}$  estiver entre 80-125%. Na Tabela 37 estão apresentados os resultados das análises estatísticas que demonstram a bioequivalência entre as duas formulações de amoxicilina cápsulas 500 mg comparadas. Os programas utilizados para os propósitos acima descritos foram: WinNonlin™, Versão 2.1. Programa de Bioequivalência para estudo de dois períodos Crossover, versão 1.0. Programa Microsoft Excel Versão 97. GraphPad Prism versão 2,0 e WinSTAT versão 2,01.

Na Tabela 33 e Tabela 34 estão apresentados os resultados da análise estatística, comparando-se as razões da  $ASC_{0-8 h}$  e  $C_{max}$  e análise da diferença individual de  $T_{max}$ . (teste-referência) respectivamente, entre as formulações teste e padrão.

**Tabela 33.** Análise estatística para a razão da  $ASC_{(0-8h)}$  e  $C_{max}$  da Amoxicilina cápsulas 500 mg (teste) e AMOXIL® cápsulas 500 mg (padrão).

<b>AMOXI teste / AMOXIL®</b>	<b>Análise Estatística</b>		
<b>Amoxicilina</b>	<b>Média Geométrica</b>	<b>90% IC</b>	<b>Bioequivalente</b>
$ASC_{0-8 h}$ % razão	101,44	(98,36-104,44)	SIM
$C_{max}$ % razão	99,93	(95,70-103,96)	SIM

**Tabela 34.** Análise da diferença individual de  $t_{max}$  (teste-referência).

<b>Diferença de Tmax (teste-referência)</b>	<b>Análise Estatística IC 90%</b>	<b>Valor de p</b>
0,1042	(-0,1638-0,3721)	0,7321

#### 4.6. Estudo de bioequivalência da amoxicilina suspensão oral 250 mg/5mL.

O objetivo desta fase do estudo foi submeter os medicamentos teste (Amoxicilina Suspensão) e padrão (AMOXIL<sup>®</sup> Suspensão) ao estudo de bioequivalência. Na Tabela 36, estão apresentadas as médias dos parâmetros farmacocinéticos, para 24 voluntários, depois da administração de duas formulações de Amoxicilina Suspensão (teste e padrão).

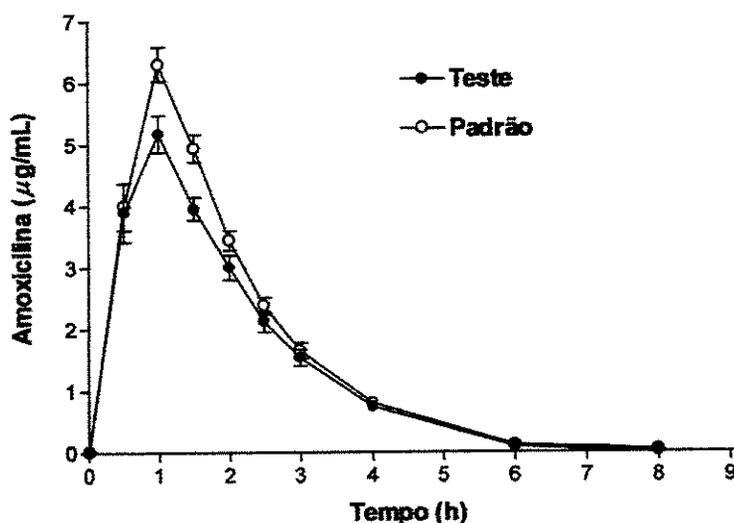
##### 4.6.1. Inventário e retenção dos medicamentos.

Para o estudo de bioequivalência da Amoxicilina Suspensão (250 mg/5mL) foram adquiridas 40 caixas ( 01 FR/150mL) da formulação teste (**Lote:**AC 583 **Fabricação:** 05/2000 **Validade:** 05/2002 ) e 12 caixas (01 FR/150mL) de Amoxil<sup>®</sup> (250mg/5mL) formulação padrão (**Lote:**BCO120 **Fabricação:** 03/2000 **Validade:**03/2002). Foram administradas as formulações teste e referência (250 mg/5mL da Suspensão) aos voluntários (n=24), utilizando-se um total de 08 Frascos para ambas as formulações. Posteriormente amostras de retenção da Amoxil<sup>®</sup> (04 Frascos/150mL) e Amoxicilina Suspensão (32 Frascos/150mL) foram devidamente identificadas e armazenadas.

##### 4.6.2. Análise das concentrações plasmáticas de amoxicilina.

As amostras de sangue (3 ml) foram coletadas através de "butterfly" heparinizado, colocado em veia antecubital cateterizada e colocadas em tubos

com anticoagulante 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8 h, após a administração de Amoxicilina. As amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 g, durante 10 min e as amostras de plasma separadas e guardadas a -70 °C até serem analisadas. Todas as amostras pertencentes ao mesmo voluntário foram analisadas num mesmo dia (Figura 30). Os resultados da validação das corridas analíticas encontram-se descritas na Tabela 35.



**Figura 30.** Curva da concentração plasmática média ( $\pm$  EPM) de 24 voluntários vs tempo (h) submetidos ao estudo entre Amoxicilina suspensão oral 250mg/5ml (teste) e Amoxil<sup>®</sup> (padrão).

**Tabela 35.** Validação dos lotes analisados.

Validação	Concentração Experimental (µg/mL)			
	CQLQ	CQB	CQM	CQA
<b>Controles</b>				
<b>Média</b>	1,02	3,17	25,58	40,29
<b>CV (%)</b>	11,17	3,08	3,59	3,29
<b>Exatidão (%)</b>	102,17	105,50	101,97	101,11
<b>n</b>	48	48	48	48

CQLQ=1 µg/mL; CQB= 3,0 µg/mL; CQM= 25,0 µg/mL; CQA= 40,0 µg/mL (Concentrações nominais).

Na Tabela 36, estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos médios, usando um intervalo de confiança (IC) de 90%, obtidos das análises plasmáticas de 24 voluntários, submetidos ao estudo entre Amoxicilina Suspensão (Teste) e AMOXIL® (Padrão).

**Tabela 36.** Média dos parâmetros farmacocinéticos para 24 voluntários depois da administração de Amoxicilina suspensão Teste (250mg/5mL) e AMOXIL® suspensão (250mg/5mL).

Parâmetros farmacocinéticos	AMOXICILINA	
	Amoxicilina (TESTE)	AMOXIL® (Padrão)
<b>ASC<sub>0-8 h</sub> (µg*h*ml<sup>-1</sup>) Média geométrica (IC 90%)</b>	11,1647 (6,6970 - 15,0358)	12,8406 (7,2760 – 18,5471)
<b>ASC<sub>0-∞</sub> (µg*h*ml<sup>-1</sup>) Média geométrica (IC 90%)</b>	12,0733 (7,3409 – 16,9138)	13,7524 (7,7019 – 23,0925)
<b>C<sub>max</sub> (µg*ml<sup>-1</sup>) Média geométrica (IC 90%)</b>	5,2421 (1,6390 – 9,4800)	6,2780 (3,9070 – 8,9320)
<b>t<sub>1/2</sub> (h) Média geométrica (IC 90%)</b>	1,0425 (0,6731 – 7,7148)	1,0873 (0,5118 – 11,2264)
<b>T<sub>max</sub> (h) Média geométrica (IC 90%)</b>	0,9372 (0,5000 – 2,000)	0,9600 (0,5000 – 2,000)

Na Tabela 37 e Tabela 38 estão apresentados os resultados da análise estatística, comparando-se as razões da ASC<sub>0-8 h</sub> e C<sub>max</sub> e análise da diferença individual de T<sub>max</sub>. (teste-referência) respectivamente, entre as formulações teste e padrão.

**Tabela 37.** Análise estatística para a razão da  $ASC_{(0-8h)}$  e  $C_{max}$  da amoxicilina suspensão (teste) e AMOXIL<sup>®</sup> suspensão (padrão).

AMOXI teste / AMOXIL <sup>®</sup>	Análise Estatística		
	Amoxicilina	Média Geométrica	90% IC
$ASC_{0-8h}$ % razão	94,46	92,01 – 97,09	SIM
$C_{max}$ % razão	88,27	84,16 – 96,35	SIM

**Tabela 38.** Análise da diferença individual de  $t_{max}$ . (teste-referência).

Diferença de Tmax (teste-referência)	Análise Estatística IC 90%	Valor de p
-0,0231	-0,1459 – 0,1409	0,1042

#### 4.7. Discussão dos resultados obtidos.

O desenvolvimento de um ensaio de bioequivalência está baseado em três momentos principais: clínico, analítico e estatístico. O primeiro consiste na elaboração de um protocolo clínico, que seja abrangente quanto aos tempos de coleta de amostras, de maneira a cobrir adequadamente o perfil farmacocinético, dentro do que é viável para os voluntários, que normalmente possuem outras atividades e colaboram com os projetos nos períodos livres. O protocolo deve ser, sobretudo, ético mostrando claramente os objetivos e os riscos aos quais os voluntários serão expostos. Esta etapa abrange também a fase na qual o voluntário permanece internado ou sob os cuidados da equipe. Nesta fase são coletadas as amostras e também é onde os eventuais efeitos indesejáveis

aparecem, tornando o acompanhamento do profissional (enfermeiro/médico) fundamental, sem omissão de qualquer informação, por menos relevante que possa parecer. Na segunda etapa, são obtidos os valores de concentração e na terceira os dados estatísticos demonstrando a bioequivalência ou não das formulações. Portanto, envolve a preparação das amostras e a determinação dos valores das drogas em estudo. A correta escolha da metodologia é fundamental, pois quanto mais sensível e específica for a metodologia, menor será a dose necessária a ser administrada ao voluntário e mais confiáveis serão os resultados (ANVISA, 2001; Causon, 1997; 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993).

Nos últimos anos, as maiores mudanças têm ocorrido na nas etapas analítica e estatística, onde estão sendo estabelecidos novos critérios estatísticos e novos processos para dosagem de drogas. Já nas fases iniciais, estão estabelecidos protocolos aceitos pela comunidade científica e pelos comitês de ética mais rigorosos. Apesar disso, as principais alterações nos protocolos dizem respeito ao número de voluntários para a realização de um ensaio clínico, atualmente de vinte e quatro. Com estes valores fica fortalecida a estatística, pois aumentando-se o número de indivíduos no protocolo, diminui-se o erro estatisticamente mensurável (ANVISA, 2001; Causon, 1997; 1985; FDA, 1998a; FDA, 1998b; FDA, 1993). O desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis e específicos para a dosagem de fármacos e seus metabólitos tem contribuído, significativamente para a realização de estudos clínicos, envolvendo comparações de aspectos farmacocinéticos entre formulações provenientes de diferentes indústrias e distintos lotes (Klink, 2000; Loo, 1998; Maurer, 1998).

O radioimunoensaio (RIA) desenvolvido no final dos anos 50 primeiramente para dosagem de insulina é muito útil e específico. Sua principal característica é a utilização de substâncias radioativas (marcadas) num processo de competição, que inicialmente se baseava apenas na reação Antígeno-Anticorpo (Ag-Ac), ou seja, apenas as moléculas capazes de gerar produção de anticorpos eram passíveis de terem seus níveis detectados por este método. Embora o método de radioimunoensaio tenha uso científico, sua principal utilização é no apoio diagnóstico, em dosagens hormonais e de outras substâncias, sendo que o surgimento de novos métodos, especialmente fluorimétricos, como quimioluminescência e enzimáticos, diminuíram sensivelmente seu mercado. Os novos métodos para determinação de substâncias são considerados de menor risco por não utilizarem material radioativo, além disso, uma vez marcado com radiação, o Kit para determinação de qualquer molécula tem um prazo para utilização (eventualmente curto), após o que, sua emissão radioativa cai, podendo comprometer os resultados. No caso da ciclosporina, é possível a dosagem até aproximadamente seis semanas depois da marcação. A melhor reprodução dos resultados em RIA foi obtida com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, pois a produção de anticorpos de vários clones (policlonal), provenientes de vários tecidos, diminui a especificidade, mostrando, muitas vezes, resultados superiores ao esperado, por se ligarem a diferentes porções da molécula e, portanto, levando a detecção do maior número possível de metabólitos. O anticorpo monoclonal, produzido por um único tipo celular, diminui muito a possibilidade de ocorrerem reações cruzadas com metabólitos (Atkinson *et al.*, 2001; Klaus & Fellner, 1973).

O maior limitador para a aplicação desta técnica é o fato de que há necessidade de compra de kits, pois desenvolver a metodologia para uma droga específica pode demandar muito tempo e dinheiro. Além disso, a maioria dos kits de boa qualidade são importados, e o procedimento para sua importação consome tempo, causando perda nos níveis de emissão de radiação e comprometendo a qualidade das dosagens (Atkinson *et al.*, 2001; Klaus & Fellner, 1973).

O ensaio biológico possui particularidades interessantes e a principal é que de fato o resultado obtido é fruto de uma avaliação farmacodinâmica, que passa a ser aplicada do ponto de vista farmacocinético, pois todos os ensaios biológicos, envolvem a ação de uma determinada droga sobre tecidos ou células. Na sua maioria, estes ensaios prestam-se para determinar a presença de receptores característicos em determinados tecidos, tornando-se experimentos clássicos e extremamente didáticos. É especialmente indicado pela OMS para determinação de um série de antibióticos, dentre eles a lincomicina, por ter uma boa correlação entre sua concentração e seu efeito sobre o microorganismo testado (Marzo & Dal Bo, 1998).

Apesar de serem de grande importância para determinar níveis de diversas moléculas, os ensaios biológicos estão sujeitos a possibilidades de terem o efeito dos metabólitos, que normalmente possuem atividade, somados aos da droga que lhes deu origem. A determinação dos metabólitos farmacologicamente ativos pode ser de importância para avaliação dos parâmetros terapêuticos, contudo numa observação mais objetiva, não serve para o composto em estudo (Marzo & Dal Bo, 1998).

Ensaio com HPLC têm sido utilizados há décadas, fazendo parte da rotina de trabalho dos laboratórios de farmacologia clínica ou de prestação de serviços, pois seu custo a médio prazo, dependendo do número de amostras dosadas, pode ser muito baixo. A versatilidade é uma das principais características deste sistema, permitindo que seja acoplado a detectores de UV, espectrômetros de massas ou outros equipamentos de detecção. Outras características que favorecem sua utilização são o fácil acesso à maioria das drogas usadas para preparação de amostras e a evolução das colunas, tornando-se cada vez mais específicas para as diversas classes de substâncias (Maurer, 1998).

Atualmente, o método mais comum para a detecção e quantificação de fármacos é o HPLC, sendo uma técnica relativamente segura, por não fazer uso de microorganismos ou material radioativo, e muito sensível para a maioria dos fármacos conhecidos (Loo, 1998).

Neste trabalho pudemos utilizar diferentes métodos com sensibilidade e seletividade adequadas para determinação de níveis circulantes de fármacos, tendo como maior preocupação encontrar as metodologias mais adequadas para determinação dos níveis circulantes de dois diferentes antibióticos.

Através da análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que os métodos desenvolvidos para a análise da azitromicina e amoxicilina em plasma humano foram completamente validados, pois cumpriam todos os critérios estabelecidos para os ensaios de estabilidade, linearidade, recuperação, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade.

As maiores vantagens do método desenvolvido para a análise da amoxicilina em plasma humano são a rapidez da análise (tempo total de corrida de

6,0 min) e a simplicidade do procedimento de extração, o que faz com que o método tenha um baixo custo e torna o procedimento desenvolvido uma boa alternativa em relação aos outros métodos descritos. A maior desvantagem do método desenvolvido para a análise da amoxicilina em plasma humano é a baixa sensibilidade (1 µg/ml) em relação aos outros métodos desenvolvidos com maior sensibilidade (50 ng/ml). Esse fato não traz prejuízo ao estudo de bioequivalência uma vez que as razões entre a  $AUC_{0-t}$  e  $AUC_{0-\infty}$  obtidas são bem inferiores a 20%.

As maiores vantagens do método desenvolvido para a análise da azitromicina em plasma humano são a rapidez da análise (tempo total de corrida de 2,0 min) e a elevada sensibilidade (20 ng/ml). A maior desvantagem do método desenvolvido para a análise da azitromicina em plasma humano é a perda de sensibilidade do espectrômetro de massas, principalmente devido ao sistema de injeção em linha de amostra, o que faz com que aumente a necessidade de limpeza do sistema de detecção. Esse sistema de injeção já foi substituído pelo z-spray, que está disponível em modelos mais recentes.

Estando os resultados dos estudos de bioequivalência em acordo com as especificações exigidas, razão entre as médias de  $ASC_{0-t}$  e  $C_{max}$  entre 80-125%, pode-se concluir que as formulações azitromicina comprimidos revestidos (teste) e Zitromax<sup>®</sup> comprimidos revestidos (padrão) e azitromicina suspensão oral (teste) e Zitromax<sup>®</sup> suspensão oral (padrão) comparadas, são bioequivalentes. Da mesma maneira, as formulações amoxicilina cápsulas (teste) e Amoxil<sup>®</sup> cápsulas (padrão) e amoxicilina suspensão oral (teste) e Amoxil<sup>®</sup> suspensão oral (padrão) comparadas, são bioequivalentes.

---

---

## ***Conclusões***

Através da análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que os métodos desenvolvidos para a análise da azitromicina e amoxicilina em plasma humano foram completamente validados, pois cumpriam todos os critérios estabelecidos para os ensaios de estabilidade, linearidade, recuperação, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade.

As melhores condições para análise cromatográfica da amoxicilina foram obtidas com a coluna Lichrosorb RP-18 10 $\mu$ m (250 x 4,0 mm), pré coluna Securityguard<sup>tm</sup> C<sub>18</sub> 10 $\mu$ m (4 x 3,0 mm), usando um fluxo de 1ml/min a uma temperatura de 27 °C. A temperatura do auto-injetor foi mantida a 23 °C, o volume de injeção em 10  $\mu$ l e a análise foi monitorada na região do ultravioleta no comprimento de onda de 229 nm. O tempo total de corrida foi ajustado para 6,0 min. Os tempos característicos de retenção da amoxicilina e cefadroxil foram 4,2 e 5,2 min, respectivamente. O método foi linear na faixa 1 a 50  $\mu$ g/ml, apresentando uma recuperação média em torno de 95 %. Os limites de quantificação e detecção observados foram 1  $\mu$ g/ml e 0,25  $\mu$ g/ml, respectivamente. A precisão e a exatidão intra-dias obtidas a partir de 3 controles de qualidade (3, 25 e 40 ng/ml) foram 4,08, 5,09 e 0,61 % e 103,84, 106,22 e 109,20 %, respectivamente. A precisão e a exatidão inter-dias obtidas a partir de 3 controles de qualidade (3, 25 e 40 ng/ml) foram 3,22, 3,36 e 5,06 % e 101,73, 102,26 e 103,60 %, respectivamente.

O estudo de bioequivalência realizado entre as formulações amoxicilina cápsulas 500 mg (teste) e Amoxil<sup>®</sup> cápsulas 500 mg (padrão) e amoxicilina suspensão oral (teste), apresentou a razão de  $ASC_{0-216} = 101,44$  com intervalo de confiança de 90 % (98,36-104,44) e razão de  $C_{max} = 99,93$  com intervalo de

confiança de 90 % (95,70-103,96). O estudo de bioequivalência realizado entre as formulações amoxicilina suspensão oral (teste) e Amoxil<sup>®</sup> suspensão oral (padrão), apresentou a razão de  $ASC_{0-216} = 94,46$  com intervalo de confiança de 90 % (94,46-97,09) e razão de  $C_{max} = 87,27$  com intervalo de confiança de 90 % (84,16-96,35).

As melhores condições para análise cromatográfica da azitromicina foram obtidas com a coluna Phenomenex Mercury MS (20,0 x 4,0 mm), pré coluna Securityguard<sup>™</sup> C<sub>18</sub> 10 $\mu$ m (4 x 2,0 mm), usando um fluxo de 0,5 ml/min a temperatura ambiente. A temperatura do auto-injetor foi mantida a 20 °C, o volume de injeção em 10  $\mu$ l. O espectrômetro de massas foi ajustado para o modo de ionização por electrospray positivo (ES+). A análise foi desenvolvida no modo MS/MS com energia do cone 40V, energia de colisão 30eV, capilar 3,5KV. Temperatura da probe 100°C. Nitrogênio como gás secante com fluxo de 40 l/h e como gás de nebulização com fluxo de 10 l/h. Como gás de colisão foi utilizado argônio a uma pressão de  $7,5 \times 10^{-4}$  mBar. Para a azitromicina foi monitorado o íon pai m/z 591 e o íon filho m/z 158. Para a eritromicina foi monitorado o íon pai m/z 576 e o íon filho m/z 158. O tempo total de corrida foi ajustado para 2,0 min. Os tempos característicos de retenção da azitromicina e eritromicina foram 0,82 e 0,85 min, respectivamente. O método foi linear na faixa 20 a 3000 ng/ml, apresentando uma recuperação média em torno de 70 %. Os limites de quantificação e detecção observados foram 20 ng/ml e 10 ng/ml, respectivamente. A precisão e a exatidão intra-dias obtidas a partir de 3 controles de qualidade (20, 60 e 2700 ng/ml) foram 8,63, 3,22 e 8,00 % e 98,62, 97, 53 e 102,20 %, respectivamente.

respectivamente. A precisão e a exatidão inter-dias obtidas a partir de 3 controles de qualidade (20, 60 e 2700 ng/ml) foram 1,22, 1,57 e 7,13 % e 99,46, 98, 02 e 97,27 %, respectivamente.

O estudo de bioequivalência realizado entre as formulações azitromicina comprimidos revestidos (teste) e Zitromax<sup>®</sup> comprimidos revestidos (padrão), apresentou a razão de  $ASC_{0-216} = 99,70$  com intervalo de confiança de 90 % (97,78-101,63) e razão de  $C_{max} = 99,65$  com intervalo de confiança de 90 % (96,72-102,63). O estudo de bioequivalência realizado entre as formulações azitromicina solução oral (teste) e Zitromax<sup>®</sup> solução oral (padrão), apresentou a razão de  $ASC_{0-216} = 98,18$  com intervalo de confiança de 90 % (89,32-107,73) e razão de  $C_{max} = 96,73$  com intervalo de confiança de 90 % (90,55-103,38).

Estando os resultados deste estudo em acordo com as especificações exigidas, razão entre as médias de  $ASC_{0-t}$  e  $C_{max}$  entre 80-125%, pode-se concluir que as formulações azitromicina comprimidos revestidos (teste) e Zitromax<sup>®</sup> comprimidos revestidos (padrão) e azitromicina suspensão oral (teste) e Zitromax<sup>®</sup> suspensão oral (padrão) comparadas, são bioequivalentes. Da mesma maneira, as formulações amoxicilina cápsulas (teste) e Amoxil<sup>®</sup> cápsulas (padrão) e amoxicilina suspensão oral (teste) e Amoxil<sup>®</sup> suspensão oral (padrão) comparadas, são bioequivalentes.

---

---

# ***Summary***

The adoption of a generic medicines politics, involving the production, the quality assurance, the prescription, the dispensation and the use of the same ones is a fundamental part of the guideline for promotion and the rational use of medicines in our Country. The promotion of the rational use of medicines is, also, one of the main guidelines provided by the World Health Organization -WHO.

To reaches that aim, it is fundamental the accomplishment of comparative pharmacokinetic studies, to verify if there exists bioequivalence between the test and the reference medicine adopted as standard by ANVISA. It becomes also necessary the development of low cost methodologies, with easy application, presenting sensibility and selectivity adequate to this type of study.

The objective of this work is the development of appropriate analytical methodology for accomplishment of four clinical pharmacology assays, determining several pharmacokinetic parameters and using them to compare two formulations of the same drug, with different origins, in each assay.

Each study will be composed by two groups of volunteers, which will be submitted to two alternated internment periods each. The volunteers will receive the two formulations of the drug in study, always respecting a period among the internments. This period will guarantee the total elimination of the drug from the first administered formulation before the administration of the next.

The assayed medicines were Amoxicilina (test), compared to Amoxil produced by SmithKline Beecham (standard) as capsules 500 mg and oral suspension 250mg/5ml formulations. The formulations of Azitromicina (test), coated tablets and oral suspension and Azitromicina-Zitromax<sup>®</sup> produced by Pfizer Ltda. (standard), were also evaluated.

The studies observed the national legislation, always following the world patterns procedures stipulated by OMS and FDA. The protocols were submitted to the appreciation of the Committee of Ethics in Research or to the corresponding organ, for approval before the execution. The pharmacokinetic parameters analyzed for evaluation of bioequivalence were  $AUC_{(0-t)}$  and  $C_{max}$ .

Through the analysis of the obtained results, it can be concluded that the methods developed for the analysis of the azithromycin and amoxicillin in human plasma were completely validated, therefore they accomplished all of the established criteria for the rehearsals of stability, linearity, recovery, precision, accuracy, sensibility and selectivity.

Being the results of this study in agreement with the demanded specifications, reason between the averages of  $ASC_{0-t}$  and  $C_{max}$  among 80-125%, it can be concluded that the formulations azitromicina coated tablets (test) and Zitromax coated tablets (standard) and azitromicina oral suspension (test) and Zitromax oral suspension (standard) compared, are bioequivalent. In the same way, the formulations amoxicilina capsules (test) and Amoxil capsules (standard) and amoxicilina oral suspension (tests) and Amoxil oral suspension (standard) compared, are bioequivalent.

---

---

## ***Referências Bibliográficas***

1. ABIFAM. Perfil mercadológico dos medicamentos genéricos. 2001.
2. ANVISA. RDC Nº 10, de 2 de janeiro de 2001.
3. ATKINSON, H. C.; BEGG, E. J.; DARLOW, B. A. Drugs in human milk; clinical pharmacokinetic considerations. **Clin Pharmacokinet**, 14:217-240, 1988.

---

4. ATKINSON, J. A.; DANIELS, C. E.; DECRICK, R. L.; GRUDZINSKAS, C. V.; MARKEY, S. P. Principles of clinical pharmacology. Academic Press, London, 2001.
5. BARR, W.; ZOLA, E. M.; CANDLER, E. L. Differential absorption of amoxicillin from the human small and large intestine. **Clin Pharmacol Ther**, 56: 279-285, 1994.
6. BENET, L. Z. Effect of route of administration and distribution on drug action. **J Pharmacokinet. Biopharm**, 6:559-585, 1978.
7. BENET, L. Z. Pharmacokinetic parameters: which are necessary to define a drug substance? **Eur J Res Dis [suppl. 134]** 65:45-61, 1984.
8. BENET, L. Z.; GALEAZZI, R. L. Noncompartmental determination of the steady-state volume of distribution. **J Pharm Sci**, 68:1971-1974, 1979.
9. BENET, L. Z.; MASSOUD, N.; GAMBERTOGLIO, J. G. Pharmacokinetic basis for drug treatment. Raven Press, New York, 1984.
10. BLUMBERG P. M., STROMINGER J. L. Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. **Bacteriol Rev** 1974; 38: 291.
11. BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução à métodos cromatográficos. 6ª ed. Campinas, Editora da UNICAMP, 1995.
12. BRIDGES, J. W. Metabolism and molecular interactions related toxicity. In, Mechanisms of cell injury: Implications for human health. (Fowler, B. A., ed.) John Wiley & Sons, Inc., New York, 1987.
13. BRODIE, P. B. Physicochemical factors in drug absorption. In, Absorption and distribution of drugs (Binns, T. B., ed.) The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1964.

14. BULL, J. P. The historical development of clinical therapeutics trials. **J. Chron. Dis.**, 10:218-48, 1959.
15. CAUSON, R. Validation of chromatographic methods. Viewpoint and discussion. **J Chromatogr B.**, 689: 175-180, 1997.
16. CHARLES, B. AND CHULAVATNATOL, S., Simple analysis of amoxicillin in plasma by high performance liquid chromatography with internal standardization and ultraviolet detection. **Biomed Chromatogr**, 7:204-7, 1993.

---

17. CHASIN, A. M.; CHASIN, M. SALVADORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev Farm Bioquim USP**, 30:41-46, 1994.
18. COLEBROOK, L. & PURDIE, A. W. treatment of 106 cases of puerperal fever by sulphanilamide. **Lancet II**, 1237-42 and 1291-94, 1937.
19. COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução à métodos cromatográficos. 6<sup>a</sup> ed. Campinas, Editora da UNICAMP, 1995.
20. DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS-DEF, 1999.
21. FERGUSSON, F. R.; DAVEY, A. F.; TOPLEY, W. W. C. The value of mixed vaccines in the prevention of the common cold. **J Hyg**, 26:98-109, 1927.
22. FINK, G. D. In: (Brody, T. M.; Larner, J.; Minneman, K. P., eds.) – Human pharmacology molecular to clinical, Mosby, St. Louis, MO, 1988.
23. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-Bioavailability and bioequivalence requirements. **Fed Regist**, 320:154-173, 1985.
24. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-Bioavailability and bioequivalence requirements; abbreviated applications; proposed revisions-FDA. Proposed rule. **Fed Regist**, 63:64222-64228, 1998a.
25. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-Guidance for industry, bioanalytical methods validation for human studies-[www.fda.gov/cder/guidance/1221dft.pdf](http://www.fda.gov/cder/guidance/1221dft.pdf), 1998b.
26. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-In vivo bioequivalence guidances. **Pharmacopeial Forum**, 19:6501-6508, 1993.

27. FOUDA, H. G.; SCHNEIDER, R. P. Quantitative determination of the antibiotic azithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography (HPLC)-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: correlation with a standard HPLC-electrochemical method. **Ther Drug Monit**, 17 (2):179-83, 1995.
28. GOLDSTEIN, A.; ARONOW, L.; KALMAN, S. M. Principles of drug action: The basis of pharmacology, 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1974.
29. GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica, 6<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991.
30. GORDON, R. C.; GAMEY, C.; KIRBY, W.M.M. Comparative clinical pharmacology of amoxicillin and ampicillin administered orally. **Antimicrob Agents Chemother**, 1:504-07, 1972.
31. GORDON, R. C.; WINSHELL, E. B. Pharmacological studies of 6 [D(-)-amino-p-hydroxyphenylacetamidol] penicillanic acid in humans. **Antimicrob Agents Chemother**, 1:423-26, 1970.
32. GREENWOOD, M. & YULE, G. U. The statistics of anti-typhoid and anti-cholera inoculations and interpretation of such statistics in general. **Proc R Soc Med**, 8:113-94, 1915.
33. GUYTON, A. C. Tratado de Fisiologia Médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4<sup>a</sup> ed., 1973.
34. HANDSFIELD, H. H.; CLARK H.; WALLACE, J. F.; HOLMES, K. K.; TURCK, M. Amoxicillin, a new penicillin antibiotic. **Antimicrob Agents Chem**, 3:262-265, 1973.
35. HENION, J.; BREWER, E.; RULE, G. Sample preparation for LC/MS/MS: analyzing biological and environmental samples. **Anal Chem**, 70:650-656, 1998.
36. HOIZEY, G.; LAMIABLE, D.; FRANCES, C.; TRENQUE, T.; KALTENBACH, M.; DENIS, J.; MILLART, H., Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection. **J Pharm Biomed Anal**, 30:661-6, 2002.
37. HOLMES, O. W. Currents and counter currents in medical science. In *Works*, vol 9, p. 185, 1891.

38. IDSΦE, O.; GUTHE, T.; WILLCOX, R. R.; AND DE WECK, A.L. Nature and extente of penicillin side-reactions, with particular references to fatalities from anaphylactic shock. **Bull WHO**, 38:159-188, 1968.
39. KEES, F.; SPANGLER, S.; WELLENHOFER, M. Determination of macrolides inbiological matrices by high performance chromatography with electrochemical detection. **J Chromatogr A**, 812:287-293, 1988.
- 
40. KLAUS, M. V., AND FELLNER, M. J. Penicilloyl-specific serum antibodies in man. Analysis in 592 individuals from the newborn to old age. **J Gerontol**, 28:312-316, 1973.
- 
41. KLINK, F. New sample preparation approaches to biological matrices for LC-MS. **LC-CG Europe**, 6:396-409, 2000.
42. KLOTZ, U.; AVANT, G. R.; HOUYUMPA, A.; SCHENKER, S.; WILKINSON, G. R. The effects of age and liver descase on the disposition and elimination of diazepam in adult man. **J Clin Invest**, 55:347-359, 1975.
43. KOSMIDIS, P.; WILLIAMS, J. D. ANDREWS, J. Amoxicillin - pharmacology, bacteriology and clinical studies. **Br J Clin Pract**, 26:341-46, 1972.
44. KRAUWINKEL, W. J.; VOLKERS-KAMERMANS, N. J.; VAN ZIJTVELD, J., Determination of amoxicillin in human plasma by high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. **J Chromatogr**, 617:334-8, 1993.
45. LIND, J. A treatise of the scurvy. Edinburgh: Sands Murray & Cochcran (eds), 1753.
46. LOO, J. A. Bioanalytical mass spectrometry: many flavors to choose. **Bioconjugate Chem**, 6:644-665, 1998.
47. LOPEZ, B. Microbiologic diagnosis of *Helicobacter pylori* and its resistance to antibiotics. **Rev Clin Esp**, 1:402-3, 1997.
48. LOUIS, P. C. A. Essay on clinical instruction. London: S. Highley (ed), 1834.

49. MARSCHER, H.; KIKUTA, C., Determination of amoxicillin in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence after on-line oxidation. **J Chromatogr A**, 506: 417-421, 1990.
50. MARZO, A.; DAL BO, L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotics classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. **J Chromatogr A**, 812:17-34, 1998.
- 
51. MAURER, H. H. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. **J Chromatogr B**, 713:3-25, 1998.
- 
52. MICHETTI, G. Community-acquired pneumonia: is there difference in etiology between hospitalized and out-patients? **Minerva Med**, 86(9):341-351, 1995.
53. MIYAZAKI K, OHTANI K, SUNADA K, ARITA T. Determination of ampicillin, amoxicillin, cephalexin, and cephadrine in plasma by high-performance liquid chromatography using fluorometric detection. **J Chromatogr**, 276:478-82, 1983.
54. MORRINSON, R. T.; BOYD, R. N. Química orgânica. 9ª ed. Lisboa, Fundação Cloustre Gulbenkian, 1990.
55. MUTH, P.; METZ, R.; BECK, H.; BOLTEN, W. W.; VERGIN, H., Improved high-performance liquid chromatographic determination of amoxicillin in human plasma by means of column switching. **J Chromatogr A**, 729:259-266, 1996.
56. NEBERT, D. W., GOZALEZ, F. J. P<sub>450</sub> genes: structure, evolution and regulation. **Annu Rev Biochem**, 56:945-993, 1987.
57. NEU, H. C.; WINSHELL, E. B. Pharmacological studies of 6 [D(-)-amino-p-hydroxyphenylacetamidol] penicillanic acid in humans. **Antimicrob Ag Chemoter**, 1:423-26, 1970.
58. NEU, H. C. Antimicrobial activity and human pharmacology of amoxicillin. **J Infect Dis**, [suppl. 129]:S123-S131, 1974.
59. NEU, H. C. Amoxicilin. **Ann Intern Med**, 90:356-360, 1979.
60. P. R. VADE MÉCUM, 1999.

61. PAGE, C.; CURTIS, M.; SUTTER, M.; WALKER, M. HOFFMAN, B. Integrated pharmacology. Mosby, Edinburgh, 2002.
62. PAINTAUD, G.; ALVÁN, G.; DAHL, M. L.; GRAHNÉN, A.; SJÖVALL, J.; SVENSON, J. O. Nonlinearity of amoxicillin absorption kinetics in human. **Eur J Clin Pharmacol**, 43:283-288, 1992.
63. PHYSICIANS' DESK REFERENCE PRODUCT INFORMATION-PDR, 1999.
- 
64. PRESCOTT, L. F., NIMMO, W. S. Drug absorption. ADIS Press, New York, 1981.
65. QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. A.; LABA, R. F. Introducción a la HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires, Artes Gráficas Farro, 1992.
66. RIBEIRO, A. N. F. Medicamentos Genéricos - Informações para Farmacêuticos ou profissionais da Saúde. Maio, 2000.
67. RIDOUT, G.; SANTUS, G. C.; GUY, R. H. Pharmacokinetic considerations in the use of new transdermal formulations. **Clin Pharmacokinet**, 15:114-131, 1988.
68. ROBERTS, M. S.; DONALDSON, J. D.; ROWLAND, M. Models of hepatic elimination: Comparison of stochastic models to describe residence time distributions and to predict the influence of drug distribution, enzyme heterogeneity, and systemic recycling on hepatic elimination. **J Pharmacokinetic Biopharm**, 16:41-83, 1988.
69. SHORGET, L.; ANDREW, B. C. Pharmacokinetics. 6<sup>a</sup> ed. Norwalk, Connecticut, 1991.
70. SOURGENS, H.; STEINBREDE, H.; VERSCHOOR, J. S.; BERTOLA, M. A.; RAYER, B., Bioequivalence study of a novel Solutab tablet formulation of amoxicillin/clavulanic acid versus the originator film-coated tablet. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 39:75-82, 2001.
71. SIMON, C.; STILLE, W. Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis. Schattauer; Stuttgart, New York, 48-50, 1985.
72. SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid-mosaic model of the structure of membranes. **Science**, 175:720-731, 1972.

73. SORIANO, F. Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium species* and other non-spore-forming Gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. **Antimicrob Ag Chemother**, 39(1):208-214, 1995.
74. SUTHERLAND, R.; ROLINSON, G. N. Amino-p-hydroxybenzil penicillin (BRL 2333), a new semi synthetic penicillin: in vitro evaluation. **Antimicrob Ag Chemother**, 1:411, 1970.
75. SUTTON, H. G. Cases of rheumatic fever treated for the most part by mint water. **Guy's Hosp Rep**, 2:392, 1865.
76. TOMASZ, A. From penicillin-binding proteins to the lysis and death of bacteria. A 1979 review. **Rev Infect Dis**, 1:434, 1979a.
77. TOMASZ, A. The mechanism of irreversible antimicrobial effect of penicillins: how the beta lactam antibiotics kill and lyse bacteria. **Ann Rev Microbiol**, 33:113, 1979b.
78. TORANO, J. S.; GUCHELAAR, H. J. Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and fluorescence detection. **J Chromatog B**, 720:89-97, 1998.
79. VERHOEST, P. Use of an experimental *Chlamydia trachomatis* salpingitis model for evaluating the effectiveness of antibiotics and anti-inflammatory agents on fertility. **J Gynecol Obstet Biol Reprod**, (Paris), 26(3):309-314, 1997.
80. WAXMAN, D. J.; STROMINGER, J. L.; Penicillin-binding proteins and the mechanisms of action of beta-lactam antibiotics. **Annu Rev Biochem**, 52:825, 1983.
81. WIBAWA, J. I.; FOWKES, D.; SHAW, P. N.; BARRETT, D. A., Measurement of amoxicillin in plasma and gastric samples using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **J Chromatogr B**, 774:141-8, 2002.
82. YUAN, Z.; RUSSELL, H. Q.; CANAFAX, D. M., Sensitive assay for measuring amoxicillin in human plasma and middle ear fluid using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B**, 674:93-9, 1995.

---

---

***Anexo***

**Estudo de bioequivalência da amoxicilina cápsulas  
500mg teste e amoxicilina cápsulas 500mg SmithKline  
Beecham (Amoxil®)**

*Responsável: Dr. José Pedrazzoli Júnior  
R.G. 7.631.665 - C.P.F. 059.163.468/67  
Av. São Francisco de Assis, 218 fone 7844 8024  
Bragança Paulista - SP*

**Termo de consentimento**

abaixo-assinado(a), residente à Rua

\_\_\_\_\_, na cidade de

\_\_\_\_\_,  
portador(a) da carteira de identidade RG  
\_\_\_\_\_, nascido(a) aos

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando, como voluntário(a), do projeto de pesquisa supra-citado, de responsabilidade do médico José Pedrazzoli Júnior, da Universidade São Francisco e está ciente de que:

i - O objetivo da pesquisa é verificar se a droga amoxicilina triidratada cápsulas 500 mg, um antibiótico teste é bioequivalente à produzida pela SmithKline Beecham.

ii - Durante o estudo, deverá permanecer dois períodos de 24 horas internado no HUSF, com intervalo de pelo menos 7 dias. Nestas ocasiões será administrado 1 cápsula de 500 mg de amoxicilina teste ou SmithKline Beecham por via oral e coletadas várias amostras de sangue em cada período.

iii - A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.

iv - A administração oral de amoxicilina poderá causar efeitos colaterais como grosseiro, urticária, náuseas, diarreia, alterações de provas de lesão hepática, cefaléia, vertigens sendo que, em casos raros, reações adversas severas têm sido descritas. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações idiossincráticas imprevisíveis.

v - Será submetido(a), antes e após os dois períodos do estudo, aos seguintes exames laboratoriais: hemograma, transaminases, fosfatase alcalina, bilirrubina total, proteínas totais, uréia, creatinina, glicemia, urina rotina e protoparasitológico. As voluntárias do sexo feminino serão também submetidas à determinação dos níveis sanguíneos de Beta HCG para descartar a possibilidade de gravidez.

vi - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre sua 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 contraindicada por motivo médico.

viii - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Universidade São Francisco.

ix - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo sendo certo que a Universidade São Francisco não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

x - Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto Socorro do HUSF e solicitar que o mesmo contate o médico responsável pelo ensaio clínico.

xi - Poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico (fone 7844-8388).

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

xiii - As despesas decorrentes de sua participação no presente estudo serão ressarcidas pela quantia de R\$ 250,00 (duzentos e cinquenta reais), paga em uma única vez.

xiv - Durante e até 11 meses após a realização deste estudo estará coberto(a) por um seguro, em relação a eventuais efeitos adversos que possam, comprovadamente, ter se originado da administração da ampicilina.

xv. A coleta de sangue, em uma única veia, com a permanência de um cateter por tempo prolongado, pode levar à uma inflamação da mesma (tromboflebite) com dor e inchaço locais.

xvi - Poderá contatar o responsável pelo estudo, sempre que

necessário pelo telefone 7844-8024

xvii – Este estudo está sendo patrocinado pela Indústria Farmacêutica.

Bragança Paulista, de de 2001

---

Voluntário(a)	Dr. José Pedrazzoli Júnior
---------------	----------------------------

---

**Estudo de bioequivalência da amoxicilina suspensão oral  
250mg/5ml teste e amoxicilina suspensão oral 250mg/5ml  
SmithKline Beecham (Amoxil®)**

*Responsável: Dr. José Pedrazzoli Júnior  
R.G. 7.631.665 - C.P.F. 059.163.468/67  
Av. São Francisco de Assis, 218 fone 7844 8024  
Bragança Paulista - SP*

**Termo de consentimento**

abaixo-assinado(a), residente à Rua

\_\_\_\_\_, na cidade de

portador(a) da carteira de identidade RG  
nascido(a) aos

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ declara que é de livre e espontânea vontade  
que está participando, como voluntário(a), do projeto de pesquisa  
supra-citado, de responsabilidade do médico José Pedrazzoli Júnior,  
da Universidade São Francisco e está ciente de que:

i - O objetivo da pesquisa é verificar se a droga amoxicilina triidratada suspensão 250 mg/5ml, um antibiótico teste é bioequivalente à produzida pela SmithKline Beecham.

ii - Durante o estudo, deverá permanecer dois períodos de 24 horas internado no HUSF, com intervalo de pelo menos 7 dias. Nestas ocasiões será administrado 10ml da suspensão oral 250 mg/5 ml de amoxicilina teste ou SmithKline Beecham por via oral e coletadas várias amostras de sangue em cada período.

iii - A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.

iv - A administração oral de amoxicilina poderá causar efeitos colaterais como grosseiro, urticária, náuseas, diarreia, alterações de provas de lesão hepática, cefaléia, vertigens sendo que, em casos raros, reações adversas severas têm sido descritas. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações idiossincráticas imprevisíveis.

v - Será submetido(a), antes e após os dois períodos do estudo, aos seguintes exames laboratoriais: hemograma, transaminases, fosfatase alcalina, bilirrubina total, proteínas totais, uréia, creatinina, glicemia, urina rotina e protoparasitológico. As voluntárias do sexo feminino serão também submetidas à determinação dos níveis sanguíneos de Beta HCG para descartar a possibilidade de gravidez.

vi - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre sua 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 contraindicada por motivo médico.

viii - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Universidade São Francisco.

ix - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo sendo certo que a Universidade São Francisco não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

x - Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto Socorro do HUSF e solicitar que o mesmo contate o médico responsável pelo ensaio clínico.

xi - Poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico (fone 7844-8388).

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

xiii - As despesas decorrentes de sua participação no presente estudo ser-lhe-ão ressarcidas pela quantia de R\$ 250,00 (duzentos e cinquenta reais), paga em uma única vez.

xiv - Durante e até 11 meses após a realização deste estudo estará coberto(a) por um seguro, em relação a eventuais efeitos adversos que possam, comprovadamente, ter se originado da administração da ampicilina.

xv. A coleta de sangue, em uma única veia, com a permanência de um cateter por tempo prolongado, pode levar à uma inflamação da mesma (tromboflebite) com dor e inchaço locais.

xvi - Poderá contatar o responsável pelo estudo, sempre que necessário pelo telefone 7844-8024

xvii - Este estudo está sendo patrocinado pela Industria Farmacêutica.

Bragança Paulista, de de 2001

---

Voluntário(a)	Dr. José Pedrazzoli Júnior
---------------	----------------------------

---

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**TÍTULO: Estudo de bioequivalência de duas formulações de Azitromicina (comprimidos revestidos de 500 mg ) teste versus Laboratório Pfizer Ltda. em voluntários sadios**

CÓDIGO DO VOLUNTÁRIO: \_\_\_\_\_

**Você está sendo convidado para participar de um protocolo de pesquisa clínica, a ser realizado no Hospital Avicenna, em São Paulo. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.**

1. O objetivo da pesquisa é verificar se os comprimidos revestidos de 500 mg de azitromicina (Teste) atingem níveis plasmáticos equivalentes a 500 mg de azitromicina do laboratório inovador (Pfizer Ltda.).
2. Com a finalidade de avaliar o seu estado de saúde atual, será realizada uma consulta médica e diversos exames laboratoriais serão pedidos, antes da primeira internação. Na consulta será feito a anamnese (conversa com o médico da equipe de investigação) e o exame físico completo. Os exames (coletas de amostras de sangue) pedidos serão:
3. -Hemograma completo (hemoglobina, hematócrito - verificam possível situação de anemia, contagem total e diferencial de leucócitos - avalia possível situação de infecção, velocidade de hemossedimentação – avalia atividade inflamatória e contagem de plaquetas- avalia possíveis riscos de sangramentos), uréia, creatinina - avaliam função renal, bilirrubina total, gama GT, proteínas totais, albumina - avaliam função hepática, glicemia de jejum - avalia risco de diabetes, fosfatase alcalina, TGO e TGP (transaminases hepáticas) - avaliam anatomia do fígado, colesterol, triglicerídeos - avaliam a gordura no sangue, ácido úrico, e beta-HCG (para as mulheres) - como teste de gravidez.
4. -Exames sorológicos para hepatite B, C e HIV - avaliam se existe infecção pelos vírus citados, sendo colhidos de uma veia de um dos braços, num total de 15 ml. Pode ocorrer no local da punção um coágulo (arroxamento no local) com discreta dor, que com ou sem pomadas específicas desaparecem em poucos dias, sem deixar nenhuma alteração.
5. -Urinálise: densidade, pH, albumina, glicose, corpos cetônicos e exame microscópico do sedimento (para detecção de: leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cristais e bactérias)- avaliam se há infecção ou uma inflamação da bexiga e/ou vias urinárias. Para esta coleta é necessária uma limpeza no local e uma amostra da urina (jato médio) de 3-5 ml. Não apresenta nenhum risco.
6. -Eletrocardiograma - para avaliar atividade cardíaca (também não apresenta nenhum risco).
7. Estes exames serão novamente colhidos no final da segunda internação para controle. Os resultados lhe serão fornecidos. Vão ser processados pelo Laboratório Ehrlich, por uma equipe especializada.
8. Durante o estudo, será internado duas vezes por 24 horas cada período, com intervalo de 21 dias. Nas duas ocasiões da internação, será administrada pela boca 500 mg de azitromicina na forma de comprimidos revestidos, e coletadas amostras de sangue (8 ml) de uma veia de um dos braços antes da administração; 30 min; 1 h; 1,30; 2; 2,30; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 96; 168 e 336 horas após, para a dosagem plasmática de azitromicina. No dia marcado para o projeto de pesquisa o voluntário será assistido por uma auxiliar de enfermagem, uma enfermeira e um médico da equipe de pesquisa.
9. **Após o término do estudo, muitos pacientes se beneficiarão destes dados. A participação neste estudo não tem objetivo de se submeter a um tratamento terapêutico.**

10. A administração oral de azitromicina é geralmente bem tolerada, apresentando baixa incidência de reações adversas, sendo a maioria dos efeitos observados de natureza leve a moderada. A maioria destes foi de origem gastrointestinal: diarreia (fezes amolecidas ou aumento do número de evacuações por dia), desconforto abdominal (dor/cólica), náuseas, vômitos e flatulência (gases). Em doses maiores, com a utilização por períodos mais prolongados, pode ocorrer a diminuição reversível da audição (que volta ao normal), elevações reversíveis nas transaminases hepáticas (alterações do fígado) podendo levar a icterícia (cor amarela da pele e dos olhos), episódios transitórios de leve redução nas contagens de neutrófilos (diminuição dos glóbulos brancos que são importantes para nossa defesa corpórea), embora uma relação que a azitromicina cause este problema ainda não tenha sido estabelecida, podem ocorrer também reações alérgicas com rash cutâneo (vermelhidão pelo corpo), raramente angioedema (inchaço em garganta) e anafilaxia (choque). Muito raramente pode ocorrer colite pseudomembranosa (diarreia grave). Caso qualquer destes sintomas ou outros ocorram, o médico que o acompanha deverá ser informado e proceder à conduta mais adequada; Algumas destas reações observadas com o uso da azitromicina resultaram em sintomas recorrentes e necessitaram um maior período de observação de tratamento. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.
11. Você será informado de qualquer alteração no estudo ou de qualquer nova observação relativa a esta pesquisa.
12. Você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha a interferir no seu atendimento médico nesta situação.
13. A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe médica pesquisadora.
14. Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de pronto atendimento médico mais próximo a sua residência e/ou Hospital Avicenna e contatar os médicos responsáveis pelo ensaio clínico, nos telefones abaixo.
15. Foi feito um seguro médico de responsabilidade civil profissional com a Rural Seguradora (apólice N° 02513097-0001), a qual garante uma maior segurança para os voluntários, cuja validade é de 1 ano a partir da data do estudo clínico.
16. De acordo com valores previamente estabelecidos, os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo dispendidos na realização deste estudo clínico, com o valor de R\$ 400,00 (quatrocentos reais), que receberão após a realização dos exames de controle laboratoriais e exame físico final feito pelo médico.
17. É condição indispensável às voluntárias do sexo feminino que participarão do ensaio clínico que não estejam grávidas, comprovada pela sorologia beta-HCG.
18. Todos os dados desta participação neste estudo serão documentados e mantidos confidencialmente, não identificando o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos; estes serão disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais da Patrocinadora envolvidos neste estudo.
19. Caso tenha qualquer dúvida ou perguntas relativas a este ensaio ou aos seus direitos, no que diz respeito a esta participação, ou se quiser relatar alguma reação adversa, favor contatar o médicos investigadores, que acompanham o ensaio, Dra. Elisa Guelere Paris, membro da Sociedade Brasileira dos Profissionais em Pesquisa Clínica, presidente da Comissão de

Ética em Pesquisa do Hospital Avicena e médica do Hospital Avicena, no telefone (0XX11- 295- 3324) e Prof. Dr. José Pedrazzoli Junior , da Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco em Bragança Paulista-SP, no telefone (0XX19- 241- 5425).

20. Se houver alguma dúvida quanto à medicação, posso entrar em contato com o representante do patrocinador responsável, o gerente médico sênior da empresa patrocinadora.
21. Fico com a cópia deste documento para agilizar este contato, caso se faça necessário.
22. EU CONCORDO EM SEGUIR AS INSTRUÇÕES DAS PESSOAS CONDUZINDO ESTE ESTUDO, DE FORMA A OBTER O MÁXIMO DE BENEFÍCIOS DA ATENÇÃO MÉDICA OFERECIDA POR ESTA PESQUISA, ACREDITANDO NA SERIEDADE E IMPORTÂNCIA DESTE ESTUDO TANTO POR PARTE DOS INVESTIGADORES QUANTO DOS PATROCINADORES.

Nome do(a) voluntário (legível): \_\_\_\_\_

Assinatura do voluntário: \_\_\_\_\_

Nome legível do investigador: \_\_\_\_\_

Assinatura do investigador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Instituição/local/ fone: \_\_\_\_\_

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**TÍTULO: Estudo de bioequivalência de duas formulações de Azitromicina ( suspensão oral 200 mg / 5 ml ) teste versus Laboratório Pfizer Ltda. em voluntários sadios**

CÓDIGO DO VOLUNTÁRIO: \_ \_ \_ \_

**Você está sendo convidado para participar de um protocolo de pesquisa clínica, a ser realizado no Hospital Avicenna, em São Paulo. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.**

1. O objetivo da pesquisa é verificar se a suspensão oral contendo 200 mg de azitromicina em 5 ml (Teste) atinge níveis plasmáticos equivalentes à suspensão oral contendo 200 mg de azitromicina em 5 ml do laboratório inovador (Pfizer Ltda.).
2. Com a finalidade de avaliar o seu estado de saúde atual, será realizada uma consulta médica e diversos exames laboratoriais serão pedidos, antes da primeira internação. Na consulta será feito a anamnese (conversa com o médico da equipe de investigação) e o exame físico completo. Os exames (coletas de amostras de sangue) pedidos serão:
3. -Hemograma completo (hemoglobina, hematócrito - verificam possível situação de anemia, contagem total e diferencial de leucócitos - avalia possível situação de infecção, velocidade de hemossedimentação – avalia atividade inflamatória e contagem de plaquetas- avalia possíveis riscos de sangramentos), uréia, creatinina - avaliam função renal, bilirrubina total, gama GT, proteínas totais, albumina - avaliam função hepática, glicemia de jejum - avalia risco de diabetes, fosfatase alcalina, TGO e TGP (transaminases hepáticas) - avaliam anatomia do fígado, colesterol, triglicerídeos - avaliam a gordura no sangue, ácido úrico, e beta-HCG (para as mulheres) - como teste de gravidez.
4. -Exames sorológicos para hepatite B, C e HIV - avaliam se existe infecção pelos vírus citados, sendo colhidos de uma veia de um dos braços, num total de 15 ml. Pode ocorrer no local da punção um coágulo (arroxamento no local) com discreta dor, que com ou sem pomadas específicas desaparecem em poucos dias, sem deixar nenhuma alteração.
5. -Urinálise: densidade, pH, albumina, glicose, corpos cetônicos e exame microscópico do sedimento (para detecção de: leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cristais e bactérias)- avaliam se há infecção ou uma inflamação da bexiga e/ou vias urinárias. Para esta coleta é necessária uma limpeza no local e uma amostra da urina (jato médio) de 3-5 ml. Não apresenta nenhum risco.
6. -Eletrocardiograma - para avaliar atividade cardíaca (também não apresenta nenhum risco).
7. Estes exames serão novamente colhidos no final da segunda internação para controle. Os resultados lhe serão fornecidos. Vão ser processados pelo Laboratório Ehrlich, por uma equipe especializada.
8. Durante o estudo, será internado duas vezes por 24 horas cada período, com intervalo de 21 dias. Nas duas ocasiões da internação, será administrada pela boca 200 mg de azitromicina na forma de suspensão oral ( 5 ml ) e coletadas amostras de sangue (8 ml) de uma veia de um dos braços antes da administração; 30 min; 1 h; 1,30; 2; 2,30; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 96; 168 e 216 horas após, para a dosagem plasmática de azitromicina. No dia marcado para

o projeto de pesquisa o voluntário será assistido por uma auxiliar de enfermagem, uma enfermeira e um médico da equipe de pesquisa.

9. **Após o término do estudo, muitos pacientes se beneficiarão destes dados.** A participação neste estudo não tem objetivo de se submeter a um tratamento terapêutico.
10. A administração oral de azitromicina é geralmente bem tolerada, apresentando baixa incidência de reações adversas, sendo a maioria dos efeitos observados de natureza leve a moderada. A maioria destes foi de origem gastrointestinal: diarreia (fezes amolecidas ou aumento do número de evacuações por dia), desconforto abdominal (dor/cólica), náuseas, vômitos e flatulência (gases). Em doses maiores, com a utilização por períodos mais prolongados, pode ocorrer a diminuição reversível da audição (que volta ao normal), elevações reversíveis nas transaminases hepáticas (alterações do fígado) podendo levar a icterícia (cor amarela da pele e dos olhos), episódios transitórios de leve redução nas contagens de neutrófilos (diminuição dos glóbulos brancos que são importantes para nossa defesa corpórea), embora uma relação que a azitromicina cause este problema ainda não tenha sido estabelecida, podem ocorrer também reações alérgicas com rush cutâneo (vermelhidão pelo corpo), raramente angioedema (inchaço em garganta) e anafilaxia (choque). Muito raramente pode ocorrer colite pseudomembranosa (diarreia grave). Caso qualquer destes sintomas ou outros ocorram, o médico que o acompanha deverá ser informado e proceder à conduta mais adequada. Algumas destas reações observadas com o uso da azitromicina resultaram em sintomas recorrentes e necessitaram um maior período de observação de tratamento. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.
11. Você será informado de qualquer alteração no estudo ou de qualquer nova observação relativa a esta pesquisa.
12. Você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha a interferir no seu atendimento médico nesta situação.
13. A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe médica pesquisadora.
14. Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de pronto atendimento médico mais próximo a sua residência e/ou Hospital Avicenna e contatar os médicos responsáveis pelo ensaio clínico, nos telefones abaixo.
15. Foi feito um seguro médico de responsabilidade civil profissional com a Rural Seguradora (apólice N° 02513097-0001), a qual garante uma maior segurança para os voluntários, cuja validade é de 1 ano a partir da data do estudo clínico.
16. De acordo com valores previamente estabelecidos, os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo dispendidos na realização deste estudo clínico, com o valor de R\$ 400,00 (quatrocentos reais), que receberão após a realização dos exames de controle laboratoriais e exame físico final feito pelo médico.
17. É condição indispensável às voluntárias do sexo feminino que participarem do ensaio clínico que não estejam grávidas, comprovada pela sorologia beta-HCG.
18. Todos os dados desta participação neste estudo serão documentados e mantidos confidencialmente, não identificando o voluntário por ocasião da exposição e/ou

publicação dos mesmos; estes serão disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais da Patrocinadora envolvidos neste estudo.

19. Caso tenha qualquer dúvida ou perguntas relativas a este ensaio ou aos seus direitos, no que diz respeito a esta participação, ou se quiser relatar alguma reação adversa, favor contatar o médicos investigadores, que acompanham o ensaio, Dra. Elisa Guelere Paris, membro da Sociedade Brasileira dos Profissionais em Pesquisa Clínica, presidente da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Avicenna e médica do Hospital Avicenna, no telefone (0XX11- 295- 3324) e Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior, da Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco em Bragança Paulista- SP no telefone (0XX19-241- 5425).

20. Se houver alguma dúvida quanto à medicação, posso entrar em contato com o representante do patrocinador responsável, o gerente médico sênior da empresa patrocinadora.

21. Fico com a cópia deste documento para agilizar este contato, caso se faça necessário.

22. EU CONCORDO EM SEGUIR AS INSTRUÇÕES DAS PESSOAS CONDUZINDO ESTE ESTUDO, DE FORMA A OBTER O MÁXIMO DE BENEFÍCIOS DA ATENÇÃO MÉDICA OFERECIDA POR ESTA PESQUISA, ACREDITANDO NA SERIEDADE E IMPORTÂNCIA DESTE ESTUDO TANTO POR PARTE DOS INVESTIGADORES QUANTO DOS PATROCINADORES.

Nome do(a) voluntário (legível): \_\_\_\_\_

Assinatura do voluntário: \_\_\_\_\_

Nome legível do investigador: \_\_\_\_\_

Assinatura do investigador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Instituição/local/ fone: \_\_\_\_\_