

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DOUGLAS RODRIGUES RAMOS**

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EM ESTUDOS DE**  
**BIOEQUIVALÊNCIA DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA**

Goiânia  
2008

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**


Nome completo do autor: DOUGLAS RODRIGUES RAMOS

Título do trabalho: APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EM ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA.

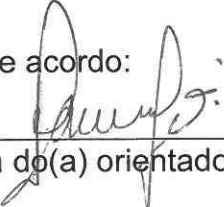
**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 11/07/18

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

DOUGLAS RODRIGUES RAMOS

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EM ESTUDOS DE  
BIOEQUIVALÊNCIA DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA**

Dissertação apresentada ao Instituto  
de Química da Universidade Federal  
de Goiás, para obtenção do título de  
Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio de Souza

Goiânia  
2008

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ramos, Douglas Rodrigues  
APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EM ESTUDOS DE  
BIOEQUIVALÊNCIA DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA [manuscrito] /  
Douglas Rodrigues Ramos. - 2008.  
54 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Dr. Paulo Sérgio de Souza.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto  
de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2008.  
Bibliografia.  
Inclui siglas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Quimiometria. 2. Bioequivalência. 3. Amoxicilina. 4.  
Componentes Principais. 5. Análise Hierárquica. I. Souza, Dr. Paulo  
Sérgio de, orient. II. Título.



**Universidade Federal de Goiás**  
**Instituto de Química**

**IQ - UFG**

Campus II - Samambaia  
CEP 74001-970- Goiânia, GO  
Cx. Postal 131

Fone/Fax: (062) 3521-1199  
E. mail: [cpg@quimica.ufg.br](mailto:cpg@quimica.ufg.br)

**REGISTRO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO** N° 088

**Aluno (a):** Douglas Rodrigues Ramos

**Orientador (a):** Prof. Dr. Paulo Sérgio de Souza

**Co-orientador (a):**

**Título do Texto Dissertativo:** APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EM ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA

**Data:** 28 de fevereiro de 2008

**Horário:** 14:00 h.

**Local:** Mini-Auditório do Instituto de Química (Bloco IQ 2)

**Parecer da Banca Examinadora**

Membro	Aprovado/Reprovado	Assinatura
Prof. (a) Dr.(a) Paulo Sérgio de Souza	Aprovado	
Prof.(a) Dr.(a) Clévia Ferreira Duarte Garrote	Aprovada	
Prof.(a) Dr.(a) Clarimar José Coelho	Aprovado	
Parecer Final	Aprovado/Reprovado	

**Justificativa e Sugestões**

A banca examinadora indica ao candidato acatar as sugestões emitidas na correção descritiva da dissertação e realizar uma melhor revisão bibliográfica da parte de quimiometria. Considera a dissertação aprovada.

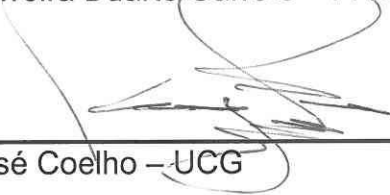
## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado em Química, apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, em 28/02/2008.

Comissão Julgadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Sérgio de Souza – IQ/UFG

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Clévia Ferreira Duarte Garrote – FF/UFG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Clarimar José Coelho – UCG

## Sumário

<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>8</b>
<b>Lista de Abreviaturas ou Siglas .....</b>	<b>9</b>
<b>Lista de Símbolos.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>13</b>
1.1 Regulamentação dos medicamentos genéricos .....	15
1.2 As etapas para realização de um estudo de bioequivalência.....	17
1.3 A intercambialidade dos medicamentos genéricos .....	19
1.4 Quimiometria .....	21
1.5 Amoxicilina.....	25
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>28</b>
<b>3 Métodos e Materiais .....</b>	<b>29</b>
3.1 Estudos de bioequivalência de Amoxicilina .....	29
3.1.1 Amostras biológicas .....	30
3.1.2 Metodologia Analítica.....	31
3.1.3 Análise Estatística .....	37
3.2 Métodos Quimiométricos.....	37
<b>4 Resultados e Discussões .....</b>	<b>39</b>
4.1 Avaliação da Bioequivalência pela etapa estatística.....	39
4.2 Avaliação da intercambialidade através da Quimiometria.....	43
<b>5 Conclusões.....</b>	<b>50</b>
<b>6 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>51</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Curva de Concentração plasmática em relação ao tempo de administração do fármaco .....	<b>16</b>
<b>Figura 2</b>	Evolução da venda de genéricos de junho de 2000 a dezembro de 2006.....	<b>21</b>
<b>Figura 3</b>	Esquematização da geração das componentes principais em um conjunto de dados no espaço multidimensional durante a aplicação da técnica de PCA .....	<b>23</b>
<b>Figura 4</b>	Estrutura química da Amoxicilina.....	<b>26</b>
<b>Figura 5</b>	Cromatograma de Amoxicilina 100 ng/mL.....	<b>32</b>
<b>Figura 6</b>	Cromatograma do padrão interno Cefalexina 600 ng/mL.....	<b>33</b>
<b>Figura 7</b>	Curva de calibração ( $r=0,993417$ ) de Amoxicilina na faixa de 100 ng/mL a 15000 ng/mL utilizando Cefalexina como padrão interno .....	<b>34</b>
<b>Figura 8</b>	Representação gráfica dos 8 parâmetros farmacocinéticos apresentados da Tabela 7 nas CP1 e CP2 .....	<b>44</b>
<b>Figura 9</b>	Representação gráfica dos medicamentos ordenados nas CP1 e CP2 e classificações da HCA.....	<b>45</b>
<b>Figura 10</b>	Representação gráfica dos medicamentos e das oito variáveis nas CP1 e CP2 .....	<b>47</b>
<b>Figura 11</b>	Representação gráfica dos medicamentos ordenados nas CP1, CP2, CP3 e classificações da HCA.....	<b>49</b>



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Estudos de bioequivalência de Amoxicilina cápsulas e suspensões utilizadas em cada estudo.....	29
<b>Tabela 2</b>	Parâmetros de utilização do Espectrômetro de Massas.....	32
<b>Tabela 3</b>	Precisão e Exatidão do método bioanalítico de Amoxicilina (1º dia, Analista I).....	35
<b>Tabela 4</b>	Precisão e Exatidão do método bioanalítico de Amoxicilina (1º dia, Analista II) .....	35
<b>Tabela 5</b>	Precisão e Exatidão do método bioanalítico de Amoxicilina (2º dia, Analista I).....	36
<b>Tabela 6</b>	Precisão Intermediária e Exatidão do método bioanalítico de Amoxicilina.....	36
<b>Tabela 7</b>	Parâmetros farmacocinéticos obtidos nos estudos de bioequivalência (valores médio dos voluntários).....	40
<b>Tabela 8</b>	Razão em porcentagem entre a média das concentrações máximas (C <sub>max</sub> ) entre dois medicamentos na forma de cápsula.....	41
<b>Tabela 9</b>	Razão em porcentagem entre a média das concentrações máximas (C <sub>max</sub> ) entre dois medicamentos na forma de suspensão .....	41
<b>Tabela 10</b>	Razão em % entre a média das áreas sob a curva (ASC <sub>0-t</sub> ) entre dois medicamentos na forma de cápsula.....	42
<b>Tabela 11</b>	Razão em % entre a média das áreas sob a curvas (ASC <sub>0-t</sub> ) entre dois medicamentos na forma de suspensão .....	42
<b>Tabela 12</b>	Resultados das componentes principais nos dados farmacocinéticos obtidos através do programa SPADn.....	43

## **Lista de Abreviaturas ou Siglas**

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BPL</b>	Boas práticas de Laboratório
<b>CEP</b>	Comitê de Ética e Pesquisa
<b>CP</b>	Componente Principal
<b>DPR</b>	Desvio Padrão Relativo
<b>HBL</b>	Hydrophilic-Lipophilic Balance
<b>HCA</b>	Hierarchical Cluster Analysis ou Análise Hierárquica de Agrupamentos
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography ou Cromatografia Líquida de Alta Performance
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>ICF</b>	Instituto de Ciências Farmacêuticas de Estudos e Pesquisas
<b>PCA</b>	Principal Component Analysis ou Análise de Componentes Principais
<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction ou Extração em Fase Sólida
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde

## Lista de Símbolos

<b>ASC</b>	Área Sob Curva
<b>ASC<sub>0-t</sub></b>	Área Sob Curva de zero a tempo finito
<b>ASC<sub>0-inf</sub></b>	Área Sob Curva de zero a infinito
<b>AUC<sub>0-t</sub></b>	Área Sob Curva de zero a tempo finito
<b>AUC<sub>0-inf</sub></b>	Área Sob Curva de zero a infinito
<b>CL</b>	Clearance
<b>CL<sub>F</sub></b>	Clearance
<b>C<sub>max</sub></b>	Concentração Máxima do fármaco
<b>K<sub>el</sub></b>	Constante de Eliminação
<b>r</b>	Coeficiente de correlação linear
<b>T<sub>1/2</sub></b>	Tempo de Meia Vida
<b>T<sub>max</sub></b>	Tempo Máximo
<b>VD</b>	Volume de Distribuição

## **RESUMO**

Os medicamentos genéricos trouxeram a poluição nacional maior possibilidade de acesso ao tratamento medicamentoso, estímulos à concorrência e inserção da intercambialidade de medicamentos, onde a formulação referência pode ser substituída pelo medicamento genérico, sem prejuízos ao tratamento. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) regulamenta este mercado nacional exigindo a comprovação da bioequivalência entre os medicamentos teste e referência. Assim no período de seis anos, estudos foram realizados e vários medicamentos genéricos foram liberados para a comercialização. Entretanto, a comprovação da intercambialidade entre os vários medicamentos genéricos e medicamentos referências ainda são de difíceis observações devido à complexidade dos dados obtidos. A análise quimiométrica reduz o espaço amostral de dados complexos possibilitando a observação da similaridade das amostras bem como a classificação das mesmas em grupos distintos. Para tal utilizou técnicas de Análise Componentes Principais (PCA) e a Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA). Com estas técnicas foram avaliados seis estudos bioequivalentes de Amoxicilina nas formas de cápsulas e suspensões, e posteriormente, classificados em grupos de acordo com a similaridade dos perfis farmacocinéticos destas formulações. A aplicação da quimiometria em dados de farmacocinéticos diferenciou as formas farmacêuticas cápsula e suspensão, os parâmetros de absorção e eliminação possibilitando a avaliação da intercambialidade das formulações demonstrando ser úteis em laboratórios de pesquisas ou por agências reguladoras para o monitoramento da qualidade de medicamentos.

## **ABSTRACT**

The generic medicines have brought to the national population a higher possibility to access the treatment with medication, the competition stimulation and the medicine exchange insertion, in which the reference formulation can be substituted by the generic medicine, without any harm to the treatment. ANVISA (National Agency of Sanitary Surveillance) regulates this national market, demanding the bioequivalence confirmation between test and reference medicines. Therefore, in a period of six years, those studies have been performed and several generic medicines have been liberated to commercialization. However, the exchange confirmation among the several generic and reference medication are still difficult to observe due to the complexity of the values obtained. The chemometrics analysis decreases the sample space of the complex data which allows samples similarity observation as well as their classification in distinct groups. For that, Principal Components Analysis (PCA) and the Hierarchical Cluster Analysis (HCA) have been used. With these techniques an n-dimension space statistics have been evaluated for a bi-dimension of six amoxicillin bioequivalence studies as capsules and suspensions and therefore, classified them in groups in accordance with the similarity of the formulations pharmacokinetic profiles, which has allowed the medicine exchange observation. The chemometrics applications in pharmacokinetic data differentiated the pharmaceuticals forms capsule and suspensions, of absorption and elimination parameters allowing the exchange evaluations of formulations showing been useful in research laboratories or by regulatory agency for the quality monitoring of the medicine.

## 1 Introdução

Apesar da alta produção de medicamentos no mundo e no Brasil, a população apresenta dificuldades para adquiri-los, pois representam um alto custo no orçamento doméstico e o Sistema Único de Saúde (SUS) não consegue cobrir todos os tratamentos. Apenas 15 % da população nacional era responsável pelo consumo de aproximadamente a metade da produção nacional em 2001 (BELLORIO, 2003).

Iniciou-se uma mudança nesta situação com a Lei 9.787 de 10 de fevereiro de 1999, que instituiu o medicamento genérico no Brasil. De acordo com VALENTE 2002, define-se o genérico como aquele medicamento equivalente terapêutico de um produto de referência (inovador), sendo com este intercambiável, ou seja, apresenta a mesma eficácia clínica e o mesmo potencial para originar efeitos adversos.

Para a regulamentação e aprovação do medicamento genérico no Brasil, especialistas nacionais e internacionais elaboraram um regulamento técnico, o que gerou a resolução RE 391, publicada em agosto de 1999. Após algumas atualizações e revogações, esta resolução foi substituída pela RDC nº 135 de 29 de maio de 2003.

Desde então, o mercado farmacêutico, segundo VALENTE em 2002, ficou composto pelas seguintes categorias de medicamentos:

- Medicamento inovador: sendo aquele que tenha sido alvo de patente, mesmo que extinta, por parte da empresa responsável pelo seu desenvolvimento e introdução no mercado. Em geral, o medicamento inovador, é considerado medicamento de referência para o genérico. A obtenção de registro pelo inovador é precedida de cerca de sete a dez anos de pesquisa e desenvolvimento, com a realização de ensaios pré-clínicos e clínicos e

estabelecimento da relação entre a eficácia terapêutica, a segurança e a biodisponibilidade.

- Medicamento similar: é aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, a mesma apresentação, concentração, via de administração, posologia e indicação terapêutica e é equivalente ao medicamento registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma de produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos. São cópias dos medicamentos inovadores (referências) já existentes, sem obrigatoriedade de ser intercambiável, não são exigidos ensaios clínicos, pré-clínicos nem teste de bioequivalência.
- Medicamento genérico: é aquele equivalente terapêutico de um produto de referência (inovador), sendo com este intercambiável, ou seja, apresenta a mesma eficácia clínica e o mesmo potencial para originar efeitos adversos. Como o genérico não é inovação, ou seja, corresponde à cópia segura do medicamento de referência (inovador), para seu registro é necessário que se repitam os ensaios pré-clínicos e clínicos pelos quais passou o inovador, permitindo que sua equivalência terapêutica seja comprovada.

Os genéricos trouxeram benefícios para a população brasileira, pois os mesmos são, em média, 45 % mais baratos que os seus respectivos medicamentos de referência, podendo chegar a 80 % beneficiando principalmente as pessoas com doenças crônicas. Outro fato ocorrido com os medicamentos genéricos é que mesmo os tratamentos com os medicamentos de marca ficaram mais baratos por causa da concorrência com os genéricos (VALENTE, 2002). As indústrias nacionais também ganharam com este novo segmento, pois receberam investimentos, o que modernizou e melhorou sua linha de produção, absorvendo novas tecnologias e conceitos internacionais de práticas fabris e de controle de qualidade.

No ano de 2000, por exemplo, o genérico do antibiótico Amoxicilina somava 48 % do total de vendas no país, enquanto o mesmo medicamento referência apresentava somente 13 %. Apesar desta política não ter resolvido o problema de acesso aos medicamentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) demonstrou que 50 % dos brasileiros tiveram maior oportunidade de aquisição de

medicamentos além de ter estimulado a concorrência no mercado farmacêutico (ZORZETTO, 2001).

Em seis anos, a indústria de genéricos investiu aproximadamente US\$ 170 milhões na construção e modernização de plantas industriais no Brasil, servindo para o fortalecimento da indústria brasileira. As quatro principais indústrias do setor são de capital nacional. Cerca de 80 % das unidades de genéricos comercializadas no Brasil são produzidas no país (PRO-GENÉRICOS, 2006). Atualmente, os genéricos respondem por aproximadamente 14 % das vendas em unidades no conjunto do mercado farmacêutico nacional (NERDHOST, 2006).

## **1.1 Regulamentação dos medicamentos genéricos**

Para uma indústria produzir um medicamento genérico, ela deve obter o registro junto à ANVISA, que por sua vez analisa um dossiê, preparado pelo próprio fabricante, onde devem constar todas as informações pedidas na legislação vigente.

Neste grande processo, a parte essencial para que os medicamentos genéricos apresentem a mesma qualidade, segurança e eficácia que os medicamentos inovadores (referência) são os teste de equivalência e bioequivalência farmacêutica realizados por laboratórios credenciados e fiscalizados pela ANVISA.

Assim o medicamento genérico comprova sua equivalência terapêutica quando apresenta equivalência e bioequivalência semelhantes em relação ao medicamento referência, bem como a certificação em boas práticas de fabricação e controle para a linha de produção deste medicamento genérico.

Os estudos de equivalência farmacêutica têm como objetivo comprovar a equivalência química entre o medicamento teste, possível genérico, e o medicamento referência, ou seja, comprova se as duas formulações apresentam o mesmo fármaco, na mesma concentração, na mesma apresentação, na mesma forma farmacêutica podendo diferir somente nos excipientes.

No caso de estudos de bioequivalência farmacêutica é a comparação da fração absorvida (biodisponibilidade) entre dois medicamentos distintos, administrados por via extramuscular (via oral, por exemplo). Um destes medicamentos é denominado como teste e outro como referência (SHARGEL & YU, 1999).



A biodisponibilidade pode ser definida como a taxa de uma molécula ativa que é absorvida pelo organismo tornando-se disponível para o seu sítio de ação. O termo biodisponibilidade é, na verdade, uma contração de disponibilidade biológica. Considera-se biodisponibilidade como sendo a taxa e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no sítio de ação da droga. Considerando-se que a quantidade do fármaco contida no fluido biológico está em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do princípio ativo da droga em sangue total, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo.

Os principais parâmetros utilizados para a avaliação da biodisponibilidade são o  $C_{max}$ , o  $T_{max}$  e  $ASCt$ . O  $C_{max}$  é a concentração máxima do fármaco encontrado no fluido biológico, ou seja, é o pico de concentração máxima do fármaco. O  $T_{max}$  é o tempo para ocorrer o pico de concentração máxima após a administração do fármaco. A área sob a curva ( $ASCt$ ) é medida da quantidade de fármaco que é absorvida pelo organismo e disponível no fluido biológico. Este parâmetro é calculada por integração matemática e é expressa pelo produto da concentração pelo tempo.

Assim a biodisponibilidade pode ser medida pela curva de concentração plasmática do fármaco no sangue total, soro ou plasma em função do tempo (SHARGEL & YU, 1999) (Figura 1).

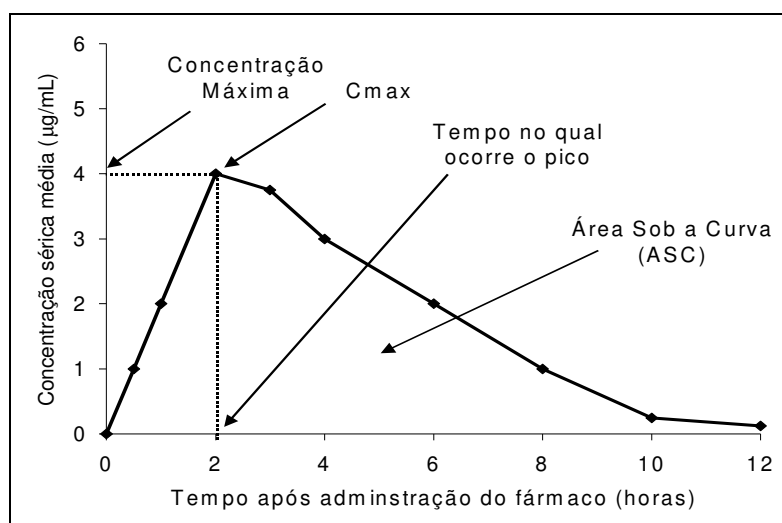


Figura 1 - Curva de Concentração plasmática em relação ao tempo de administração do fármaco.

Portanto, medicamentos bioequivalentes são aqueles que apresentam equivalência farmacêutica, ou seja, possuem a mesma forma farmacêutica e quantidade do mesmo princípio ativo, que ao serem administrados na mesma dose molar e nas mesmas condições, não apresentam diferenças estatísticas em relação as suas biodisponibilidades (ANVISA, 2002b).

Estes testes são regulamentados por rigorosas legislações, publicadas e revisadas pela equipe técnica da ANVISA. Assim o medicamento para ser registrado como genérico necessita, obrigatoriamente, comprovar a sua biodisponibilidade através dos testes acima preconizados (BELLORIO, 2003).

Com a curva de concentração plasmática (Figura 1) do fármaco em relação ao tempo de administração, alguns parâmetros farmacocinéticos são observados. Os parâmetros mais importantes na avaliação da biodisponibilidade de um fármaco são a Área Sob a Curva (ASC), o Tempo de Concentração Máxima (Tmax) e a Concentração Máxima (Cmax) obtida no material biológico (SHARGEL & YU, 1999).

## **1.2 As etapas para realização de um estudo de bioequivalência**

O teste de bioequivalência é realizado em três etapas: clínica, analítica e estatística (ANVISA, 2002b). A etapa clínica é caracterizada pela administração dos medicamentos teste e referência no mesmo grupo de voluntários previamente selecionados (STORPIRTIS, 2002). No mínimo, são selecionados 24 voluntários sadios, demonstrados por exames clínicos, do mesmo sexo ou em números iguais de homens e mulheres, apresentando entre 18 a 50 anos de idade assumindo responsabilidade conforme termo de consentimento livre e esclarecido. Os mesmos são internados em leitos hospitalares onde são administrados os medicamentos de forma aberta (de conhecimento geral), aleatória e cruzada (em duas etapas) de maneira que 12 voluntários recebam o medicamento referência e os demais o medicamento teste. Posteriormente, baseando no tempo de meia vida do fármaco, amostras de material biológico são coletadas nos tempos previamente estabelecido no protocolo clínico contemplando um período mínimo de 3 a 5 vezes o tempo de

meia vida de eliminação. Após esta etapa, os voluntários são novamente internados depois de um intervalo, que corresponde a sete meias vidas do princípio ativo, para a administração dos medicamentos de forma cruzada, ou seja, os voluntários que receberam os medicamentos referência na primeira etapa receberão posteriormente o medicamento teste e vice-versa (ANVISA, 2002b).

A etapa analítica é a determinação quantitativa dos princípios ativos ou metabólitos nas respectivas matrizes biológicas. O método utilizado deve ser validado conforme a RE nº 899 de 29 de maio de 2003 e de acordo com as Boas Práticas de Laboratório (BPL). Nesta etapa geralmente utiliza-se técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC<sup>1</sup>) com detecção em Espectrometria de Massa para a quantificação das substâncias químicas. Também são utilizadas detecções em ultravioleta ou fluorescência.

A terceira e última etapa de um estudo de bioequivalência é a estatística, onde os parâmetros farmacocinéticos, obtidos do gráfico de concentração plasmática do fármaco em relação ao tempo encontrados na etapa analítica, são analisados conforme determinação da ANVISA pela RE nº 898 de 29 de maio de 2003.

Os parâmetros determinados são:

1. Maior concentração do fármaco alcançável na corrente sanguínea com a formulação em questão, denominado Concentração Máxima (C<sub>max</sub>) (CRAIG E STIZEL, 1996).
2. Tempo máximo (T<sub>max</sub>) que é o tempo necessário para atingir a concentração máxima (CRAIG E STIZEL, 1996).
3. Área sob a curva de concentração sanguínea versus tempo, calculada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao tempo t (ASC<sub>0-t</sub>) (FIUZA, 2002). Esta área é proporcional a quantidade total absorvida da droga durante o tempo de coleta de sangue, no qual foi realizado o estudo de bioequivalência.
4. Área sob a curva de concentração sanguínea versus tempo, calculada do tempo zero ao tempo infinito (ASC<sub>0-inf</sub>) (FIUZA, 2002). Esta área também é proporcional a quantidade total absorvida da droga, sendo que este valor é uma projeção de concentração total da droga se considerar o infinito ao invés de um tempo final de observação.

---

Do inglês <sup>1</sup> Hight Performance Liquid Cromathography

5. Tempo de meia vida do fármaco ( $T_{1/2}$ ), que é o tempo necessário para reduzir a concentração plasmática à metade na corrente sanguínea (CUNHA, 2005).
6. Volume Aparente de Distribuição (VD) definido como volume hipotético de fluido corporal necessário para dissolver o fármaco absorvido (CUNHA, 2005).
7. Constante de Eliminação ( $K_{el}$ ) que a velocidade de eliminação do fármaco no organismo (CRAIG E STIZEL, 1996).
8. Clearance (Cl) definida como volume teórico de líquido da qual a droga é completamente removida ao longo de um tempo (CRAIG E STIZEL, 1996).

A avaliação de bioequivalência é observada avaliando os parâmetros de  $ASC_{0-t}$  e  $C_{max}$ . Os medicamentos são considerados bioequivalentes quando o intervalo de confiança (IC) calculado de 90 % para as razões de  $ASC_{0-t}$  teste /  $ASC_{0-t}$  referência e  $C_{max}$  teste /  $C_{max}$  referência das médias dos parâmetros farmacocinéticos do medicamento teste e medicamento referência estiverem compreendidos entre 80 a 125 % (BELLORIO, 2003; ANVISA, 2003).

### **1.3 A intercambialidade dos medicamentos genéricos**

A intercambialidade inclui a escolha de um medicamento entre dois ou mais para os mesmos fins terapêuticos ou profiláticos. Como os medicamentos genéricos são cópias de medicamentos referência, a sua confiabilidade é assegurada através da definição de critérios de qualidade adotados para análise e concessão de registros. O conhecimento das características destes medicamentos possibilita a intercambialidade entre produtos com equivalência terapêutica (medicamentos genéricos e referência) (RUMEL, et al 2006).

A comprovação da eficácia terapêutica, segurança e intercambialidade dos genéricos, em relação ao medicamento de referência, através da realização dos ensaios de equivalência farmacêutica e bioequivalência, é fundamental para o deferimento do registro, bem como a sua manutenção na comercialização (ANVISA, 2007).

Nesse contexto, é fundamental ressaltar que diferenças em relação a características físicas e físico-químicas do fármaco e demais componentes da formulação, bem como nos processos de fabricação, podem gerar diferenças na biodisponibilidade que, no caso do genérico, podem comprometer a bioequivalência e, conseqüentemente, a intercambialidade (STORPIRTIS et al., 2004).

Desta forma, a ANVISA possibilitou que centros de pesquisa e estudos de bioequivalência se desenvolvessem no país e assim vários estudos fossem produzidos, sempre comparando um lote de medicamento teste (possível genérico) com um lote do medicamento referência. Como estes estudos estão sendo realizados desde 1999, vários estudos de uma mesma droga foram publicados, utilizando lotes diferentes de medicamentos referência e medicamentos testes de diferentes empresas nacionais e internacionais.

Depois da avaliação de cada estudo, diversos medicamentos genéricos de diversas classes terapêuticas são produzidos e comercializados no país. O aumento de vendas de medicamentos genéricos no período de 2000 a 2006 (Figura 2) indica que esta política permitiu um maior acesso da população brasileira ao tratamento medicamentoso através da concorrência e de preços menores (ANVISA, 2006).

Neste período, verificações dos dados farmacocinéticos dos medicamentos referência e dos genéricos, demonstrando que os medicamentos referência mantêm um perfil constante ou se os vários medicamentos genéricos, de um mesmo ativo, comercializados no país apresentam o mesmo perfil farmacocinético, não foram divulgadas.

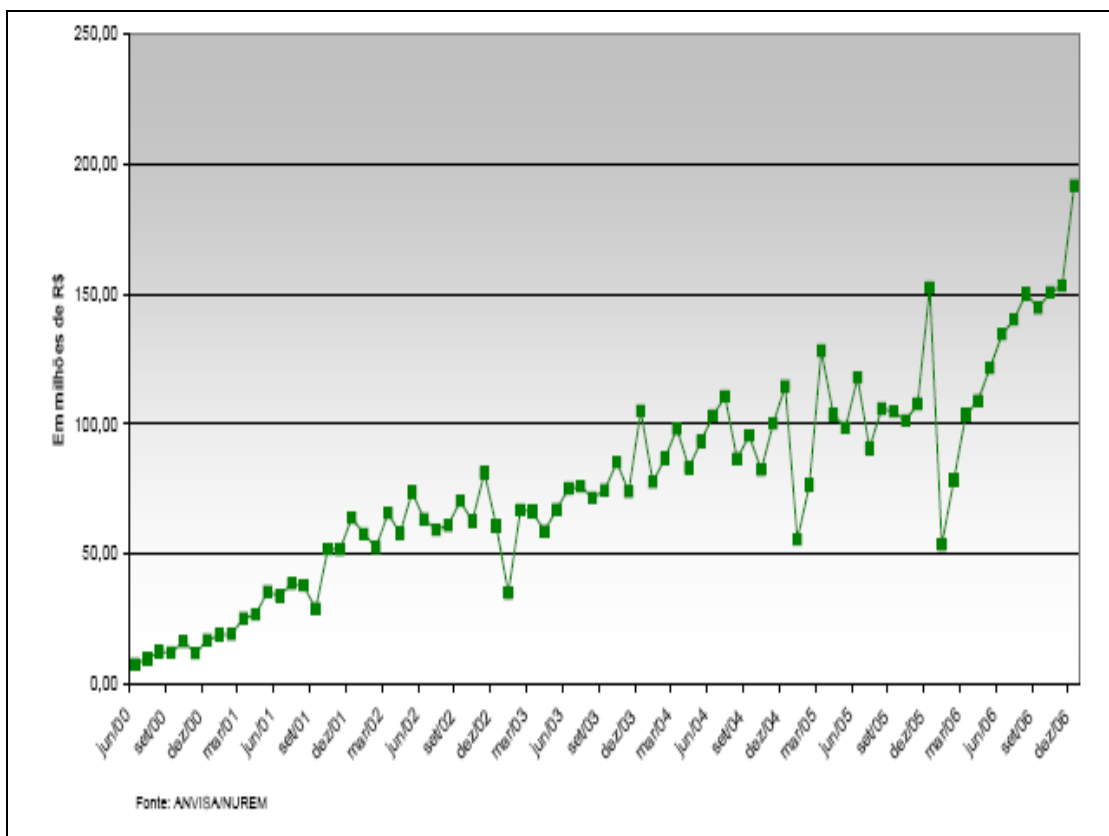


Figura 2 - Evolução da venda de genéricos de junho de 2000 a dezembro de 2006

Atualmente, no Brasil existem 17 empresas que fabricam o antibiótico mais vendido Amoxicilina genérico, sendo que a eficácia de cada um destes foram verificadas em relação a lotes diferentes de medicamento referência, em estudos diferentes conduzidos por diversos laboratórios do país.

Assim, mecanismos que possibilitam a comparação do perfil farmacocinético entre os vários medicamentos genéricos e entre os diversos medicamentos de referência utilizados nos estudos de bioequivalência, tornam-se importantes para a verificação da intercambialidade entre estas formulações, permitindo desta forma garantir a confiabilidade deste grupo de medicamentos no país e possibilitando a utilização por profissionais da saúde e consumidores de medicamentos.

## 1.4 Quimiometria

O desenvolvimento das técnicas analíticas instrumentais após a década de 60, associado à crescente utilização de computadores aumentou a rapidez e a quantidade

de dados obtidos e armazenados. Assim estatística univariada, até então empregada no tratamento de dados químicos, ao considerar a análise de cada variável do sistema separadamente, impossibilitou a extração de uma maior quantidade de informações (WOLD et al, 1983; RIBEIRO, 2005). Paralelamente, as técnicas multivariadas passaram a ser introduzidas gradativamente na investigação química, o que abriu caminho para a criação de uma área de estudo dentro da química designada ao estudo de métodos de tratamento de dados multivariados, a quimiometria (MASSART et al, 1988; RIBEIRO, 2005).

Os métodos de análise multivariada permitem visualizar o efeito das variáveis num sistema simultaneamente, com todas as suas correlações e tendências (RIBEIRO, 2005). Assim a quimiometria possibilita que métodos matemáticos complexos sejam utilizados na rotina de laboratórios industriais ou de pesquisa.

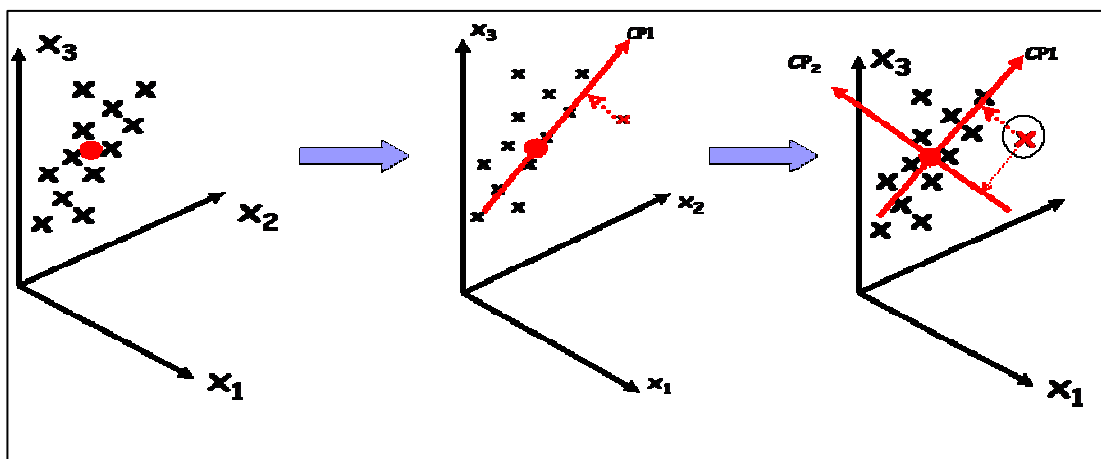
Dentre os vários métodos desenvolvidos estão as técnicas de Análise de Componentes Principais (PCA<sup>2</sup>) e de Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA<sup>3</sup>).

A aplicação da técnica de PCA condensa a informação contida em um número de variáveis originais em um conjunto menor de variáveis estatísticas com uma perda mínima de informação (HAIR et al, 2005). Consistem em uma transformação linear de “*m*” variáveis originais em “*m*” novas variáveis, de tal modo que a primeira nova variável computada seja responsável pela maior variação possível existente no conjunto de dados, a segunda pela maior variação possível restante e assim por diante até que a variação do conjunto tenha sido explicada.

Portanto PCA é uma técnica de transformação de variáveis. Se cada variável medida for considerada como um eixo de variabilidade, esta análise transforma os dados de tal modo a descrever a mesma variabilidade total existente. Graficamente pode ser descrita como a rotação de pontos existentes num espaço multidimensional originando eixos, ou componentes principais, que dispostos num espaço a duas dimensões representam variabilidade suficiente que possa indicar algum padrão a ser interpretado. A figura 3 exemplifica esta rotação de pontos e a geração das componentes principais.

---

Do ingles <sup>2</sup> Principal Component Analysis  
<sup>3</sup> Hierarchical Cluster Analysis



( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  – variáveis originais;  $CP_1$  – primeira componente principal e  $CP_2$  – segunda componente principal).

Figura 3 - Esquematização da geração das componentes principais em um conjunto de dados no espaço multidimensional durante a aplicação da técnica de PCA.

Característica importante dos componentes principais é que, como todas as variáveis são altamente relacionadas entre si, os novos componentes principais são completamente não correlacionados, ou seja, são ortogonais. Como na matriz de dados originais, cada amostra apresenta um valor para cada variável, na nova matriz de componentes principais, cada amostra tem um valor para cada componente principal, que tomados juntos são conhecidos como valores dos componentes. O núcleo de qualquer PCA são autovetores e autovalores.

Autovetores são conjuntos de valores que representam o peso de cada variável original sobre cada componente principal. Os autovetores são valores escalados como coeficientes de correlação e variam de +1,0 a -1,0 (passando pelo zero). Para cada componente principal, todas as variáveis têm um conjunto de autovetores correspondentes, e quanto mais próximo de +1,0 ou -1,0 está o autovetor, mais importante é a variável para a componente principal.

Autovalores são valores que representam a contribuição relativa de cada componente principal na explicação da variação total dos dados. Existe um autovalor para cada componente principal e o tamanho do autovalor para o componente é uma indicação direta da importância da componente principal na explicação da variação total dentro do conjunto de dados. Ou seja, o autovalor explica a importância do componente principal sobre a variação total dos dados.

Aplicação da PCA consiste no cálculo dos autovalores correspondentes aos autovetores de uma matriz de variâncias-covariâncias ou de uma matriz de



coeficientes de correlação entre variáveis. Quando as variáveis, devido a escalas diferentes de mensurações empregadas, não podem ser diretamente comparadas, torna-se necessário uma padronização preliminarmente, de modo que as variáveis transformadas passem a ter média zero e variância unitária.

Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) é uma técnica analítica para desenvolver subgrupos significativos de indivíduos ou objetos, com o objetivo de classificá-los em pequenos números de grupos com base nas similaridades entre as entidades (HAIR et al, 2005). Essa técnica tem como objetivo agrupar objetos semelhantes segundo suas características. A análise é realizada com base na similaridade ou dissimilaridade entre as variáveis analisadas (JOHNSON & WICHERN, 1992). HAIR et al., (2005) acrescenta que os agrupamentos resultantes devem apresentar elevada homogeneidade interna (dentro dos agrupamentos) e elevada heterogeneidade externa (entre os agrupamentos).

Antes de começar o processo de agrupamento, é necessário avaliar se existe necessidade de padronização dos dados. A maioria das medidas de distância são bastante sensíveis a diferentes escalas ou magnitudes entre variáveis. A comparação de variáveis torna-se mais fácil quando elas estão na mesma escala (ZANELLA, 2006). A análise de componentes principais pode ser aplicada antes do processo de agrupamento possibilitando esta padronização de dados.

A similaridade pode ser medida de várias maneiras, três métodos dominam as aplicações de análise de agrupamentos: medidas correlacionais, medidas de distância e medidas de associação.

As medidas correlacionais utilizam os padrões dos valores para medir a similaridade entre os objetos, desconsiderando a magnitude dos objetos, por esse motivo é uma medida pouco usada, pois a maior parte das aplicações de análise de agrupamento consideram a magnitude dos objetos e não o padrão.

As medidas de distância representam a proximidade entre as observações ao longo das variáveis. Os agrupamentos baseados em distância possuem valores mais similares no conjunto de variáveis, no entanto, os padrões podem ser bem diferentes. A distância euclidiana é a medida de distância mais frequentemente empregada. É utilizada para calcular medidas específicas, assim como a distância euclidiana simples e a distância euclidiana quadrada ou absoluta. Quanto mais próximo de zero

for a distância euclidiana, mais similares são os objetos comparados (BUENO e AGUIAR, 2004).

As medidas de similaridade por associação são usadas para comparar objetos pelos quais as características são medidas somente em termos não-métricos. Uma medida de associação pode avaliar o grau de concordância entre cada par de objetos correspondentes (HAIR et al., 2005).

Na fase de partição deve-se escolher o procedimento que será usado para colocar objetos similares em agrupamentos. O critério fundamental usado consiste em tentar maximizar as diferenças entre os agrupamentos relativamente à variação dentro dos mesmos.

As duas técnicas de análise da quimiometria mais conhecidas são as análises de agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA). A PCA e a HCA são metodologias exploratórias que visam evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados.

As técnicas e PCA e HCA possibilitam encontrar e/ou prognosticar uma propriedade de um conjunto de amostras que se relacionam com as medidas analíticas que são obtidas (SOUSA et al, 2005). Desta forma a aplicação destas técnicas em conjunto de dados farmacocinéticos podem cooperar na visualização, comparação e classificação (agrupamentos) de medicamentos.

## **1.5 Amoxicilina**

A Amoxicilina é um antibiótico semi-sintético com largo espectro de atividade bacteriana contra muitos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Substância química classificada na classe terapêutica dos beta-lactâmicos apresenta um massa molecular de 365,4 g e fórmula molecular  $C_{19}H_{19}N_3O_5S$ . A estrutura química da molécula é apresentada na figura 4.

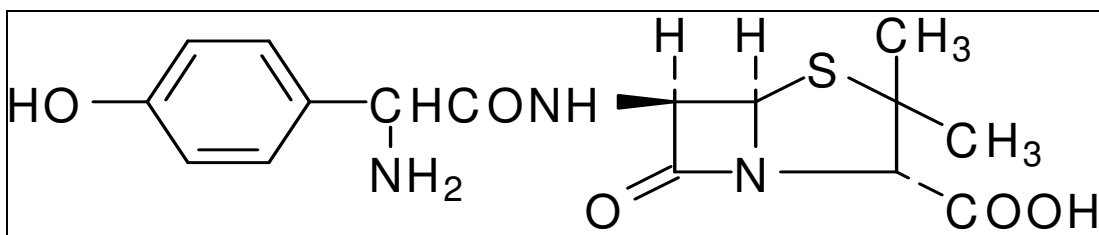


Figura 4 - Estrutura química da Amoxicilina.

A Amoxicilina é um inibidor seletivo da síntese da parede celular bacteriana, que normalmente leva à inibição da reação de transpeptidação, bloqueio da síntese dos peptidoglicanos e autólise da parede celular. A inibição da enzima transpeptidase ocorre pela similaridade estrutural das beta-lactâmicos com o resíduo acil-D-alanil-D alanina, substrato da enzima em questão. Todavia, este fármaco é suscetível à degradação por betalactamases e, portanto, o espectro de atividade não inclui microrganismos produtores destas enzimas.

Amoxicilina é bactericida para uma larga faixa de bactérias, incluindo *Pneumococcus*, *Enterococcus* sp., *Listeria*, *Corynebacteria*, *Clostridia*, *Bacillus anthracis*, *Erysipelothrix*, *Rhusiopathial* e bactérias Gram-negativas: *Meningococcus*, *Gonococcus*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae* e *parainfluenzae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Samonella* e *Shigella*.

É utilizada em tratamentos de infecções otorrinolaringológicas (amidalites, faringites, laringites, otite média, sinusite); infecções das vias respiratórias (bronquite aguda e crônica, pneumonia bacteriana, abscesso pulmonar), infecções das vias urinárias (pielonefrite aguda e crônica, cistite e uretrite), infecções gastrointestinais (febre tifóide, paratifo), infecções venéreas (gonorréia) e infecções da pele e tecidos moles.

Contra-indicada aos pacientes com reação de hipersensibilidade aos beta-lactâmicos, pois podem causar reações exantemáticas em pacientes com mononucleose infecciosa e desencadear reações de hipersensibilidade, inclusive anafiláticas. A Amoxicilina deve ser utilizada com cautela em pacientes que estão sob tratamento com anticoagulantes, durante a gravidez e ainda pode reduzir a eficácia dos contraceptivos orais contendo estrógeno.

Amoxicilina como todos os antibióticos, deve ser usado na dose e frequência recomendadas para obtenção e manutenção de concentrações séricas e teciduais

eficazes. O medicamento deve ser administrado por um número de dias adequado à infecção sob tratamento. As apresentações orais devem ser as preferidas, ficando a via parenteral (injetável) disponível para infecções potencialmente graves e para as situações em que a via oral está prejudicada ou não disponível. Apresentações mais comuns são de 500 mg de Amoxicilina por cápsula e 250 mg de Amoxicilina por 5 mL de suspensão.

O comportamento farmacocinético é caracterizado por uma absorção rápida no trato gastrointestinal, apresentando uma concentração máxima ligeiramente superior a uma hora e um tempo de meia-vida de aproximadamente uma hora, após dose de Amoxicilina 500 mg. A Amoxicilina têm uma biodisponibilidade entre 70 e 90 %, sendo estável no suco gástrico.

Após absorção é amplamente distribuída nos líquidos e tecidos corporais e aproximadamente 20 % está ligada às proteínas plasmáticas. A Amoxicilina atravessa a barreira placentária, sendo encontrada no soro do cordão umbilical e no fluido amniótico na ordem de até 50 % da concentração plasmática materna sendo também excretada no leite materno.

Metabolizada através da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, a Amoxicilina é transformada em ácido penicilóico e penalmádico, que são excretados na urina. Cerca de 60 % de uma dose oral é excretada pela urina dentro de 6 a 8 horas. A excreção urinária da Amoxicilina ocorre através da filtração glomerular e secreção tubular e não há evidências de metabólitos ativos da Amoxicilina na urina.

## **2 Objetivos**

O objetivo deste trabalho é a aplicação de Métodos Quimiométricos para comparação dos perfis farmacocinéticos de formulações da Amoxicilina em cápsula e em suspensão, encontrados em estudos de bioequivalência realizados no Brasil. Desta forma possibilitar a classificação destes medicamentos, avaliar a qualidade dos medicamentos genéricos e de referência comercializados, criando assim uma ferramenta para a observação da intercambialidade entre os medicamentos.

### 3 Métodos e Materiais

#### 3.1 Estudos de bioequivalência de Amoxicilina

Foram considerados os dados de seis estudos de bioequivalência da Amoxicilina, todos eles executados antes do início desta dissertação e sob a responsabilidade do Instituto de Ciências Farmacêuticas de Estudos e Pesquisas (ICF) credenciado pela ANVISA para execução deste tipo de estudo e aprovados por Comitês de Ética em Pesquisa (CEP).

Tabela 1 - Estudos de bioequivalência de Amoxicilina cápsulas e suspensões utilizadas em cada estudo

nº do Estudo (Ano execução)	Forma Farmacêutica	Identificação Medicamento	Tipo de medicamento
1 (2002)	Cápsula	A*	Referência
		B	Teste
2 (2004)	Cápsula	C*	Referência
		D	Teste
3 (2004)	Cápsula	E*	Referência
		F	Teste
4 (2003)	Suspensão	G**	Referência
		H	Teste
5 (2005)	Suspensão	I**	Referência
		J	Teste
6 (2006)	Suspensão	K**	Referência
		L	Teste

\*Medicamento referência na forma de cápsula do mesmo fabricante com diferentes lotes de fabricação.

\*\*Medicamento referência na forma de suspensão do mesmo fabricante com diferentes lotes de fabricação.

Os dados farmacocinéticos dos seis estudos, sendo três de Amoxicilina cápsula (500 mg) e três de Amoxicilina suspensão (250 mg / 5 mL), demonstraram sempre a bioequivalência entre os medicamentos teste e referência utilizado em cada estudo. A Tabela 1 enumera os estudos utilizados, apresenta seu período de execução e a identificação de cada medicamento pesquisado.

Para cada um dos seis estudos foram selecionados 26 voluntários comprovadamente sadios que iniciaram a participação na primeira fase de internação, totalizando 156 voluntários selecionados. Entretanto durante o período de execução, 6 voluntários desistiram por motivos pessoais, assim 150 voluntários participaram das internações contribuindo com amostras biológicas.

### **3.1.1 Amostras biológicas**

No dia da internação, após jejum de aproximadamente 10 horas, os voluntários de cada estudo foram acomodados em leito e submetidos à primeira coleta de sangue (15 mL) correspondente ao tempo zero. Logo após, os voluntários receberam uma dose equivalente a 500 mg de Amoxicilina (1 cápsula ou 10 mL da suspensão) juntamente com 200 mL de água. O medicamento administrado poderia ser o referência ou teste, conforme a lista de randomização estabelecida.

Após a administração, foram coletadas amostras de 10 ml de sangue correspondente aos tempos de 15; 30 e 45 min; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 36 e 48 horas após a ingestão do medicamento. O sangue coletado foi transferido para tubos de ensaios com anticoagulante EDTA. Após a cada coleta, todos os tubos de ensaios foram imediatamente centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos e o plasma removido pipetando o líquido sobrenadante superior.

Depois de transcorrido o período de “wash-out” (período necessário para que a concentração de um medicamento seja eliminada pelo organismo, depois da sua administração – neste caso da Amoxicilina este período é de 7 dias), os voluntários voltaram para o hospital onde foi realizada a segunda fase do estudo. Os voluntários que haviam ingerido o medicamento teste na primeira fase ingeriram o medicamento referência e vice-versa. Com este procedimento descrito foi possível obter para cada

voluntário 2 amostras biológicas (medicamento teste e referência) totalizando 300 amostras ao final dos 6 estudos.

### 3.1.2 Metodologia Analítica

As amostras biológicas foram analisadas por uma metodologia desenvolvida e validada pelo ICF baseada em técnica analítica de HPLC com detecção em Espectrometria de Massa onde as amostras biológicas passaram por um processo de extração em fase sólida (SPE<sup>4</sup>).

A extração consistia em adicionar 50 µL de uma solução de Cefalexina 3 µg/mL (Padrão Interno) e 400 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Ácido Fosfórico) 3 % a uma alíquota de 250 µL de plasma sanguíneo. Após agitação, transferiu-se a mistura para um cartucho de extração em fase sólida a base de copolímeros de HBL (*Hidrophilic-Lipophilic Balance*) previamente condicionados com metanol e água. A mistura foi centrifugada por 2 minutos para retenção do ativo e do padrão interno na base sólida com conseqüente descarte do plasma. Os ativos retidos foram eluídos para um tubo de ensaio adicionando 600 µL de CH<sub>3</sub>CN (Acetonitrila) ao cartucho de fase sólida (SPE) e novamente levado para centrífuga.

As amostras extraídas foram colocadas em um HPLC SHIMADZU ADVp com coluna cromatográfica analítica Chromolith C18 (50 mm x 4,6 mm d.i.) da Merck operada a temperatura ambiente. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min e com um sistema divisor de fluxo 1:10, na qual foi obtido um fluxo de 80,0 µL/min para o espectrômetro de massas. Foram injetados 20 µL de cada amostra que foram mantidas a uma temperatura ambiente no auto amostrador.

O espectrômetro de massas Quatro LC da Micromass-Waters foi operado em modo de ionização *electrospray positiva* (ESI+) sendo os íons monitorados pelo MRM (Monitoramento Múltiplo de Reação) com as condições de descritas na Tabela 2.

---

Do ingles <sup>4</sup> Solid Phase Extraction



Tabela 2 - Parâmetros de utilização do Espectrômetro de Massas

Analito	Parent (Da)	Daughter (Da)	Dwell (s)	Cone (V)	Coll Energy (eV)
Amoxicilina	366,00	349,10	0,5	15,00	10,00
Cefalexina	348,10	158,00	0,5	15,00	10,00

Exemplo de uma amostra de plasma sanguíneo branco contaminado com solução padrão de Amoxicilina, após a extração por em fase sólida e analisada em HPLC com coluna C18 50 x 4,6 mm e com detecção em Espectrometria de Massas sendo 366,0 e 349,10 as massas monitoradas dos íons *parent* e *daughter* respectivamente, é apresentada na Figura 5.

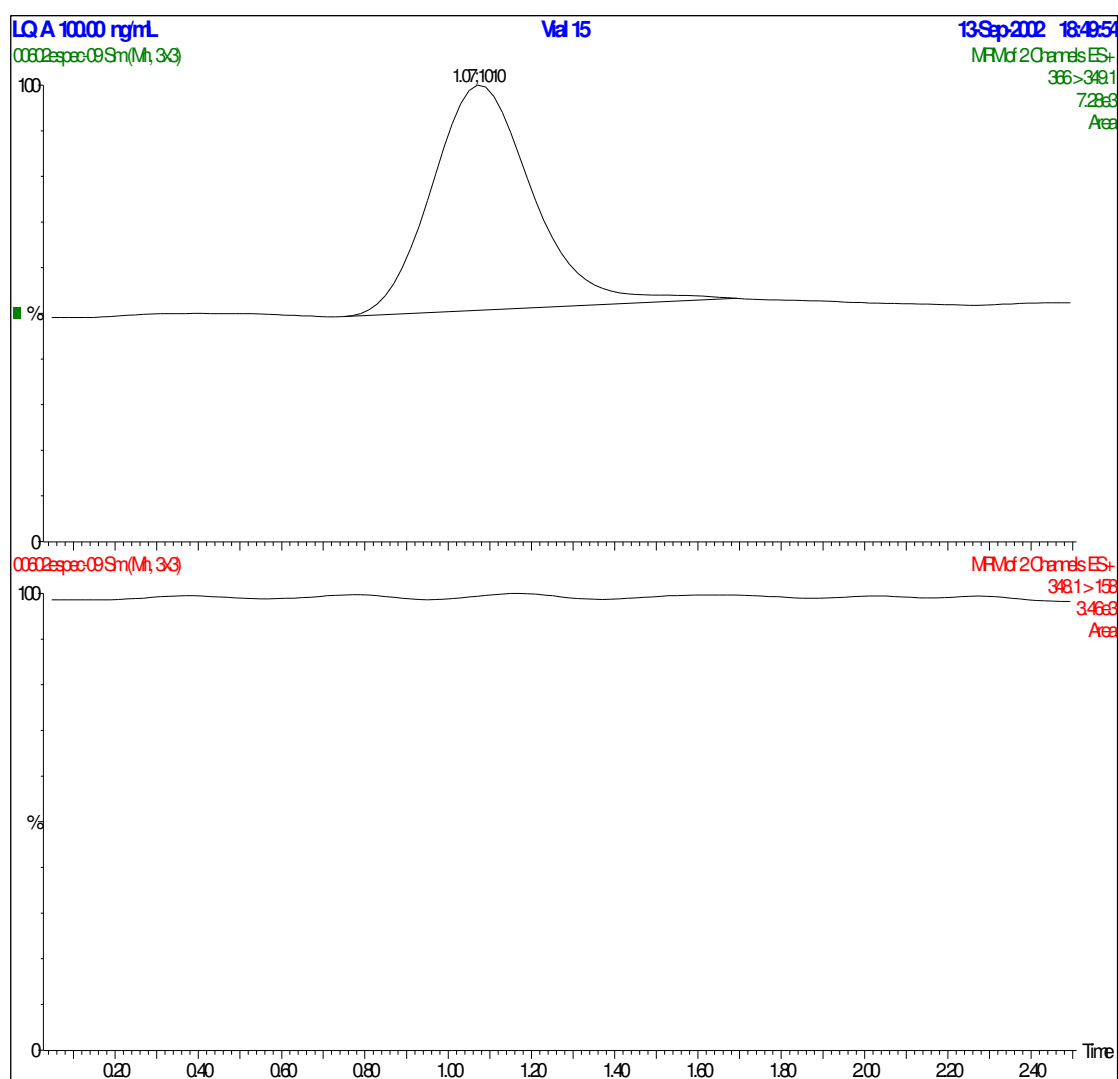


Figura 5 - Cromatograma de Amoxicilina 100 ng/mL em plasma sanguíneo.

A Figura 6 demonstra um exemplo de uma amostra de plasma sanguíneo branco contaminado com solução do padrão interno de Cefalexina, extraída por fase sólida e analisada em HPLC com coluna C18 50 x 4,6 mm e com detecção em Espectrometria de Massas sendo 348,10 e 158,00 as massas monitoradas dos íons *parent* e *daughter* respectivamente.

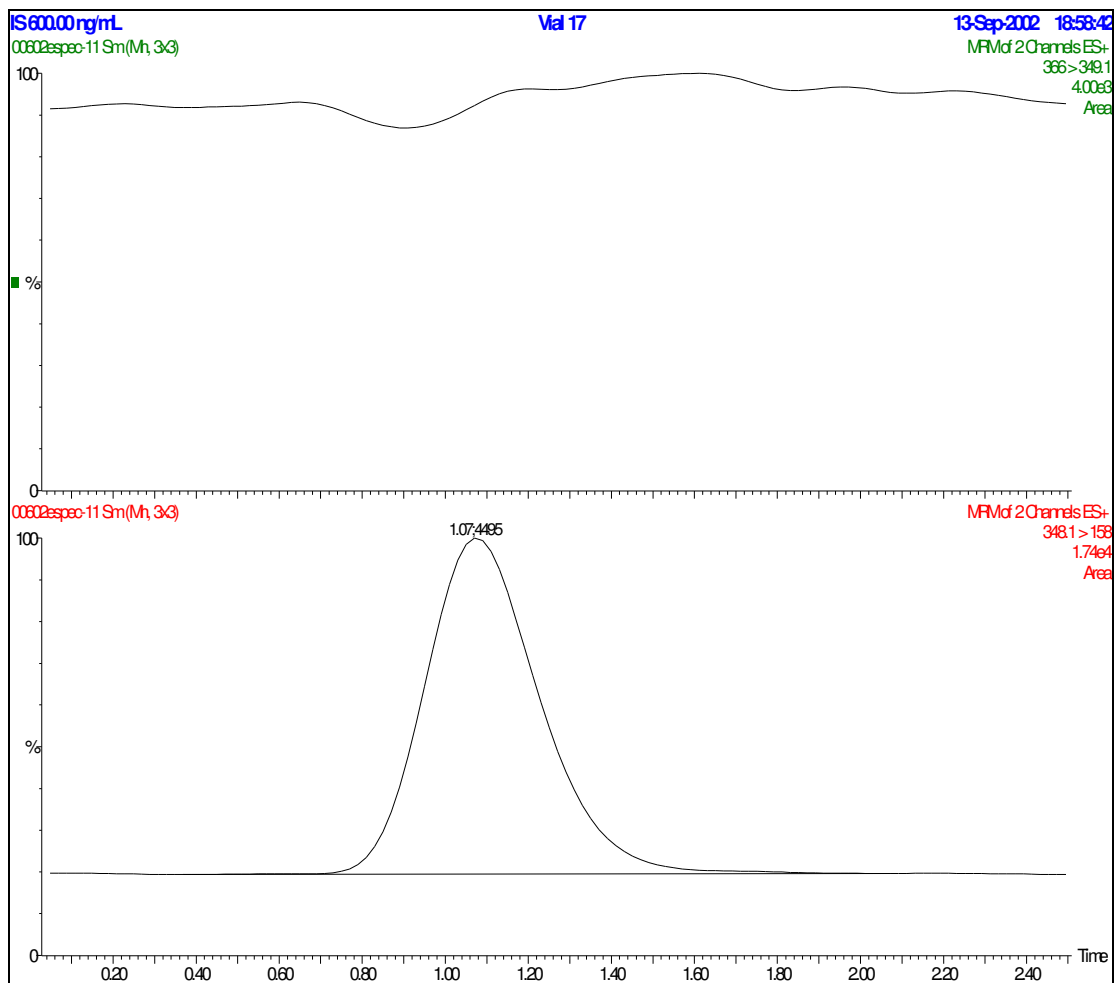


Figura 6 - Cromatograma do padrão interno Cefalexina 600 ng/mL em plasma sanguíneo.

Para quantificação das amostras, curvas de calibração foram construídas com oito concentrações diferentes dentro da faixa de trabalho de 100 ng/mL a 15000 ng/mL. O método foi previamente validado nesta faixa comprovando sua especificidade, linearidade ( $r > 0,99$ ), precisão (DPR < 15 %), exatidão ( $\pm 15$  %), estabilidade (amostras congeladas por 90 dias a  $-20$  °C e após extração estáveis por 24 h), robustez e limites de detecção/quantificação (100 ng/mL).

Curva de calibração construída com amostras de plasma sanguíneo branco contaminada com soluções padrões de Amoxicilina e Cefalexina, extraída por fase sólida e analisada em HPLC com coluna C18 50x4,6mm e com detecção em Espectrometria de Massas é apresentada na Figura 7, exemplificando a linearidade obtida pelo método analítico com um coeficiente de correlação linear (r) acima de 0,99.

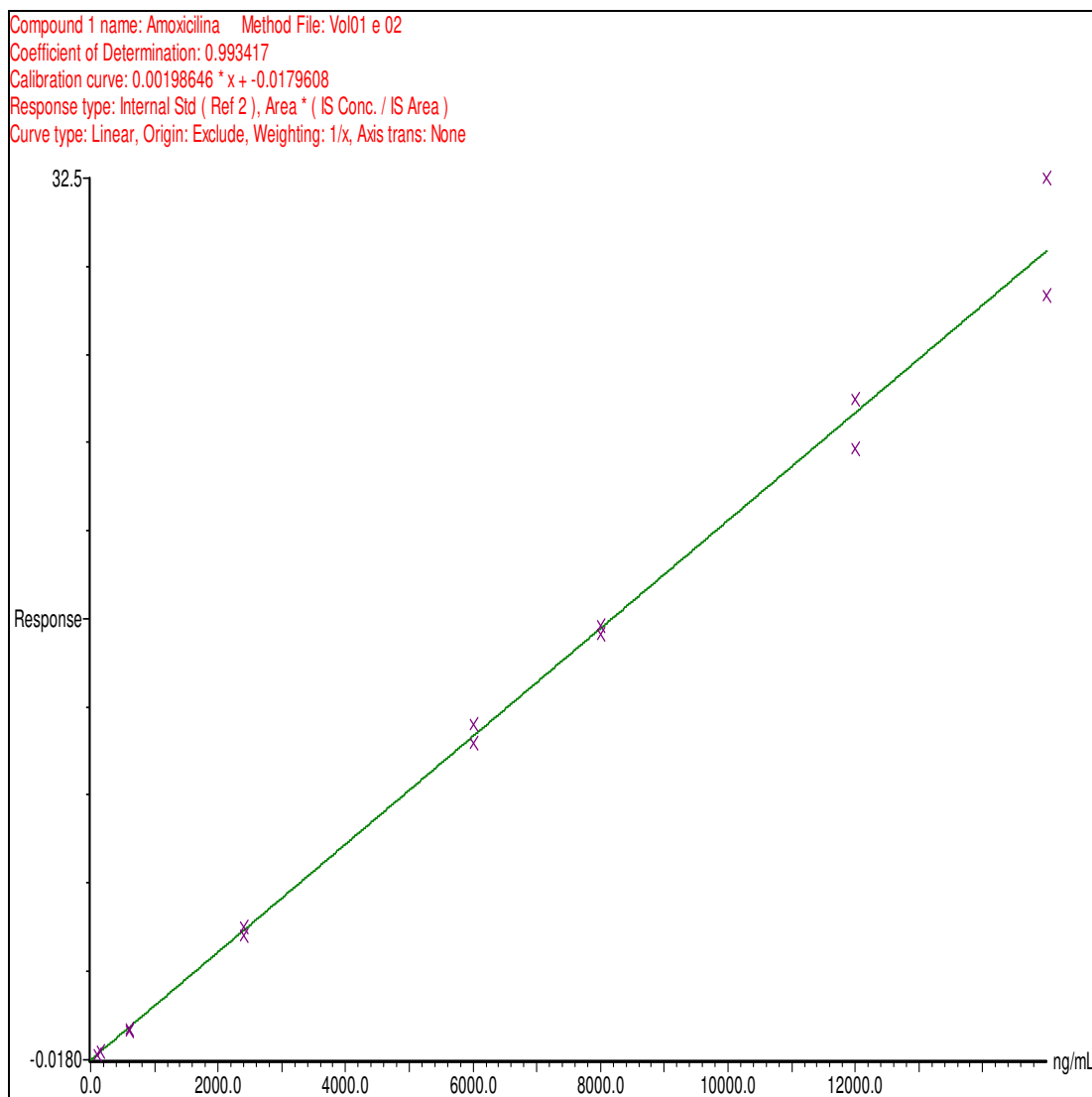


Figura 7 - Curva de calibração ( $r = 0,993417$ ) de Amoxicilina na faixa de 100 a 15000 ng/mL utilizando Cefalexina como padrão interno.

A precisão e exatidão do método analítico foram verificadas utilizando valores obtidos de oito amostras de concentração conhecida, conforme demonstrado nas Tabelas 3 a 5. Estas verificações foram realizadas por dois analistas diferentes

em dias diferentes, podendo assim observar a precisão intermediária do método analítico, como mostra a Tabela 6.

Tabela 3 - Precisão e Exatidão do método bioanalítico (1º dia, Analista I).

Amostra	100 ng/mL	150 ng/mL	6000 ng/mL	12000 ng/mL
1	106,6	138,0	5614,6	11584,1
2	105,6	148,0	5975,9	11488,8
3	107,7	162,8	6075,1	7363,8
4	108,0	66,2*	4560,0	11578,9
5	83,9	154,7	6280,7	10248,6
6	111,3	165,4	6411,0	6995,1*
7	114,4	155,1	5053,6	11723,6
8	100,5	170,8	6335,9	10773,3
Média	104,8	156,4	5788,4	10680,2
Precisão	8.93 %	7.12 %	11.55 %	14.59 %
Exatidão	104.75 %	104.27 %	96.47 %	89.00 %

\* Amostras não utilizadas nos cálculos por terem apresentado problemas nos cartuchos de extração.

Tabela 4 - Precisão e Exatidão do método bioanalítico (1º dia, Analista II).

Amostra	100 ng/mL	150 ng/mL	6000 ng/mL	12000 ng/mL
1	108,3	132,1	5508,1	11826,7
2	103,9	148,5	6013,7	11942,2
3	113,0	169,1	6166,7	7341,8*
4	108,1	73,5*	4618,9	11575,7
5	84,0	157,1	6371,2	10272,9
6	116,8	164,4	6405,5	6883,8*
7	113,7	160,9	5267,1	11818,7
8	101,5	169,1	6450,0	10891,3
Média	106,2	157,3	5850,2	11387,9
Precisão	9.71 %	8.43 %	11.26 %	5.84 %
Exatidão	106.16 %	104.88 %	97.50 %	94.90 %

\* Amostras não utilizadas nos cálculos por terem apresentado problemas nos cartuchos de extração.

Tabela 5 - Precisão e Exatidão do método bioanalítico . (2º dia, Analista I).

Amostra	100 ng/mL	150 ng/mL	6000 ng/mL	12000 ng/mL
1	100,2	148,9	5886,5	12181,8
2	95,3	140,9	6082,7	11730,0
3	88,3	130,6	5322,3	10602,3
4	88,0	119,7	5648,4	12080,8
5	95,8	151,3	5749,9	10295,3
6	94,9	158,9	0,0*	11359,0
7	96,2	113,2	5939,0	12553,9
8	87,7	128,7	5908,7	11605,1
Média	93,3	136,5	5791,1	11551,0
Precisão	5.02 %	11.79 %	4.30 %	6.73 %
Exatidão	93.30 %	91.02 %	96.52 %	96.26 %

\* Amostras não utilizadas nos cálculos por terem apresentado problemas nos cartuchos de extração.

Tabela 6 - Precisão Intermediária e Exatidão do método bioanalítico de Amoxicilina

Amostra	100 ng/mL	150 ng/mL	6000 ng/mL	12000 ng/mL
1ª dia Analista I	104,8	156,4	5788,4	10680,2
1ª dia Analista II	106,2	157,3	5850,2	11387,9
2ª dia Analista I	93,3	136,5	5791,1	11551,0
Média	101,4	150,1	5809,9	11206,4
Precisão Intermediária	6.98 %	7.83 %	0.60 %	4.13 %
Exatidão	101.43 %	100.04 %	96.83 %	93.39 %

### 3.1.3 Análise Estatística

Após a quantificação de todas as amostras de cada estudo de bioequivalência, foi realizada uma avaliação estatística onde foram construídas as curvas de concentração plasmática versus tempo para cada voluntário e para a média dos voluntários de cada estudo. Para tal foi utilizado o programa de análise farmacocinética WINOLIN, o qual determinou oito parâmetros farmacocinéticos: Concentração Máximo (Cmax), Tempo Máxima (Tmax), Área sob Curva de zero a 48h ( $ASC_{0-t}$ ), Área sob Curva de zero a infinito ( $ASC_{0-inf}$ ), Tempo de Meia Vida ( $T_{1/2}$ ), Clearance (CL), Volume de Distribuição (VD) e Constante de Eliminação (Kel) individualmente e a média dos voluntários de cada estudo.

A avaliação da bioequivalência foi determinada pelo mesmo programa baseado nos parâmetros de Cmax e  $ASC_{0-t}$ , sendo considerados bioequivalentes quando o intervalo de confiança (IC) calculado de 90 % para as razões de  $ASC_{0-t}$  teste /  $ASC_{0-t}$  referência,  $ASC_{0-inf}$  teste /  $ASC_{0-inf}$  referência e Cmax teste / Cmax referência entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos do medicamento teste e medicamento referência estiverem compreendidos entre 80 a 125 %.

## 3.2 Métodos Quimiométricos

A análise quimiométrica foi realizada utilizando um programa francês em base MS-DOS denominado SPADn fornecido pelo Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás sendo aplicado ao conjunto de dados as Técnicas de Análise de Componentes Principais (PCA) e de Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA). Os gráficos foram melhorados pelo programa ORIGIN, versão 5.0.

Componentes principais foram geradas a partir da combinação linear dos oito parâmetros originais obtidas nos estudos de bioequivalência, construídas de forma ortogonais entre si. Elas foram construídas em ordem decrescente da quantidade de variância que descreve, o que significa que a primeira componente principal (PC1) descreve a direção da maior variação dos dados, a segunda componente principal (PC2) é ortogonal à primeira e descreve o máximo de variância restante, e assim sucessivamente para as componentes seguintes.

Com a determinação das componentes principais realizou-se a Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA). A HCA exibiu os dados em um espaço bidimensional, de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais assumindo que a distância entre os pontos (objetos ou variáveis) reflete a similaridade de suas propriedades, portanto, quanto mais próximos os pontos no espaço amostral maior a similaridade. Os resultados foram gerados na forma de gráficos, que agrupam objetos ou variáveis em função das similaridades ou das distâncias em gráficos.

Estas medidas de similaridade foram determinadas pelo cálculo da distância euclidiana e do coeficiente de correlação, permitindo o agrupamento de classes através das técnicas do vizinho mais próximo.

## **4 Resultados e Discussões**

Foram utilizadas 300 amostras biológicas de onde foram obtidos os oito parâmetros farmacocinéticos: Concentração Máxima ( $C_{max}$ ), Área sob Curva de zero a 48h ( $ASC_{0-t}$ ), Área sob Curva de zero a infinito ( $ASC_{0-inf}$ ), Tempo Máximo ( $T_{max}$ ), Tempo de Meia Vida ( $T_{1/2}$ ), Constante de Eliminação ( $K_{el}$ ), Volume de Distribuição (VD) e Clearance (CL). Os valores médios determinados dentro de cada grupo de voluntários que participaram do estudo são demonstrados na Tabela 7.

### **4.1 Avaliação da Bioequivalência pela etapa estatística**

Para a avaliação da bioequivalência entre medicamentos de um mesmo estudo é utilizada uma estatística, onde são observados se os valores de Concentração Máxima ( $C_{max}$ ) e Área Sob a Curva ( $ASC_{0-t}$ ) apresentavam ou não, valores semelhantes entre si para o medicamento teste e de referência. Os resultados finais de cada estudo consideraram os medicamentos teste e referência bioequivalentes.

Entretanto, para realizar uma avaliação entre os medicamentos utilizados em diferentes estudos de bioequivalência, segundo a legislação vigente, a razão de Concentração Máxima e de Área Sob a Curva de zero a 48 horas foi calculada e observada se os valores estariam dentro da faixa especificada pela legislação (85 a 125 %). Os resultados destes cálculos são apresentados nas Tabelas 8 e 9 para o parâmetro  $C_{max}$  e nas Tabelas 10 e 11 para o parâmetro  $ASC_{0-t}$ .



Tabela 7 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos nos estudos de bioequivalência (valores médio dos voluntários)

Estudo	Medicamento	Cmax ng/mL (DPR %)	ASC <sub>0-t</sub> hr*ng/mL (DPR %)	ASC <sub>0-inf</sub> hr*ng/mL (DPR %)	Tmax hr (DPR %)	T1/2 hr (DPR %)	Kel 1/hr (DPR %)	VD mL (DPR %)	CL mL/hr (DPR %)
1 (2002)	A	4380,55 (27,3)	11562,61 (23,9)	11847,54 (23,6)	1,50 (45,6)	1,11 (19,3)	0,647 (19,7)	68706,96 (27,7)	43257,72 (22,6)
	B	4120,77 (31,6)	10155,49 (28,3)	10510,21 (27,3)	1,50 (46,7)	1,06 (15,8)	0,670 (15,6)	74814,23 (30,,0)	49074,00 (27,2)
2 (2004)	C	8744,70 (29,0)	27072,89 (26,3)	27404,78 (26,0)	2,50 (28,9)	1,28 (12,4)	0,550 (13,6)	34325,79 (23,6)	18757,71 (23,1)
	D	8566,01 (29,7)	26215,29 (23,2)	26506,26 (23,9)	2,00 (39,4)	1,27 (13,5)	0,560 (14,5)	34915,18 (19,0)	19293,99 (20,3)
3 (2004)	E	4550,72 (29,4)	13545,35 (22,9)	13918,01 (22,9)	2,00 (41,5)	1,14 (18,1)	0,630 (18,9)	59840,16 (23,0)	36982,81 (25,8)
	F	4191,24 (42,8)	13424,70 (25,9)	13730,23 (25,5)	2,00 (51,6)	1,10 (18,3)	0,650 (17,3)	59383,31 (29,4)	37663,65 (27,1)
4 (2003)	G	7015,88 (28,7)	17070,48 (14,7)	17351,12 (14,7)	1,25 (28,6)	1,13 (16,4)	0,630 (18,5)	47442,40 (20,9)	29235,35 (16,3)
	H	7548,34 (28,6)	17340,58 (17,3)	17627,59 (17,1)	1,00 (33,7)	1,14 (18,4)	0,634 (22,5)	46969,04 (24,7)	28800,41 (20,0)
5 (2005)	I	9823,09 (26,3)	26065,99 (29,6)	26449,00 (29,5)	1,25 (50,9)	1,21 (18,9)	0,590 (18,2)	34454,12 (38,7)	19638,19 (27,4)
	J	8888,73 (32,8)	22660,00 (34,1)	23062,04 (33,8)	1,25 (36,9)	1,22 (16,3)	0,580 (15,1)	39612,38 (34,1)	22669,51 (30,8)
6 (2006)	K	9508,06 (29,1)	24440,27 (20,6)	24784,75 (20,3)	1,33 (36,9)	1,25 (53,6)	0,630 (28,3)	37517,25 (53,1)	20967,25 (20,4)
	L	9866,03 (22,6)	24008,76 (19,4)	24377,85 (19,5)	1,35 (49,9)	1,08 (17,5)	0,660 (18,0)	32719,39 (21,7)	21218,63 (18,5)

Legenda: A, C e E medicamentos referência de Amoxicilina 500 mg cápsulas do mesmo fabricante de diferentes lotes; B, D e F medicamentos teste de Amoxicilina 500 mg cápsulas de diferentes fabricantes; G, I e K medicamentos referência de Amoxicilina 250 mg/ 5 mL suspensão do mesmo fabricante de diferentes lotes; H, J e L medicamentos teste de Amoxicilina 250 mg/5 mL cápsulas de diferentes fabricantes.

Tabela 8 - Razão em porcentagem entre a média das concentrações máximas (Cmax) entre dois medicamentos na forma de cápsula

Medicamento	Razão (%)	Medicamento	Razão (%)	Medicamento	Razão (%)
A/B	94,07	B/C	47,12	C/E	192,16
A/C	50,09	B/D	48,11	C/F	208,64
A/D	51,14	B/E	90,55	D/E	188,23
A/E	96,26	B/F	98,32	D/F	204,38
A/F	104,52	C/D	97,96	E/F	92,10

Tabela 9 - Razão em porcentagem entre a média das concentrações máximas (Cmax) entre dois medicamentos na forma de suspensão

Medicamento	Razão (%)	Medicamento	Razão (%)	Medicamento	Razão (%)
G/H	107,59	H/I	76,84	I/K	107,58
G/I	71,42	H/J	84,92	I/L	102,11
G/J	78,93	H/K	82,67	J/K	97,34
G/K	76,83	H/L	78,46	J/L	92,40
G/L	72,93	I/J	90,49	K/L	105,35

Considerando a variável Cmax observa-se que as comparações entre os medicamentos A, B, E e F na forma de cápsula (Tabela 8) seriam bioequivalentes enquanto que a comparação destes com os medicamentos C e D observa-se a não bioequivalência. Entretanto a razão entre os medicamentos C e D apresentam a bioequivalência, devido a participar do mesmo estudo de bioequivalência.

Para os medicamentos na forma de suspensão (Tabela 9) observa-se que das 15 comparações, 9 comparações foram aprovadas e 6 reprovadas. Entretanto as reprovações apresentam valores próximos aos limites especificados (80 a 125 %), ou seja, as razões estariam maiores que 70 % entre os dois medicamentos observados.

Tabela 10 - Razão em % entre a média das áreas sob a curva ( $ASC_{0-t}$ ) entre dois medicamentos na forma de cápsula.

Medicamento	Razão (%)	Medicamento	Razão (%)	Medicamento	Razão (%)
A/B	87,83	B/C	37,51	C/E	199,87
A/C	42,71	B/D	38,74	C/F	201,66
A/D	44,10	B/E	74,97	D/E	193,54
A/E	85,36	B/F	75,65	D/F	195,28
A/F	86,13	C/D	96,83	E/F	99,11

Tabela 11 - Razão em % entre a média das áreas sob a curvas ( $ASC_{0-t}$ ) entre dois medicamentos na forma de suspensão.

Medicamento	Razão (%)	Medicamento	Razão (%)	Medicamento	Razão (%)
G/H	101,58	H/I	66,53	I/K	108,79
G/I	65,49	H/J	76,53	I/L	110,44
G/J	75,33	H/K	72,38	J/K	94,58
G/K	71,25	H/L	73,47	J/L	96,01
G/L	72,33	I/J	86,93	K/L	98,51

Observando o parâmetro de  $ASC_{0-t}$  as comparações entre os medicamentos A, B, E e F na forma de cápsula (Tabela 10) apresentaram resultados bioequivalentes e não bioequivalentes, sendo que os foram reprovados valores próximos as especificações. Porém, para as comparações destes com os medicamentos C e D certamente seriam reprovados (não bioequivalentes), pois os valores de razão encontram-se abaixo de 50 % ou próximos a 200 %.

Para os medicamentos na forma de suspensão (Tabela 11) observa-se uma situação semelhante ao da variável  $C_{max}$ , pois se verificou comparações bioequivalentes e não bioequivalentes onde os resultados reprovados apresentaram valores de razão próximos aos limites da especificados (80 a 125 %).

A definição da intercambialidade entre as formulações com estas comparações demanda certo tempo, dificultando a observação, pois existe a necessidade de vários cálculos e conseqüentemente muitas observações e comparações com o mesmo medicamento necessitam ser avaliadas.

## 4.2 Avaliação da intercambialidade através da Quimiometria

A aplicação da técnica de análise PCA permitiu a avaliação dos medicamentos estudados, utilizando 8 parâmetros farmacocinéticos determinados nos estudos de bioequivalência, ao contrário dos resultados apresentados no item 4.1, onde cada avaliação foi realizada entre dois medicamentos sendo observado variável por variável.

Para a determinação das PCA's o programa SPADn executou uma normalização dos dados através de um auto-escalamento determinando os auto vetores (loadings) e os auto valores (scores), ou seja, determinou os valores das variância dos dados após a transformação para um espaço descrito pelos eixos bidimensionais ou multidimensionais, conforme apresentados na Tabela 12. O uso da PCA no conjunto de dados farmacocinéticos permitiu que mais de 93 % das informações estivessem presentes em um gráfico bidimensional e mais de 98 % nas três primeiras componentes principais.

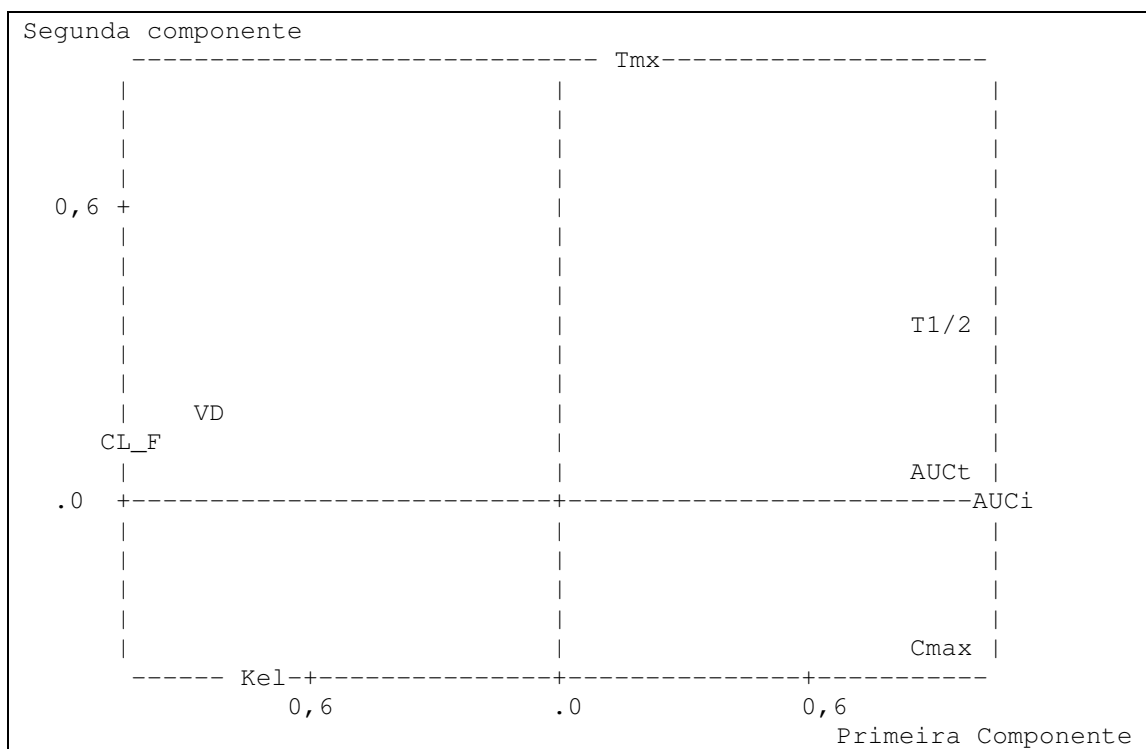
Tabela 12 - Resultados das componentes principais nos dados farmacocinéticos obtidos através do programa SPADn.

Nº componente principal	Auto vetores	Porcentagem de informação	Porcentagem Acumulada
1	6,0660	75,83 %	75,83 %
2	1,4051	17,56 %	93,39 %
3	0,3750	4,69 %	98,08 %
4	0,0965	1,21 %	99,28 %
5	0,0520	0,65 %	99,93 %
6	0,0051	0,06 %	100 %

Com as representações gráficas (Figuras 7 e 8) das variáveis e dos medicamentos (indivíduos) nestes eixos, foi possível avaliá-los. Os gráficos foram obtidos pelo programa SPADn e alguns adaptados ao programa ORIGIN.

Na Figura 8, observa-se que as variáveis praticamente formaram dois agrupamentos onde aquelas que são mais relacionadas com absorção do fármaco ( $C_{max}$  e AUC) se encontram ao lado direito da primeira componente principal (CP1), enquanto

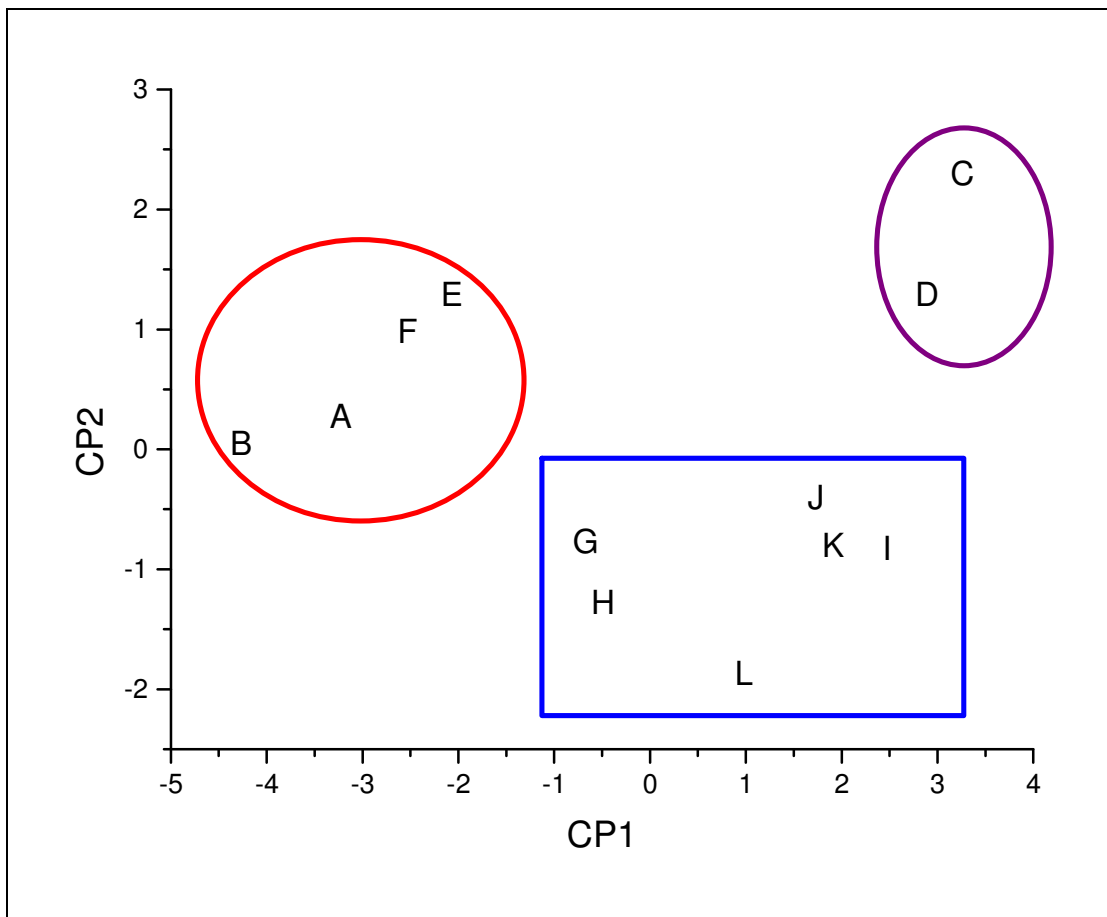
as relacionadas com a eliminação do fármaco ( $K_{el}$ ,  $CL_F$  e  $VD$ ) se encontram no lado esquerdo desta mesma componente, indicando a correlação dentro do mesmo agrupamento e a não correlação entre os dois agrupamentos. Assim a técnica de PCA poderá ser aplicada aos dados farmacocinéticos em questão, uma vez que a correlação dos valores apresentados por estas variáveis, realmente possui este comportamento na biodisponibilidade de fármacos.



( $T_{max}$  – Tempo Máximo;  $CL_F$  – Clearance;  $VD$  – Volume de Distribuição;  $K_{el}$  – Constante de Eliminação;  $T_{1/2}$  – Tempo de Meia Vida;  $AUC_t$  – Área Sob a Curva de zero a 48h;  $AUC_i$  – Área Sob a Curva de zero ao infinito;  $C_{max}$  – Concentração Máxima)

Figura 8 - Representação gráfica dos 8 parâmetros farmacocinéticos apresentados na Tabela 7 para CP1 e CP2

A Figura 9 representa as coordenadas dos medicamentos nas CP1 e CP2, observando uma distribuição em todos os quadrantes do gráfico que após a aplicação de HCA apresentou o agrupamento destes medicamentos em grupos de acordo sua similaridade, possibilitando a classificação destes medicamentos em classes distintas.



[(A; B; C; D; E; F) – Medicamento Cápsula (A; B; C; D; E; F); (G; H; I; J; K; L) – Medicamento Suspensão (G; H; I; J; K; L)]

Figura 9 - Representação gráfica dos medicamentos ordenados nas CP1 e CP2 e classificações da HCA.

A análise de HCA classificou os medicamentos em três classes (Figura 9), além de indicar quais as variáveis de maior importância para estas classificações. Na primeira classe os medicamentos A, B, E e F em forma de cápsulas foram considerados similares devido ao fato que todos estes apresentaram Volume de Distribuição (VD) e Clearance (CL) maior em relação aos demais medicamentos, conforme apresentados na Tabela 7. Estes medicamentos também apresentam Área sob Curva de zero a 48h ( $ASC_{0-t}$ ), Área sob Curva de zero a infinito ( $ASC_{0-inf}$ ) e Concentração Máxima ( $C_{max}$ ) menores em relação à média de todos os demais medicamentos testados.

A Figura 9 também representa uma similaridade dos medicamentos que apresentaram um Tempo Máximo ( $T_{max}$ ) menor do que a média geral, assim foram classificados em uma segunda classe, representada pelas formulações G, H, I, J, K, L, ou seja, todos os medicamentos da forma em suspensão.

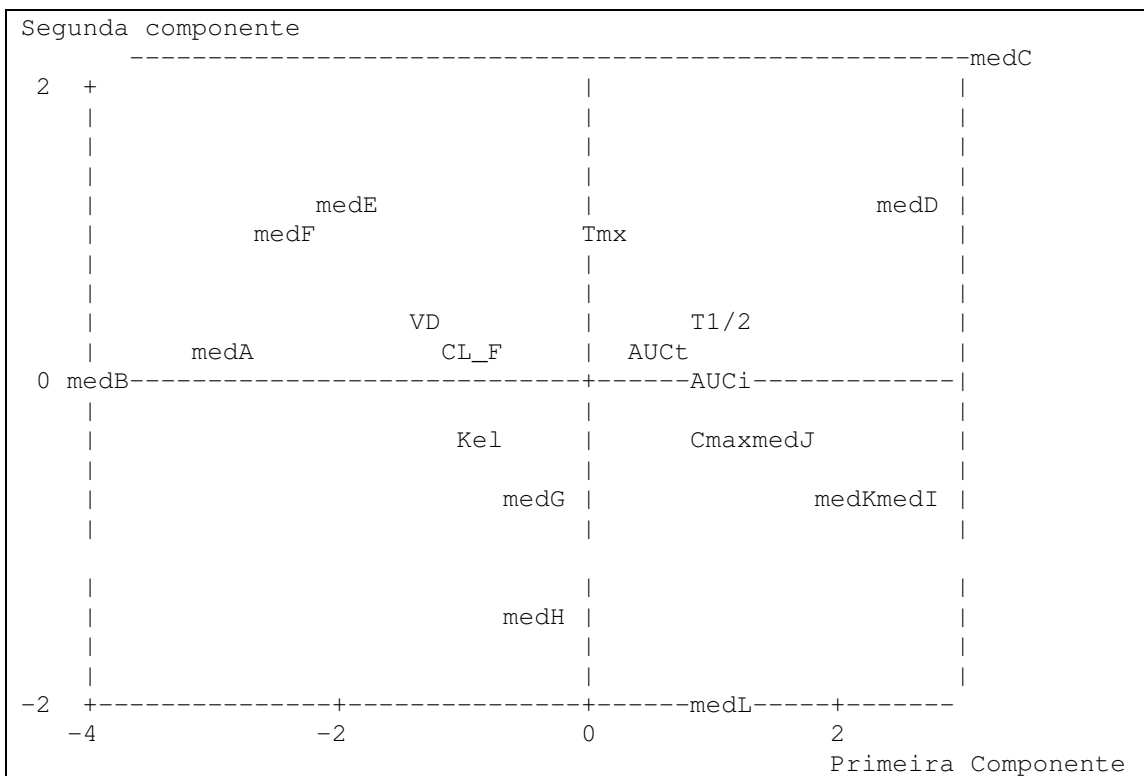
A terceira classe da Figura 9 apresenta os medicamentos C e D (cápsulas) classificados por apresentarem um  $T_{max}$  maior e uma Constante de Eliminação ( $K_{el}$ ) menor, ou seja, os valores de  $T_{max}$  destas formulações estavam superiores em relação aos medicamentos classificados na segunda classe (suspensões) e os valores de  $K_{el}$  menores comparados aos da primeira e segunda classe, formando assim um agrupamento distinto.

As correlações entre os agrupamentos formados e os parâmetros farmacocinéticos de diferenciação destas classes podem ser observadas na Figura 10. Os medicamentos A, B, E e F estão localizados no mesmo quadrante dos parâmetros  $VD$  e  $CL_F$  e distantes dos parâmetros  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  e  $AUC_{0-inf}$  quando comparados as demais formulações. Entretanto as formulações em suspensão (G, H, I, J, K e L) estão bastante próximas dos parâmetros  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  e  $AUC_{0-inf}$  mas a maior característica de sua classe é a distância em relação ao parâmetro  $T_{max}$  confirmando os baixos valores encontrados durante os estudos de bioequivalência. Os medicamentos C e D na forma de cápsulas estão próximos ao  $T_{max}$  e distantes dos parâmetros de  $K_{el}$  caracterizando o terceiro agrupamento.

As classificações realizadas pela análise de HCA vêm de encontro com resultados farmacocinéticos esperados onde a primeira classe apresentou somente medicamentos da forma farmacêutica cápsula enquanto a segunda classe apresentou todos os medicamentos da forma farmacêutica suspensão.

As variáveis que permitiram a classificação também descreveram o perfil farmacocinético esperado para as formas farmacêuticas de Amoxicilina, uma vez que a suspensão permite a absorção do medicamento em um menor tempo em comparação com a cápsula. Isto porque nesta forma o fármaco está em uma fase líquida e sua solubilização é facilitada no trato gastrointestinal. Por outro lado, a solubilização do ativo na forma de cápsula não é facilitada disponibilizando uma menor quantidade do mesmo para absorção e conseqüentemente uma menor concentração de fármaco seria

observada na sua biodisponibilidade. A confirmação pela análise de HCA é demonstrada pelos menores valores de Cmax e AUC comparados aos medicamentos na forma de cápsula.



[med (A; B; C; D; E; F) – Medicamento Cápsula (A; B; C; D; E; F); med(G; H; I; J; K; L) – Medicamento Suspensão (G; H; I; J; K; L); Tmax – Tempo Máximo; CL\_F – Clearance; VD – Volume de Distribuição; Kel – Constante de Eliminação; T1/2 – Tempo de Meia Vida; AUCt – Área Sob a Curva de zero a 48h; AUCi – Área Sob a Curva de zero ao infinito; Cmax – Concentração Máxima]

Figura 10 - Representação gráfica dos medicamentos e das oito variáveis nas CP1 e CP2

No caso da terceira classe com os medicamentos C e D na forma de cápsulas do mesmo estudo de bioequivalência (estudo 2) não foram classificados na primeira classe como esperado inicialmente e, conseqüentemente foi realizada uma avaliação aprofundada nos dados farmacocinéticos obtidos. Foi observado que os valores de todas as variáveis estão com diferenças significativas em relação aos valores das demais cápsulas.

Estes medicamentos também não foram classificados na segunda classe (suspensões) por apresentarem comportamentos farmacocinéticos diferentes pertencendo

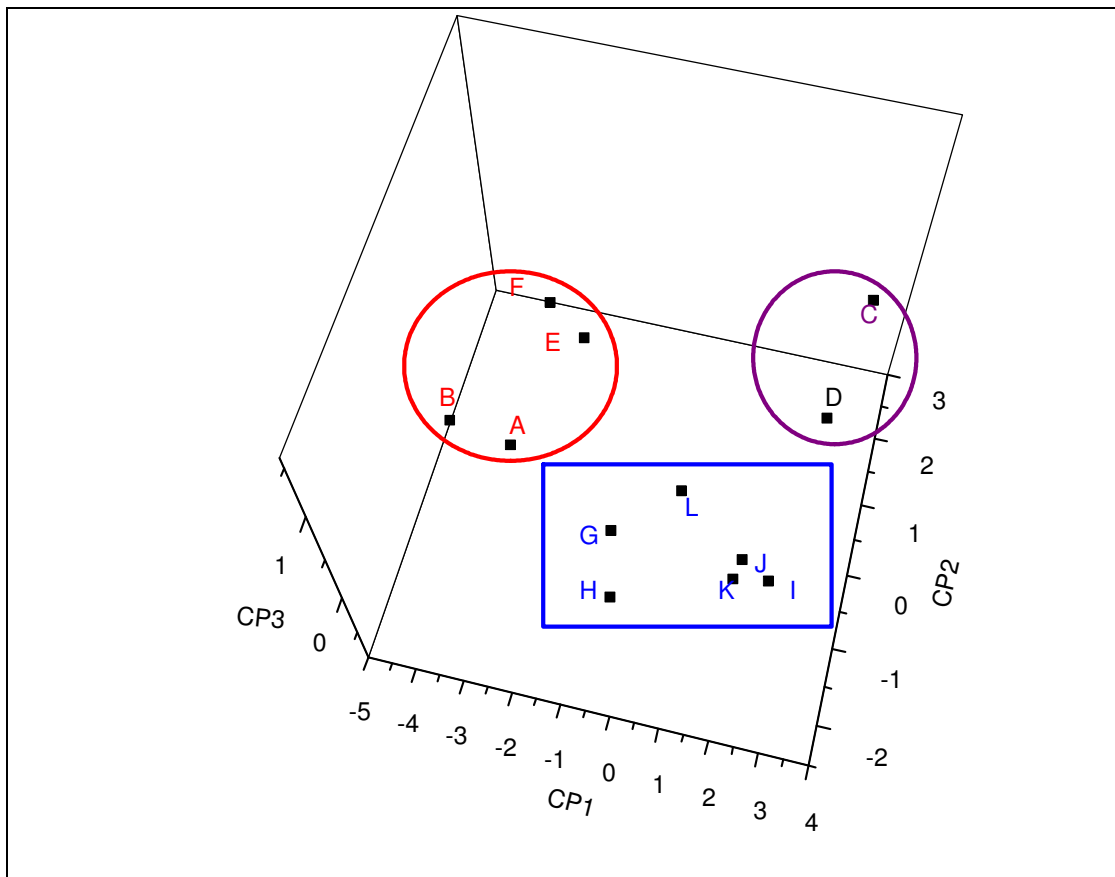


a uma terceira classe, onde em um primeiro momento, poder-se-ia concluir que os medicamentos (C e D) não apresentam a mesma biodisponibilidade em relação às demais cápsulas impedindo sua intercambialidade. Entretanto, como os medicamentos são de um único estudo e a comparação entre as duas formulações demonstra a bioequivalência, existe assim uma grande probabilidade deste estudo ter sido executado com um procedimento diferente em relação aos demais estudos observados.

A Figura 11 demonstra os resultados das análises de PCA e HCA em um gráfico tridimensional (CP1, CP2 e CP3) com as três classes citadas anteriormente. Esta forma de avaliação de estudos de bioequivalência permite uma observação abrangente e detalhada onde verifica-se que os medicamentos na forma de cápsula A, B, E e F apresentam uma similaridade entre os seus perfis farmacocinéticos. A mesma avaliação podemos dizer para os medicamentos na forma de suspensão (G, H, I, J, K e L) indicando assim a intercambialidade entre os mesmo. Enquanto para os medicamentos C e D a análise de componente principais indica que o seu estudo de bioequivalência pode ter sido executado em uma rotina diferenciada.

A mesma análise, foi realizada utilizando os dados farmacocinéticos individuais de cada voluntário dos estudos de bioequivalência. A avaliação destes resultados conclui que devido à própria variabilidade do medicamento impossibilitou o agrupamento em classes. Entretanto, foi possível observar que os dados individuais dos medicamentos em forma de cápsula ficaram mais dispersos nas componentes principais quando comparados aos observados nos medicamentos na forma de suspensão nas componentes principais, sendo o agrupamento em classes pela HCA dificultada.

Trabalhos e pesquisas com a aplicação de técnicas quimiométricas ou estatísticas multivariadas em dados farmacocinéticos não são encontrados, indicando que novas técnicas de avaliação da qualidade de medicamentos podem ser estudadas e aplicadas. O envolvimento de profissionais de outras áreas torna-se importante, pois possibilita que pesquisadores e profissionais da área da saúde extraiam o máximo de informações dos dados levantados podendo assim melhorar seus resultados e obter conclusões mais precisas e completas.



[ (A; B; C; D; E; F) – Medicamento Cápsula (A; B; C; D; E; F); (G; H; I; J; K; L) – Medicamento Suspensão (G; H; I; J; K; L)]

Figura 11 - Representação gráfica dos medicamentos ordenados nas CP1, CP2, CP3 e classificações da HCA.

## **5 Conclusões**

Baseados nos resultados apresentados, a análise quimiométrica confirma seu uso como uma ferramenta poderosa para a classificação de medicamentos em estudos de bioequivalência, pois foram avaliadas diferenciações entre as formas farmacêuticas cápsula e suspensão, diferenciação entre os parâmetros de absorção e eliminação e o agrupamento de medicamentos com dados similares indicando a intercambialidade entre formulações genéricas e referências.

A utilização das técnicas quimiométricas nos dados farmacocinéticos dos 6 estudos de bioequivalência da Amoxicilina na forma de cápsulas e suspensão possibilitou a avaliação da intercambialidade de quatro formulações na forma cápsulas e de seis formulações na forma de suspensão além de indicar uma possível alteração nas rotinas de execução de um estudo de bioequivalência da forma de cápsulas. Desta forma conclui-se que estas técnicas são passíveis de utilização em laboratórios de pesquisa e por agências reguladoras do governo, pois se verificou a qualidade dos estudos de bioequivalência realizados em laboratórios e possibilitam o monitoramento dos medicamentos genéricos e dos medicamentos referências comercializados no país.

## 6 Referências Bibliográficas.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de Boas Práticas em Bioequivalência e Bioequivalência – Módulo 1: Etapa Clínica. Brasília, vol I, p 8 – 9, dezembro. 2002a

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 84, de 19 de março de 2002. Documenta, Diário Oficial da União, 13p. Brasília, março de 2002b

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Documenta, Diário Oficial da União, 3p. Brasília, junho de 2003

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Confiabilidade e garantia da qualidade dos genéricos. 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/profissionais/confiabilidade.htm>> Acesso em: maio 2007

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monitoramento e Regulação do mercado. Mercado de Genéricos no Brasil. 2006. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/monitora/genericos/index.htm>> Acesso em: janeiro de 2008

BELLORIO, Karini Bruno. *Determinação de ranitidina em plasma humano por extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a*

*espectrometria de massas (HPLC-MS-MS) para aplicação em estudos de bioequivalência*. 2003. 127f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

BOFINGER, V.J.; WHEELER, J.L., eds. *Developments in Field Experiment Desings and Analysis*. Australia, CAB, 1975. 196p.

CUNHA, Luis Carlos Cunha. *Farmacocinética Básica*. Goiânia: Faculdade de Farmácia da UFG, 2005. 21 f.

CRAIG, Charles R.; STIZEL, Robert E. *Farmacologia moderna*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 1996. p 51-53, 63

FIUZA, Cláudio Roberto. *Desenvolvimento de metodologia analítica por extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS-MS) para a aplicação em estudos de bioequivalência de Amoxicilina*. 2002. 152f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia

HAIR, Joseph F. Jr.; Anderson, Rolph E.; Tatham, Ronald L.; Black William C. *Análise Multivariada de Dados*. 5º ed. Porto Alegre: Bookaman, 2005.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. 2006/2007. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 18; item 18.58-18.59.

MASSART, D. L; Vandeginste, B. G; Deming, S. N; Michotte, Y; Kaufman, L. *Chemometrics, : A Texbook*, Elsevier; Amsterdan, 1988.

NERDHOST. 2006. Disponível em <<http://www.nerdhost.com.br/noticias/index.php?exe=105&id=401&tipo=3>> Acesso em: maio 2007

NETO, J.M. Moita. 2007. Disponível em  
<[http://criticanarede.com/cien\\_estatistica.html](http://criticanarede.com/cien_estatistica.html)> Acesso em: dezembro 2007

[www.rc.unesp.br/igce/aplicada/4.ACP.pdf](http://www.rc.unesp.br/igce/aplicada/4.ACP.pdf)

PRO-GENÉRICOS. *Mercado mundial de genéricos*. 2006. Disponível em  
<<http://www.progenericos.org.br/mercado.htm#05>> Acesso em: maio 2007

RIBEIRO, Fabiana Alves de Lima; Ferreira, Márcia Miguel Castro. *Análise de Componentes principais como ferramenta para a investigação de contaminação ambiental: um estudo de caso*. Artigo (mestrado em Química - UNICAMP. 2005

ROCHA H. Antibióticos Beta-lactâmicos In: SILVA, P. *Farmacologia*. Sexta edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. cap.101 p. 1025-1026.

RUMEL, David; Nishioka, Sérgio de Andrade; Santos, Adélia Aparecida Marçal dos; *Intercambialidade de medicamentos: abordagem clínica e o ponto de vista do consumidor*. Revista de Saúde Pública ;40(5):921-7. 2006

SHARGEL, L.; YU, A. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 4<sup>a</sup> ed. Rockville: Mc Graw Hill, 1999. 768p.

SOUSA, Rafael Arromba de; Neto, Waldomiro Borges; Poppi, Ronei Jesus; Cadore Solange. *Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES*. Química Nova ;XY(00):1-x,200. 2005

STORPIRTS, Silvia. Rigor da legislação para o registro dos medicamentos genéricos. In: MENDA, Mari Elizabeth (Org). *Manual Médico Medicamentos Genéricos* .São Paulo: Lemos Editorial, 2002. p 51 – 57.

STORPIRTS, Silvia; Marcolongo, Raquel; Gasparotto, Fernanda S.; Vilanova, Crisálida M. *A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos e de referência: bases técnicas e científicas*. 2004 Disponível em <http://www.unifesp.br/comunicacao/jpta/ed159/debate.htm> Acesso em: maio 2007

SWEETMAN, Sean.C. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 33<sup>a</sup> ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2002. p.149 e 150

VALENTE, Vera. Histórico dos medicamentos genéricos. In: MENDA, Mari Elizabeth (Org). *Manual Médico Medicamentos Genéricos*. São Paulo: Lemos Editorial, 2002. p 51 – 57.

ZORZETTO, Ricardo. *Mercado genérico cresce, mas não resolve problema de acesso a remédio*. 2001. Disponível em <http://www.unifesp.br/comunicacao/jpta/ed159/debate.htm> Acesso em: maio 2007

WOLD, S.; Albano, C.; Dunn III, W.; Edlund, U.; Esbensen, K.; Geladi, P.; Johansson, E.; Oindberg, W.; Sjöström, M. *Chemometrics, Mathematics and Statistics in Chemistry*, Kowalski, B.R. Ed .; Nato ASi Series; Cosenza, Italy, p.12, 1983