

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Livia Ignácio da Silva de Mattos

**AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS ATRAVÉS
DE ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS EM RATOS E SUA
APLICABILIDADE AO CONTROLE DE QUALIDADE PÓS-MERCADO
DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS**

Rio de Janeiro

2015

Livia Ignácio da Silva de Mattos

**AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS ATRAVÉS
DE ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS EM RATOS E SUA
APLICABILIDADE AO CONTROLE DE QUALIDADE PÓS-MERCADO
DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientador: Fabio Coelho Amendoeira
Coorientador: Fausto Klabund Ferraris

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Mattos, Livia Ignácio da Silva de

Avaliação da bioequivalência de medicamentos através de estudos farmacocinéticos em ratos e sua aplicabilidade ao controle de qualidade pós-mercado de medicamentos genéricos. / Livia Ignácio da Silva de Mattos. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

73 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2014.

Orientador: Fabio Coelho Amendoeira. Co-orientador: Fausto Klabund Ferraris

1. Medicamentos Bioequivalentes. 2. Amoxicilina. 3. Medicamentos Genéricos. 4. Controle de Qualidade. I. Título

Bioequivalence evaluation of medicines by pharmacokinetic studies in rats and its applicability to after market quality control of generic medicines

Livia Ignácio da Silva de Mattos

**AVALIAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS ATRAVÉS
DE ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS EM RATOS E SUA
APLICABILIDADE AO CONTROLE DE QUALIDADE PÓS-MERCADO
DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: 27 / 02 / 2015

BANCA EXAMINADORA

Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Jorge Carlos Santos da Costa (Doutor)
Fundação Oswaldo Cruz

Marlice Aparecida Sípoli Marques (Doutora)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Fabio Coelho Amendoeira (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fausto Klabund Ferraris (Doutor) – Co-orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

À Deus.

A meus pais e toda a família pelo entusiasmo, incentivo constante e confiança. Ao meu avô por sempre demonstrar orgulho. Minha avó pelo carinho a cada volta para casa.

Ao Guilherme por acreditar mais que eu, pela ajuda e compreensão em todas as etapas. A sua família que faz com que eu me sinta parte dela.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia. Thais e Amanda, sem a ajuda e companhia de vocês eu não teria terminado a tempo. Fabio, por sua disponibilidade, confiança e amizade. Fausto, Esdras, Thiago, Sibeles e Flávia, por todas as histórias, congressos e risadas que tanto aliviavam o estresse do dia-a-dia. Ao Vinícius, pelas incontáveis caronas e companhia para o almoço.

A Terezinha, Melissa e Sônia pelo auxílio e ensino da técnica necessária para realização da potência microbiológica.

A toda equipe do Laboratório SEFAR, pelo empenho no processamento e análise das minhas amostras e, pela disponibilidade de ajuda e esclarecimentos.

As minhas amigas Mariana e Rafaela, por me escutarem todos os dias e dividirem as angústias de uma mestranda, pelas marmitas e todo o companheirismo em casa.

Ao apoio financeiro APQ1/ FAPERJ e CNPQ.

RESUMO

Passados quase 16 anos após o surgimento dos medicamentos genéricos no Brasil em 1999, sua aceitação por parte dos prescritores e da população ainda não chegou a níveis alcançados por países que adotaram a política há mais tempo. A principal desconfiança da população é em relação à qualidade dos produtos devido ao baixo custo e, associações que a palavra “genérico” tem conotação em determinadas frases como sendo algo de pouca qualidade ou incompleto, que não atingiu o esperado, carregando assim uma forma pejorativa de se referir a um produto. Apesar da qualidade destes produtos ser garantida pela resolução RDC nº17/2010 que regulamenta as boas práticas para fabricação de medicamentos, o controle de qualidade pós-mercado ainda deixa a desejar. A análise laboratorial do produto, salvo por motivos de renovação de registro, só é atualmente feita quando há denúncias devido a ocorrência de muitos casos de efeitos adversos ou ineficácia a cerca de um medicamento. Nestes casos, os testes realizados são relativos ao teor, características organolépticas, microbiológicas e potência. Porém, nenhuma dessas verificações gera resultados capazes de comprovar o real comportamento dos fármacos no organismo humano. Com isso, faz-se necessária a realização de estudos que comprovem a segurança e eficácia dos medicamentos genéricos disponíveis no mercado brasileiro para que haja uma maior adesão a este programa de governo. O objetivo deste trabalho foi de desenvolver um modelo animal para testar a biodisponibilidade/ bioequivalência dos medicamentos, uma vez que esses testes são feitos em humanos e possuem alto custo de realização além das implicações éticas. Os resultados obtidos confirmam que o fato dos antibióticos não apresentarem alterações na potência não pode ser associada a eficácia do tratamento. O teste de potência não reprovou nenhuma das formulações testadas, enquanto que a avaliação da bioequivalência *in vivo* foi negativa para um dos medicamentos. Nossos resultados comprovam a necessidade de revisão dos modelos de controle de qualidade utilizados atualmente. E, disponibiliza uma nova e importante opção para utilização no controle de qualidade de medicamentos e, que também pode ser utilizada no desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.

Palavras-chave: Medicamento genérico. Controle de qualidade. Amoxicilina. Modelo animal. Ensaio *in vivo*.

ABSTRACT

After almost 16 years since the beginning of the Brazilian generic medicines politics in 1999, the acceptance from physicians and the general population is unlike that in other countries that have adopted them for a longer time. The main distrust of consumers regarding the quality of the product lies on its lower cost and the association the word “generic” has with some expressions that infer something of poor quality or inefficient, which gives the product pejorative character. Even though the quality of the products is guaranteed by Resolution RDC No. 17/2010, which regulates good practice for the manufacturing of drugs, post-market quality control is still poor. The verification of the product, except for registration and renewal purposes, is currently only performed when there are reports or many cases of adverse events regarding a drug. In these cases, the tests made are content, organoleptic characteristics, microbiological and potency related. However, none of these tests yields results that prove the bioavailability of the drug. Thus, it is necessary to carry out studies to prove the safety and efficacy of generic drugs available in Brazilian market to promote a greater adherence to the program. The goal of this study was to develop an animal model to test the bioavailability / bioequivalence of drugs, once these tests are made in humans and have high costs to execution and ethical questions. The results confirm the fact that antibiotics that don't present changes in potency can't be associated with efficacy of treatment. The in vitro test didn't reprove any of the tested compositions, whereas the in vivo bioequivalence assessment was negative for one the drugs. Our results show the need to review quality control models currently being used. And gives another and important option for the quality control of medicines and also can be used in new drugs development and medicines.

Key words: Generic medicines. Quality control. Amoxicilin. Animal model. In vivo studies.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Esquema de diluição das amostras e do padrão (SQR).....	28
Figura 2 – Placa microbiológica com cilindros.....	29
Figura 3 – Gráfico da potência microbiológica das amostras teste.....	40
Figura 4 – Cromatogramas do teste de seletividade.....	42
Figura 5 – Cromatogramas do teste de efeito residual.....	45
Figura 6 – Resultados dos testes para estabelecimento dos tempos de coleta.....	53
Figura 7 – Curva do teste de bioequivalência do medicamento R e T1 e parâmetros farmacocinéticos.....	55
Figura 8 – Curva do teste de bioequivalência do medicamento R e T2 e parâmetros farmacocinéticos.....	57
Figura 9 – Curva do teste de bioequivalência do medicamento R e T3 e parâmetros farmacocinéticos.....	58

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Concentração das soluções mestre e de trabalho para o analito.....	31
Quadro 2 – Especificações dos equipamentos.....	32
Quadro 3 – Randomização baseada no delineamento de Williams.....	37
Quadro 4 – Resultados dos oito controles do teste de quantificação inicial.....	41
Quadro 5 – Precisão e exatidão obtidos a partir de testes feitos em três dias distintos.....	43
Quadro 6 – Cálculo do fator matriz normalizado.....	44
Quadro 7 – Teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho.....	46
Quadro 8 – Teste de estabilidade em temperatura de armazenamento das soluções de trabalho.....	47
Quadro 9 – Resultados da concentração obtida das amostras teste do teste de estabilidade de pós-processamento.....	48
Quadro 10 – Resultado do teste de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento.....	49
Quadro 11 - Resultados das concentrações experimentais obtidos no teste de estabilidade de curta duração em temperatura ambiente.....	50
Quadro 12 – Resultados das concentrações do teste de estabilidade de longa duração.....	52
Quadro 13 – Análise da bioequivalência do medicamento T1.....	56
Quadro 14 – Análise da bioequivalência do medicamento T2.....	57
Quadro 15 – Análise da bioequivalência do medicamento T3.....	59

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 – Curva de calibração do teste de quantificação inicial.....	41
Gráfico 2 – Curva de calibração do teste de estabilidade de pós-processamento....	48
Gráfico 3 – Curva de calibração do teste de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento.....	49
Gráfico 4 - Curva de calibração do teste de estabilidade de curta duração em temperatura ambiente.....	50
Gráfico 5 – Curva de calibração do teste de estabilidade de longa duração.....	51
Gráfico 6 – Curva do teste dos animais controle.....	54

LISTA DE SIGLAS

ACN – Acetonitrila

AFO – Ácido Fórmico

AMP – Ampicilina

AMX – Amoxicilina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

$ASC_{0-\infty}$ – Área Sobre a Curva de zero ao infinito

ASC_{0-t} – Área Sobre a Curva de zero à última concentração mensurável

BD – Biodisponibilidade

BE – Bioequivalência

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFX – Cefalexina

CLAE-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas

$C_{m\acute{a}x}$ – Concentração máxima

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CQ – Controle de Qualidade

CQA – Controle de Qualidade de Alta concentração

CQB – Controle de Qualidade de Baixa concentração

CQC – Controle de Qualidade de Concentração intermediária

CQD – Controle de Qualidade de Diluição

CQM – Controle de Qualidade de Média concentração

DCB - Denominação Comum Brasileira

DCI – Denominação Comum Internacional

EPR – Erro Padrão Relativo

FE – Fase Estacionária

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FM – Fase Móvel

FMN – Fator Matriz Normalizado

GQ – Garantia da Qualidade

H₂O – Água

IDEC – Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LAB-SEFAR – Laboratório de Farmacocinética

LIQ – Limite Inferior de Quantificação

LSQ – Limite Superior de Quantificação

MOT – Microrganismo de Trabalho

MS – Ministério da Saúde

PI – Padrão Interno

PNM – Política Nacional de Medicamentos

R – Formulação teste de Referência

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

SM – Suspensão Mãe

SME – Solução Mestre

SP – Solução Padrão

SQR – Substância Química de Referência

STB – Solução de Trabalho

T1 – Formulação teste 1

T2 – Formulação teste 2

T3 – Formulação teste 3

TEBSTB – Teste de Estabilidade de Curta Duração das Soluções de Trabalho

TEBCDTA – Teste de estabilidade de curta duração a temperatura ambiente

TEBPP – Teste de estabilidade em pós-processamento

TEBTSTB – Teste de estabilidade em temperatura de armazenamento das soluções de trabalho

TEBCD – Teste de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

TEM – Teste de efeito matriz

TES – Teste de seletividade

TER – Teste de efeito residual

$T_{\text{máx}}$ – Tempo em que a concentração máxima ocorre

TPE – Teste de precisão e exatidão

TQI – Teste de Quantificação Inicial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 POLÍTICA NACIONAL DE MEDICAMENTOS.....	16
1.2 POLÍTICA DOS MEDICAMENTOS GENÉRICOS NO BRASIL E NO MUNDO..	17
1.2.1 Uso e aceitação de medicamentos genéricos no Brasil.....	19
1.3 CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS NO BRASIL	20
1.4 BIODISPONIBILIDADE/ BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS	21
1.4.1 Modelos experimentais para estudo de biodisponibilidade/ bioequivalência..	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 METODOLOGIA	26
3.1 ESCOLHA DO MEDICAMENTO.....	26
3.2 ENSAIO DE POTÊNCIA <i>IN VITRO</i>	26
3.2.1 Preparo da suspensão bacteriana padronizada.....	26
3.2.1.1 <i>Semeadura</i>	26
3.2.1.2 <i>Preparo da suspensão bacteriana</i>	26
3.2.1.3 <i>Padronização do Microrganismo de Trabalho (MOT)</i>	27
3.2.2 Preparo das diluições.....	27
3.2.3 Preparo e leitura de placas.....	28
3.2.4 Análises de dados e tratamento estatístico.....	29
3.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO.....	30
3.3.1 Preparo das soluções.....	30
3.3.2 Condições cromatográficas.....	31
3.3.3 Método de extração.....	32
3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	32
3.4.1 Curvas de calibração.....	32
3.4.2 Teste de quantificação inicial (TQI).....	33
3.4.3 Teste de seletividade (TES).....	33

3.4.4 Linearidade.....	33
3.4.5 Precisão e exatidão.....	33
3.4.6 Teste de efeito matriz (TEM).....	34
3.4.7 Limite inferior de quantificação (LIQ)	34
3.4.8 Teste de efeito residual (TER).....	34
3.4.9 Estabilidade	34
3.5 ENSAIO FARMACOCINÉTICO.....	35
3.5.1 Animais.....	35
3.5.2 Preparo das diluições.....	36
3.5.3 Coleta e preparo das amostras.....	36
3.5.4 Estudo controle.....	37
3.5.5 Recebimento das amostras no LAB-SEFAR.....	37
3.5.6 Preparo dos lotes.....	38
3.5.7 Parâmetros estatístico	38
3.5.8 Análise de dados e tratamento estatístico.....	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 POTÊNCIA MICROBIOLÓGICA.....	39
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	40
4.2.1 Teste de Quantificação Inicial.....	40
4.2.2 Teste de Seletividade.....	41
4.2.3 Teste de Precisão e Exatidão.....	43
4.2.4 Teste de Efeito Matriz.....	44
4.2.5 Teste de Efeito Residual.....	44
4.2.6 Testes de estabilidade.....	46
4.2.6.1 <i>Teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho.....</i>	<i>46</i>
4.2.6.2 <i>Teste de estabilidade em temperatura de armazenamento das soluções de trabalho.....</i>	<i>47</i>

4.2.6.3 <i>Teste de estabilidade de pós-processamento</i>	47
4.2.6.4 <i>Teste de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento</i>	49
4.2.6.5 <i>Teste de estabilidade de curta duração em temperatura ambiente</i>	50
4.2.6.6 <i>Teste de estabilidade de longa duração</i>	51
4.3 ESTABELECIMENTO DOS TEMPOS DE COLETA.....	52
4.4 BIOEQUIVALÊNCIA.....	54
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

A Constituição Federal de 1988 diz que a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantidos mediante políticas sociais e econômicas, acesso universal e igualitário às ações e serviços de saúde (BRASIL, 1988). Contudo, os direitos dos cidadãos não estavam sendo devidamente assegurados com a política adotada pelo governo federal com as atribuições definidas pela Central de Medicamentos (CEME), que tinha como objetivo inicial proporcionar o acesso à população de menor poder aquisitivo aos medicamentos e, regular a produção e distribuição aos estados. Desta forma, no início dos anos 90 o Ministério da Saúde já identificava diversos problemas na gestão da CEME, como a falta de preocupação com o uso racional de medicamentos e na assistência farmacêutica, sendo somente um local de compra e distribuição de medicamentos. O fim da CEME em 1997 abriu a discussão a cerca do acesso aos medicamentos entre os diversos segmentos e, em 30 de outubro de 1998 através da Portaria nº3.916, foi criada a Política Nacional de Medicamentos (PNM) (PORTELA et al, 2010; BRASIL, 1998).

1.1 POLÍTICA NACIONAL DE MEDICAMENTOS

A criação da PNM teve como objetivo garantir segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos, promoção do uso racional e o acesso da população àqueles medicamentos considerados essenciais¹. Suas principais diretrizes foram: adoção e atualização contínua da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) como forma de orientar a padronização da prescrição e abastecimento de medicamentos, principalmente no âmbito do SUS, sendo um mecanismo para redução dos custos dos produtos; regulamentação sanitária de medicamentos, incluindo restrições e suspensão de produtos inadequados ao uso. E ainda, promoção do uso racional de medicamentos; incentivo à produção, principalmente

¹ Segundo a portaria nº 3.916 de 30 de outubro de 1998, medicamentos essenciais são aqueles considerados básicos e indispensáveis para atender a maioria dos problemas de saúde da população. Estes devem estar continuamente disponíveis aos segmentos que deles necessitem. As listas devem ser atualizadas continuamente e são elaboradas em âmbito estadual e municipal, segundo situação epidemiológica de cada região.

àqueles que fazem parte do RENAME e; garantia da segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos. (BRASIL, 1998).

Ainda como parte da PNM, em 1999 o Ministério da Saúde cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999 que, tem como missão, "Proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos, serviços e participando da construção de seu acesso" (BRASIL, 1999). Segundo a Política Nacional de Medicamentos, a criação da ANVISA representa o início da implementação desta política, buscando garantir condições para a segurança e qualidade dos medicamentos consumidos no país (SANT, 2008).

As ações visando à promoção de melhores condições de saúde para a população tiveram início com a PNM, porém nos últimos anos, a maior estratégia para diminuir os custos com mercado de saúde brasileiro foi, sem dúvida, a introdução dos medicamentos genéricos. Além disso, essa estratégia proporcionou à população maior acesso ao tratamento medicamentoso (ANVISA, 1999).

1.2 POLÍTICA DOS MEDICAMENTOS GENÉRICOS NO BRASIL E NO MUNDO

Iniciativa do governo Norte-americano na década de 60, a indústria de medicamentos genéricos foi criada com o objetivo de reduzir os custos dos tratamentos de saúde e ampliar o acesso da população aos medicamentos. Estima-se que a introdução destes nos Estados Unidos, tenha acarretado em uma redução de gastos de aproximadamente nove bilhões de dólares entre os anos de 1997 e 2000 (WARD, 2011).

Segundo Carvalho e colaboradores, o aumento da concorrência ocorre com a entrada de medicamentos genéricos no mercado, além de diminuir o poder das multinacionais com consequente diminuição do preço dos medicamentos. Nos Estados Unidos, que implementaram a mais tempo essa política, os genéricos geram uma economia de até 40% para os consumidores. E, em 10 anos do estabelecimento desses produtos, o preço médio dos medicamentos diminuiu cerca de 30% (Carvalho et al; 2006b).

No Brasil, um relatório do Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC) constatou que 32% dos 65% dos produtos farmacêuticos analisados em relação ao

custo (referência, genérico e similar) em 2009, tiveram aumento acima da inflação (IDEC, 2013). Esse dado contribui para mostrar, um dos motivos, que leva os consumidores de baixa renda a descontinuarem o tratamento medicamentoso de diversas doenças. Outro fato importante que a pesquisa constatou foi que alguns preços de medicamentos genéricos estão mais caros que os de referência, o que contraria uma resolução da Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED) que determina que o preço do genérico deve ser no mínimo 35% menor do que o produto de referência (IDEC, 2013). A explicação técnica para a redução de preço desses produtos é devido a ausência de gastos com pesquisa e desenvolvimento, estudos clínicos necessários ao produto inovador, propaganda e publicidade do novo fármaco (BRASIL, 1998). Contudo, a associação do preço à qualidade dos produtos aliado a falta de esclarecimento da população sobre a produção dos mesmos, dificulta o aumento substancial do consumo de medicamentos genéricos (KAPLAN et al, 2012; SIMOENS, COSTER, 2006; BERTOLDI et al, 2005).

Na África do Sul, um estudo feito em três cidades diferentes entre 2006 e 2008, avaliou a percepção de um grupo de pessoas a cerca da qualidade e aceitação do medicamento genérico e, além disso, realizou alguns testes como dissolução e identificação de princípios ativos. Os autores concluíram que a política de implementação de medicamentos genéricos nesse país, não foi capaz de informar corretamente à população a cerca dos produtos e, a aparente falta de informações em resposta às reclamações sobre a qualidade dos medicamentos. E, apesar de contrastar com alguns dados da literatura mencionados, o estudo não identificou diferenças significativas nos testes realizados, concluindo que os medicamentos atendiam aos padrões de qualidade exigidos laboratorialmente. (PATEL et al, 2012). Já na Europa, estudos mostram que mercados de genéricos já consolidados apresentam vendas acima de 40% e, que o consumo dos genéricos aumenta, quando a troca do medicamento de marca pelo medicamento genérico é incentivada pelo farmacêutico e, quando há um posicionamento favorável ao uso e à prescrição destes. Outro fator que contribui para o aumento do consumo desses produtos, é o tempo de implementação da política, contudo as ações de promoção dos genéricos devem ser contínuas (SIMOENS, COSTER, 2006). Uma revisão de literatura sobre as políticas de promoção dos medicamentos genéricos nos países de baixa e média

renda destaca que uma das principais barreiras para o aumento do consumo desses medicamentos é o desconhecimento sobre o genérico e a percepção de que eles apresentariam qualidade inferior (KAPLAN et al, 2012).

1.2.1 Uso e aceitação de medicamentos genéricos no Brasil

Apesar de todos os esforços para a popularização do medicamento genérico, segundo pesquisa de 2004 da Pró-Genéricos, mesmo com preço reduzido as vendas não se mostravam expressivas representando apenas 9% do mercado nacional em unidades vendidas. Parece haver implicações sociais causadas na população, principalmente em relação à confiabilidade e aceitabilidade desses produtos. Segundo Carvalho e colaboradores, a própria nomenclatura para designar o produto, “genérico” tem conotação em determinadas frases como sendo algo de pouca qualidade ou incompleto, que não atingiu o esperado, carregando assim uma forma pejorativa de se referir a um produto (Carvalho et al, 2006a).

A qualidade pode ser definida como o julgamento que o consumidor faz acerca da superioridade ou excelência de um produto. Ou seja, um produto tem qualidade quando está de acordo com as especificidades de um determinado padrão pré-estabelecido. Segundo pesquisa feita com consumidores residentes em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, a relação preço *versus* qualidade são elementos fundamentais na percepção da qualidade apresentada pelo medicamento genérico. As noções de que o aumento da qualidade está diretamente relacionado ao aumento do preço do produto está clara para a sociedade e pode ser exemplificada até mesmo por ditos populares como: “*o barato sai caro*” e “*o que é bom custa caro*” (Carvalho et al, 2006b). Embora a questão do menor preço para esses medicamentos já ter sido explicado anteriormente, essa ideia pré-concebida dificulta o estabelecimento da confiança dos genéricos para com os consumidores.

Em estudo de Ganther e Kreling, foi mostrado que 70% das pessoas consideram a qualidade do genérico comparável ao do medicamento de referência, sugerindo que a política do governo está bem implementada nesse ponto. Entretanto, de 14% a 53% dos pacientes acreditam que os genéricos apresentam maior risco do que os de marca, variando de acordo com a doença a ser tratada (GANTHER, KRELING, 2000). Embora uma parcela dos consumidores não confie plenamente nos genéricos

como sendo medicamentos iguais aos produtos de referências, estudos mostram que grande parte da população tem informações básicas sobre o que é o medicamento genérico e sua intercambialidade com produtos de referência (CARVALHO et al, 2006b; ROCHA et al, 2007). Bertoldi e colaboradores destacam a possibilidade de confusão entre os medicamentos similares e os genéricos já que para os consumidores a associação da palavra “genérico” com “preço baixo” pode induzir a compra de medicamentos similares² já que este é frequentemente mais barato e ainda, pelo fato de metade dos consumidores entrevistados durante essa pesquisa terem sido incapazes de diferenciar um medicamento genérico de um similar (BERTOLDI et al, 2005).

1.3 CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS NO BRASIL

Em 2002 foi criado pela ANVISA o projeto Rede Sentinela com intuito de estabelecer parceria entre os serviços de saúde brasileiros e órgãos de Vigilância Sanitária Estaduais e Vigilâncias Municipais. Segundo informações disponíveis no site da ANVISA, o objetivo é construir uma rede de serviços capaz de notificar a ocorrência de efeitos adversos e queixas técnicas de produtos de saúde; insumos, materiais e medicamentos, saneantes, kits para provas laboratoriais e equipamentos médico-hospitalares em uso no Brasil, para ampliar e sistematizar a vigilância de produtos utilizados em serviços de saúde (ANVISA, 2012a). Essas informações integrarão o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária Pós-Comercialização auxiliando a agência reguladora nas ações de regulação desses produtos no mercado. Contudo, apesar destas iniciativas o controle de medicamentos pós-mercado ainda é muito incipiente, sendo necessária a busca de novas e eficientes alternativas de monitoramento da qualidade destes produtos.

Para obtenção de registro o medicamento genérico deve comprovar a sua intercambialidade com o medicamento de referência através de testes regulamentados pelo Ministério da Saúde. Estes ensaios só podem ser realizados por centros de pesquisa devidamente habilitados pela Agência Nacional de

² Medicamento similar contém o mesmo ou mesmos princípios ativos, mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica. É equivalente ao medicamento de referência podendo diferir em tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca (BRASIL, 2014).

Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde (ANVISA/MS). Um dos principais testes é o estudo de biodisponibilidade relativa / bioequivalência (BD/BE), onde são comparados dois medicamentos de mesma forma farmacêutica e composição química, sendo um destes o medicamento de referência, utilizado como padrão e o outro medicamento chamado de teste, que corresponderá àquele medicamento que pretende ser com este intercambiável.

1.4 BIODISPONIBILIDADE / BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS

Segundo a ANVISA, biodisponibilidade é definida como a velocidade e a extensão de absorção de um fármaco em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina. E, a bioequivalência é definida como sendo a demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípios ativos, e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental (ANVISA,1999).

O estudo de bioequivalência tem por objetivo comparar as biodisponibilidades de duas ou mais formulações de um mesmo fármaco, considerados equivalentes farmacêuticos e que tenham sido administrados na mesma dose molar de maneira que as formulações possam ser consideradas intercambiáveis. Em farmacologia o termo intercambialidade indica a possibilidade de substituição de um medicamento por outro equivalente terapêutico receitado pelo prescritor (BRAGA, 2008).

Baseado na missão institucional da Anvisa de assegurar que os medicamentos apresentem garantia da eficácia, segurança e qualidade, em 2003, duas importantes resoluções foram publicadas, a RDC nº 133 e a RDC nº 135, ambas de 29 de maio. A primeira dispõe sobre o registro do medicamento similar e, é o primeiro documento a exigir a realização de estudos de bioequivalência relativa para medicamento similar das classes dos antibióticos, anti-retrovirais e antifúngicos, além de informar que todos os medicamentos devem apresentar os resultados dos testes de equivalência farmacêutica (ANVISA, 2003b). Contudo, somente em 2008, cinco anos após a medida, tempo necessário para que todos os medicamentos tenham renovado os registros, os medicamentos passariam a seguir os critérios

estabelecidos nessas resoluções. A RDC nº 135/03 que revoga a RDC nº 84 de 19 de março de 2002 e aprova regulamento técnico para medicamentos genéricos além de determinar as regras a serem seguidas pelas empresas a fim de registrar esse tipo de produto farmacêutico (ANVISA, 2003a).

Contudo, em 02 de março de 2007, foi publicada a RDC nº 17 revoga a RDC nº 133/03 e determina que todos os medicamentos de tarja vermelha devam apresentar os estudos de bioequivalência enquanto que a equivalência farmacêutica continua a ser exigida para todos os medicamentos (ANVISA, 2007). Até o início de 2015, somente os medicamentos genéricos eram por lei considerados intercambiáveis, ou seja, poderiam ser dispensados ao consumidor em substituição ao medicamento de referência por serem os únicos a ter obrigatoriedade em apresentar os testes de bioequivalência/ biodisponibilidade. Mas, em decorrência de todas as medidas citadas anteriormente, em 10 de outubro de 2014 a RDC nº 58 ditou as medidas a serem adotadas para a intercambialidade entre medicamentos similares e medicamento de referência. E, apesar de publicada em 2014, a resolução entrou em vigor dia 1 de janeiro de 2015 e, os fabricantes tem o prazo de um ano para adequarem as bulas com os dizeres: “medicamento similar equivalente ao medicamento de referência” (ANVISA, 2014).

A exigência dos testes de bioequivalência para os medicamentos similares foi um grande passo na busca da eficácia, segurança e qualidade desses produtos com destacada importância. Determinada pela constituição de 1988, regulamentada pela Lei Federal nº 8.666 de 21 de junho de 1993, atualizadas pelas leis nº 8.883/1994 e 10.520/ 2002, a administração pública tem o dever de licitar (BRASIL, 2006), ou seja, a compra dos medicamentos para o setor público é designada pelo preço e não pela qualidade do mesmo. Portanto, a melhora da tríade citada acima, favorece ainda mais a população de baixa renda e sem acesso a outros medicamentos.

1.4.1 Modelos experimentais para estudos de biodisponibilidade / bioequivalência

Os estudos de BD/BE são realizados em seres humanos e devem assegurar a identidade dos produtos (teste e referência) em relação à velocidade da absorção e quantidade do fármaco absorvido (PRÓ-GENÉRICO, 2007). Contudo, os custos da

realização destes testes em humanos são extremamente elevados, restringindo a realização dos mesmos apenas a fase de registro, com os custos cobertos pela própria indústria, impossibilitando uma ação fiscal para avaliação da BE/BD do produto já disponível no mercado, uma vez que a implantação de uma política desta natureza seria proibitiva do ponto de vista financeiro.

Foi demonstrado em um estudo comparativo utilizando 64 medicamentos que modelos experimentais de biodisponibilidade *in vivo* utilizando ratos podem ser usados como um método alternativo eficiente na predição da taxa de absorção gastrointestinal em humanos (CHIOU, BARVE, 1998).

Por outro lado, um estudo efetuado através de extensa revisão bibliográfica de estudos clínicos e pré-clínicos de diversas substâncias administradas por via intravenosa, sugere que apenas primatas não humanos podem ser utilizados como ferramentas eficientes na predição do comportamento farmacocinético de drogas intravenosas em humanos (WARD, SMITH, 2004).

Ramsey e Andersen demonstraram que modelos farmacocinéticos usando substâncias administradas por via inalatória em ratos podem ser seguramente utilizados como base de extrapolação de modelos farmacocinéticos em humanos, principalmente se a substância testada for potencialmente tóxica.

Apesar de a literatura divergir em relação a estudos farmacocinéticos usando roedores, há uma tendência em apontar uma baixa capacidade de predição do comportamento farmacocinético de diferentes fármacos em modelos utilizando ratos. Contudo ainda não está claro se isso é um fenômeno restrito a algumas classes farmacológicas ou vias de administração específicas. Além disso, é fato que o estudo farmacocinético deve ser aplicado ao máximo possível em modelos animais antes de encaminhá-los a estudos em humanos (SINGH, 2006).

O principal objetivo deste trabalho é esclarecer se os modelos de estudos farmacocinético em ratos podem ser eficientes em detectar medicamentos com desvios de qualidade por si. Observando diferenças na cinética de medicamentos de referência quando comparados a medicamentos disponíveis no mercado, o modelo de estudos farmacocinéticos em ratos poderão ser aplicados no controle de qualidade de medicamentos genéricos, sendo a comparação dos modelos entre espécies pouco relevante neste caso. Além disso, a comparação com estudos clínicos de BE/BD já desenvolvidos em humanos poderão ser úteis na avaliação

destes modelos para sua possível utilização como plataforma de desenvolvimento tecnológico aplicável a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

2. OBJETIVOS

Desenvolver e estudar um modelo farmacológico aplicado a estudos de biodisponibilidade / bioequivalência em ratos, seguro e confiável, para aplicação ao controle de qualidade pós-mercado de medicamentos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Levantar junto ao banco de dados do SEFAR/Fiocruz estudos realizados com finalidade de registro de medicamentos genéricos na forma de suspensão ou solução oral, para selecionar o medicamento objeto deste estudo.
- Realizar teste de potência farmacológica com o fármaco selecionado.
- Estabelecer o modelo de estudo com o medicamento selecionado por coleta de sangue da cauda.
- Desenvolver e validar a metodologia analítica para quantificação do medicamento selecionado no plasma de ratos através de CLAE-EM.
- Efetuar um estudo piloto de BD/BE em ratos com diferentes marcas do medicamento genérico selecionado para este estudo com vistas a avaliar a aplicabilidade deste modelo ao controle de qualidade pós-comercialização destes medicamentos.

3. METODOLOGIA

3.1 ESCOLHA DO MEDICAMENTO

Foi feita uma pesquisa nos arquivos do laboratório de serviço de farmacocinética (LAB-SEFAR) com objetivo de escolher o medicamento a ser utilizado no estudo. Para isso, os seguintes critérios foram utilizados: (1) amplo consumo, (2) importância do medicamento no tratamento da doença e potencial risco ao paciente, (3) forma farmacêutica, (4) via de administração e (5) algum resultado negativo para bioequivalência. Após isso, os medicamentos foram adquiridos em farmácias do Rio de Janeiro, o medicamento de referência e mais três marcas de genéricos.

3.2 ENSAIO DE POTÊNCIA *IN VITRO*

Todas as etapas do ensaio foram realizadas no setor de medicamento (antibióticos) do departamento de microbiologia do INCQS/ FIOCRUZ.

3.2.1 Preparo da suspensão bacteriana padronizada:

3.2.1.1 *Semeadura*

O processo teve início com a abertura do suab Kwik-Stik™ da Microbiologics com microrganismo liofilizado *Kocuria rhizophila* ATCC 9341. Fez-se o repique em quatro tubos inclinados de meio 1 (peptona seca, caseína de digestão pancreática, extrato de levedura, dextrose, ágar e água purificada, pH final 6,6) e incubou-se por \pm 22 h em estufa a 32-35 °C. O microrganismo vem na terceira geração e, segundo a Farmacopeia Brasileira, pode-se trabalhar até a quinta geração.

3.2.1.2 *Preparo da suspensão bacteriana*

Verificado o bom crescimento *overnight* sinalizado por bisel amarelo, fez-se a lavagem dos tubos com aproximadamente 5 ml de salina estéril. A suspensão de lavagem de todos os tubos foi transferida para um único tubo e centrifugada por 30

minutos. O sobrenadante foi descartado e a bactéria resuspensa com 20 ml de salina 0,85%.

3.2.1.3 Padronização do Microrganismo de Trabalho (MOT)

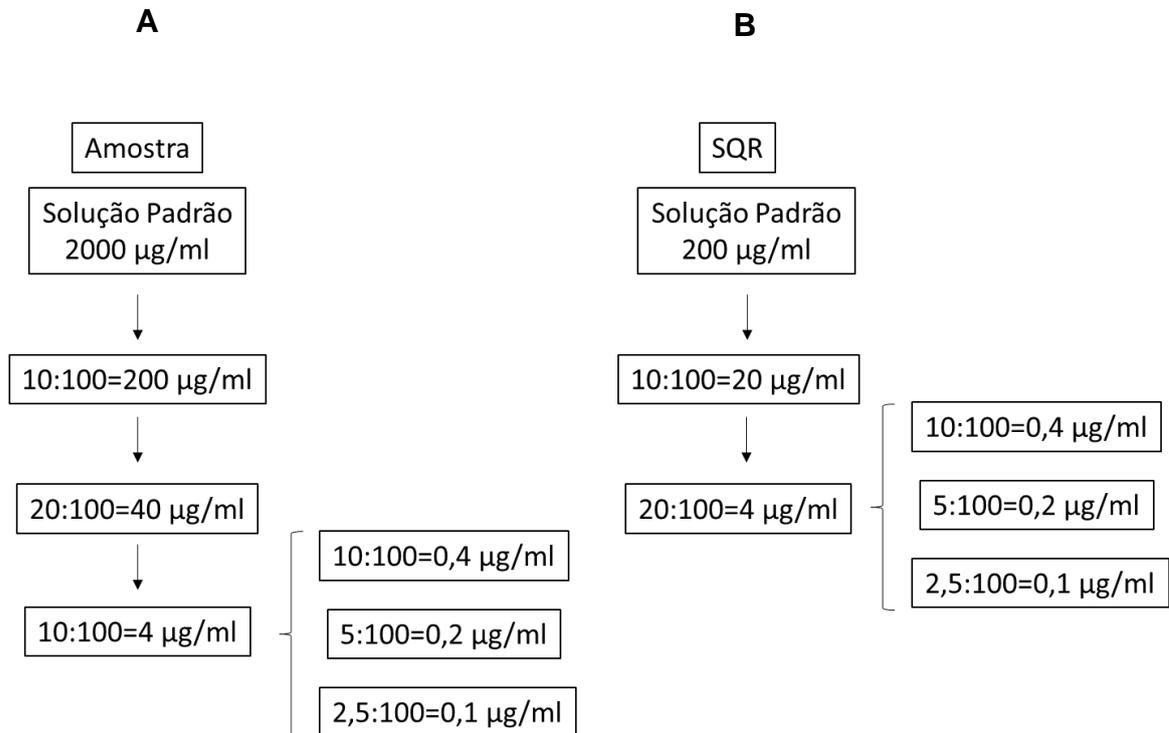
A solução de microrganismo de trabalho tem validade de 15 dias, à temperatura de 7 °C a 10 °C porém, procurou-se utilizar por no máximo sete dias devido a diminuição considerável do crescimento bacteriano após esse período, o que poderia ocasionar em confluência dos halos.

Para a padronização, adicionou-se 0,5 ml de solução aquosa de formaldeído 12% para inativar a bactéria e, completaram-se os 4,5 ml restantes com solução bruta e salina. A quantidade desses dois últimos é arbitrária, foi testada até que se obtivesse a transmitância de 25% no comprimento de onda de 580 nm, empregando espectrofotômetro UV-visível SHIMADZU modelo UV-1601. A suspensão foi preparada de acordo com a proporção verificada na padronização.

3.2.2 Preparos das diluições

As soluções padrão (SP) com durabilidade de uma semana foram feitas a partir da substância química de referência (SQR, lote: 2022, INCQS/ FIOCRUZ) e das amostras a serem testadas: medicamento de referência (R), genérico 1 (T1), genérico 2 (T2) e genérico 3 (T3), todas adquiridas em farmácias do Rio de Janeiro. As diluições para obtenção da solução padrão foram feitas com água destilada esterilizada e, as etapas seguintes, utilizaram solução fosfato de potássio 0,1 M, estéril, pH 8,0. Para cada ensaio realizado, novas diluições eram feitas a partir da SP (Figura 1).

Figura 1 - Esquema de diluição das amostras e do padrão (SQR).



Para obtenção da solução padrão utilizou-se água destilada e, posteriormente, tampão fosfato 0,1 M. Todas as quatro amostras seguiram o esquema A e o B representa o fluxograma de diluição da substância química de referência. Fonte: Próprio autor.

3.2.3 Preparo e leitura das placas

O meio utilizado para o teste é composto por peptona seca, caseína de digestão pancreática, extrato de levedura, dextrose, ágar e água purificada, pH final 8,0 e foi previamente fundido com auxílio do micro-ondas até que não houvesse mais partes sólidas e, todo o processo de preparo foi realizado em área estéril a fim de evitar a contaminação. Foi separado então quantidade suficiente para a camada base, cada placa recebeu 20 ml, e para camada semeada, 4 ml em cada. Os dois frascos foram colocados em banho-maria a temperatura de 50 ± 5 °C para estabilização da temperatura e após, foi feita a transferência da camada base e a placa deixada em repouso por aproximadamente 10 minutos para a solidificação do meio.

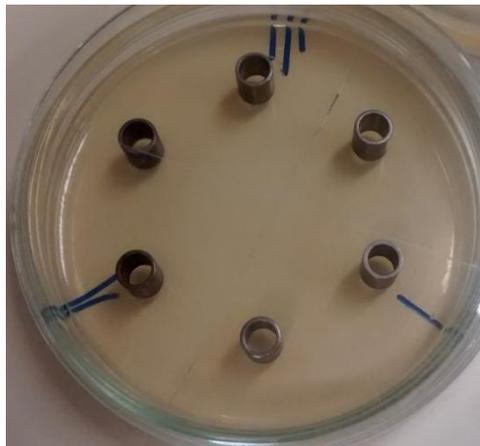
Ao frasco contendo a camada semeada foi adicionado 0,5% do MOT e homogeneizado de forma a dispersar todo o microrganismo no meio. Então, foi

colocado 4 ml em cada placa de modo a obter superfície lisa e sem a formação de grumos.

Após a solidificação do meio, seis cilindros estéreis (8 mm) foram distribuídos equidistante ao redor da placa. Em cada cilindro foram aliqüotados 200 µl de solução das três concentrações do padrão e da amostra, como mostra a figura 2.

As placas foram incubadas por 16 h a 35 ± 5 °C. A leitura foi realizada após o período de incubação, utilizando-se um aparelho leitor de halos Fisher-Lilly. Os ensaios foram realizados em triplicata, calculando-se as médias dos halos de inibição obtidos nas respectivas concentrações.

Figura 2 - Placa microbiológica com cilindros.



Placa microbiológica com cilindros e marcações feitas para identificação das doses testadas. Um traço sinaliza a menor dose do padrão e, o cilindro oposto, a menor dose da amostra, dois e três traços dose intermediária e maior, respectivamente. Fonte: Próprio autor.

3.2.4 Análises de dados e tratamento estatístico

Os dados foram avaliados com auxílio do programa GraphPad Prism, one-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls com significância P valor < 0,05.

3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Todo o processo analítico foi desenvolvido e realizado no Laboratório de Farmacocinética (LAB-SEFAR), FIOCRUZ. O estudo recebeu no LAB-SEFAR a codificação interna 63-AMX05-14PQ75. O método bioanalítico foi desenvolvido para extração da Amoxicilina e do padrão interno (Cefalexina) do plasma de rato. Baseado em estudo anteriormente realizado no laboratório tendo como matriz biológica o plasma humano. O método foi testado e otimizado de modo utilizar a menor quantidade possível de plasma de ratos, com auxílio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e ionização por electrospray.

3.3.1 Preparo das soluções

As substâncias químicas de referência (SQR) utilizadas para preparo das soluções de trabalho (STB) e padrão interno (PI) foram Amoxicilina, lote 2022 e Cefalexina, lote 2015 originários do INCQS/ FIOCRUZ. Os padrões foram pesados em balança analítica (Gehaka AG200) e diluídos em água ultrapurificada até as concentrações das STBs (Quadro 1). A curva de calibração 10 ng/ml à 2500 ng/ml, tem os controles de qualidade nas concentrações de 10 ng/ml limite de quantificação (LIQ), 25 ng/ml controle de qualidade de baixa concentração (CQB), 1000 ng/ml controle de qualidade de média concentração (CQM) e 2000 ng/ml controle de qualidade de alta concentração (CQA). E, ainda o controle de qualidade de concentração intermediária (CQC) de 500 ng/ml usado de acordo com necessidade durante a corrida analítica.

Quadro 1 - Concentração das soluções mestre e de trabalho para o analito

Concentração das soluções mestre e de trabalho (ng/ml) para o analito.					
Solução de trabalho – STB	Concentração das STBs em solução (ng/ml)	Volume preparado de solução (ml)	Volume pipetado	Volume de Diluente (ml)	STB a ser utilizada na preparação
SME	1000000,00	10	Xxxxx	10,000	Padrão
STB11	100000,00	10	1,000	9,000	SME
STB10	10000,00	10	1,000	9,000	STB11
STB09	1000,00	10	1,000	9,000	STB10
STB08 (CQD)	4000,00	10	0,400	9,600	STB11
STB07	2500,00	10	0,250	9,750	STB11
STB06	2000,00	10	0,200	9,800	STB11
STB05	1000,00	10	0,100	9,900	STB11
STB04	500,00	10	0,500	9,500	STB10
STB03	100,00	10	0,100	9,900	STB10
STB02	25,00	10	0,250	9,750	STB09
STB01	10,00	10	0,100	9,900	STB09

Lista de preparo das soluções de trabalho utilizadas para o estudo e detalhes da preparação de cada concentração. Fonte: Próprio autor.

3.3.2 Condições cromatográficas

A separação cromatográfica foi feita em coluna analítica Agilent, modelo Pursuit C18 5.0 μ 3.0 X 150.0 mm; espectrômetro de massas Absciex, modelo QTRAP 5500 LC/MS/MS; software Analyst 1.6.1; bombas de CLAE Eksigent, modelo ekspert™ ultraLC 100; injetores automáticos Eksigent, modelo ekspert™ ultraLC 100-XL; degaseificador Eksigent acoplado a bomba de CLAE; módulo de comunicação Shimadzu, modelo Prominence CBM-20^a; forno de coluna Eksigent, modelo ekspert™ ultraLC 100 (quadro 2). A fase móvel A (FMA) utilizada em 0,1% de ácido fórmico em água e a fase móvel B (FMB) acetonitrila a 100% utilizados na proporção de 90 FMA/ 10 FMB, a um fluxo de 0,8 ml/min com divisor. A pressão do sistema a 111-135 Kgf/cm², temperatura do forno a 40 °C e autosampler a 10 °C. O tempo de corrida foi de 7 minutos com volume de injeção de 10 μ l. O equipamento foi operado no modo de ionização positiva.

Quadro 2 - Especificações dos equipamentos

Componente	Marca	Modelo
Coluna Analítica	Agilent	Pursuit C18 5.0 μ 3.0 X 150.0 mm
Espectrômetros de Massas	ABSCIEX	QTRAP 5500 LC/MS/MS
Software	Analyst	1.6.1
Bombas de CLAE	Eksigent	ekspert™ ultraLC 100
Injetores automáticos	Eksigent	ekspert™ ultraLC 100-XL
Degaseificador	Eksigent	Acoplado a bomba de CLAE.
Módulo de comunicação	Shimadzu	Prominence CBM-20 ^a
Fornos de coluna	Eksigent	ekspert™ ultraLC 100

Resumo dos equipamentos utilizados para análise dos plasmas. Fonte: Próprio autor.

3.3.3 Método de extração

Em um eppendorf de 2 ml foram adicionados 25 μ l de plasma e 25 μ l de padrão interno (PI), agitou-se em vortex por aproximadamente 20 segundos. Após isso, a adição 500 μ l de acetonitrila e agitação em vortex por 10 minutos seguido de 5 minutos de centrifugação promoveu a precipitação de proteínas. Então, 100 μ l do sobrenadante foram transferidos para outro eppendorf com adição de 600 μ l de solução de diluição (H₂O: AFO 0,1%) e levado ao vortex por aproximadamente 30 segundos. Uma alíquota de 400 μ l foi transferida para *vial* e levado ao cromatógrafo.

3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método seguiu todas as diretrizes da Resolução RDC n°27, de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).

3.4.1 Curvas de calibração

As curvas de calibração foram preparadas sempre em duplicata e de acordo com o método de extração descrito anteriormente. Às amostras de plasma foram adicionados 10, 25, 100, 500, 1000, 2000, 2500 ng/ml de Amoxicilina, esse processo é chamado de fortificação e, após essa etapa, o método de extração foi empregado.

Para cada curva são preparados controles de alta e baixa concentrações (A e B, respectivamente) e controles brancos, plasma + padrão interno (Z) e somente plasma (N).

3.4.2 Teste de quantificação inicial (TQI)

Com objetivo de qualificar a amostra antes de avaliar a estabilidade, foi feita uma curva de calibração, mais oito CQB's e oito CQA's. Aprovados os controles, separam-se no mínimo mais oito tubos de cada e armazena a temperatura de -70 °C para posterior ensaio de estabilidade de longa duração.

3.4.3 Teste de seletividade (TES)

Para avaliar a seletividade, foram utilizadas quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Estas foram processadas junto com uma amostra referente ao limite inferior de quantificação. O teste compara o LIQ com branco dos diferentes plasmas e a contaminação deve ser menor que 20% da área do LIQ.

3.4.4 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pela análise, realizada três vezes, de amostras padrão de calibração contendo amoxicilina em sete diferentes concentrações: 10, 25, 100, 500, 1000, 2000, 2500 ng/ml.

3.4.5 Precisão e exatidão

Para análise da precisão e exatidão, foi determinada a precisão intracorrida, caracterizada por oito controles de cada (limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD)) e resultado das médias entre 85 e 115% e, para o LIQ, 80 a 120%. Já a precisão intercorridas, demonstra repetibilidade em três

corridas feitas em dias diferentes. A cada corrida, foram feitas cinco replicatas nas cinco concentrações controles.

3.4.6 Teste de efeito matriz (TEM)

Com objetivo de garantir que a matriz utilizada no estudo não suprime o sinal do analito (efeito matriz), testou-se 4 amostras normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas para cada concentração (CQA e CQB) e, 8 controles de CQA e oito de CQB em solução.

3.4.7 Limite inferior de quantificação (LIQ)

O LIQ foi definido como a menor concentração da curva de calibração e foi estabelecido a partir da análise de oito replicatas de amostras de plasma fortificadas com amoxicilina nas concentrações de 10 e 2500 ng/ml. Estes três últimos parâmetros são avaliados em conjunto no Teste de Precisão e Exatidão (TPE), feitos por três dias consecutivos (TPE1, TPE2 e TPE3).

3.4.8 Teste de efeito residual (TER)

Foi feito um N (somente plasma), um LIQ e um limite superior de quantificação (LSQ, concentração de 2500 ng/ml). A injeção no equipamento seguiu a ordem: N, LIQ, LSQ, N, N.

3.4.9 Estabilidade

Os ensaios de estabilidade foram feitos com amostras de matriz biológica do animal com adição do analito e padrão interno (PI) e, controles de qualidade em duas concentrações (CQA e CQB) e oito replicatas, além da curva de calibração em duplicata. Para o teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho (TEBCSTB) foram feitas soluções teste e deixadas em temperatura ambiente por aproximadamente 29 horas para que fossem comparadas com soluções recém-preparadas. No teste de estabilidade de curta duração a temperatura ambiente

(TEBCDTA) as amostras permaneceram em temperatura ambiente por cerca de 5 horas. O teste de estabilidade em pós-processamento (TEBPP) compreendeu o intervalo de tempo entre o tempo do fim do preparo das amostras e o fim da corrida analítica mais longa e, o tempo e temperatura de armazenamento foram de 24 h e 35 min a 10 °C. A estabilidade em temperatura de armazenamento das soluções de trabalho (TEBTSTB) foi verificada após 1049 horas de armazenamento das soluções a temperatura de -70 °C. Outro teste feito foi de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento (TEBCD), ou seja, uma quantidade de amostras foi armazenada a temperatura -70 °C e, a cada ciclo, todas as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e recongeladas posteriormente. A cada ciclo foram retiradas amostras para o teste e o restante foi guardado, totalizando nove ciclos e quase 546 horas de armazenamento das amostras. O último foi o teste de estabilidade de longa duração (TEBLD) em que as amostras foram armazenadas a temperatura de -70 °C no início da validação e analisadas somente ao final do experimento, ficando guardada por 4793 h e 45 min.

3.5 ENSAIO FARMACOCINÉTICO

3.5.1 Animais

Foram utilizados Ratos Wistar machos, pesando entre 150 à 300 g, fornecidos pelo centro de criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL). Os animais tiveram livre acesso à água e comida, e foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de aproximadamente 25 °C e ciclo alternado de claro e escuro de 12 horas. Todos os experimentos que incluem manipulação animal neste projeto foram realizados de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (protocolo N^o P-49/13-3).

Os animais foram manipulados somente após a aclimatação durante 3 dias nas instalações do biotério do INCQS. Antes da administração dos medicamentos, os animais foram submetidos a jejum de 12 h com livre acesso a água, permanecendo assim durante todo o período de coleta das amostras de sangue.

3.5.2 Preparo das diluições

Os medicamentos foram pesados em balança analítica (Gehaka, AG200) e diluídos em água destilada para preparo da suspensão mãe (SM) na concentração de 500 mg/ 5ml, com validade de 14 dias. A partir deste, uma solução de trabalho de 3 mg/kg foi também diluída em água destilada e com mesma validade para que cada animal de 250 g recebesse 1 ml da suspensão, sendo o volume corrigido de acordo com o peso do animal no momento da administração.

3.5.3 Coleta e preparo das amostras

Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas antecedentes ao experimento. Na manhã do teste, foram pesados para ajuste de dose e a primeira coleta se deu antes da administração do medicamento via oral. Após isso, as coletas foram feitas nos tempos 0 min. (antes da administração do medicamento), 10 min, 20 min, 40 min, 50 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7 h e 9 h após a administração. Para realização da coleta, foi projetado e desenvolvido pelo setor responsável no INCQS, um contensor de acrílico os animais foram acondicionados em contensor de acrílico capaz de deixar a cauda livre para a coleta. Uma pequena fração final da cauda do animal foi cortada com tesoura cirúrgica e 150 μ L de sangue foram coletados utilizando pipeta automática com ponteira heparinizada e, foram utilizados tubos eppendorf de 0,2 ml. Após as coletas, as amostras de sangue foram centrifugadas a 15000 g a 4 °C por 15 minutos para obtenção da amostra de plasma (~ 50 μ L), transferido para outro tubo de 0,2 ml e, acondicionado em freezer -70 °C.

Cada animal recebeu as quatro amostras testes com intervalo de uma semana após cada administração para completo *washout* do medicamento e plena recuperação do roedor. De acordo com a Resolução RE nº 1170/ 06 (Brasil, 2006), a randomização do experimento foi baseada no delineamento de Williams (quadro 3) e, foram utilizados 24 animais para o ensaio de bioequivalência e 4 para o estudo controle.

Quadro 3: Randomização baseada no delineamento de Williams.

Delineamento de Williams				
Sequência	Semana 1 (Período 1)	Semana 2 (Período 2)	Semana 3 (Período 3)	Semana 4 (Período 4)
1	R	T3	T1	T2
2	T1	R	T2	T3
3	T2	T1	T3	R
4	T3	T2	R	T1

Esquema para randomização dos medicamentos. Cada semana o animal recebe uma formulação diferente. Fonte: Próprio autor.

3.5.4 Estudo controle

Com objetivo de verificar a completa recuperação fisiológica do animal no período de intervalo de uma semana entre a administração dos medicamentos teste e estabelecer se o protocolo de coleta poderia interferir de alguma forma na cinética do medicamento, foi feito ensaio com seis animais seguindo o mesmo desenho experimental citado anteriormente, utilizando sempre o medicamento de referência durante as quatro semanas. Os procedimentos de coleta, processamento e armazenamento de amostras foram realizados de acordo com o descrito no item 3.5.3.

3.5.5 Recebimento das amostras no LAB-SEFAR

Após a verificação de conformidade das amostras, foram, novamente, armazenadas no freezer -70 °C. A distribuição das amostras, para o preparo foi realizado por meio de formulário interno e a entrada e saída do freezer controlada pelos livros de registro específicos. O conjunto de amostras de um animal é chamado de lote e, consiste em 44 amostras referentes às quatro semanas de experimento (fase I, II, III e IV).

3.5.6 Preparo dos lotes

Para análise das amostras, um lote inteiro foi descongelado à temperatura ambiente e as amostras foram aliqüotadas em microtubos de polipropileno, devidamente ordenados e codificados, seguidos da adição de PI e, método de extração anteriormente validado. Para cada lote, foram feitas duas curvas de calibração e dez controle de cada (N, Z, CQB, CQM, CQC e CQA).

3.5.7 Parâmetros estatísticos

Os parâmetros farmacocinéticos determinados foram:

- $C_{m\acute{a}x}$ (concentração máxima) e $T_{m\acute{a}x}$ (momento em que $C_{m\acute{a}x}$ ocorre) pela análise da curva de concentração x tempo;
- ASC_{0-t} (área sobre a curva de zero até a última concentração quantificável) calculada pelo método dos trapezoides;
- $ASC_{0-\infty}$ (área sobre a curva de zero ao tempo infinito), $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + Ct/Ke$, onde Ct é última concentração determinada experimentalmente;
- Ke (constante de eliminação) calculada pela regressão linear das três últimas concentrações mensuráveis da curva
- $T_{1/2\beta}$ (tempo de meia vida de eliminação) $T_{1/2\beta} = 0,623 /Ke$

3.5.8 Análise de dados e tratamento estatístico

Tanto a aquisição como a análise dos dados para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos (C_{max} ; T_{max} ; $T_{1/2}$; AUC) foram realizados através do programa da estação de trabalho Varian MS (Versão 6.6, Walnut Creek, USA). Os intervalos de confiança de 80% foram calculados com base no teorema de Fieller. A relação do comportamento farmacocinético nos diferentes ensaios foi realizada através do ensaio de retas paralelas (Ito, K. et al, 2009).

4. RESULTADOS

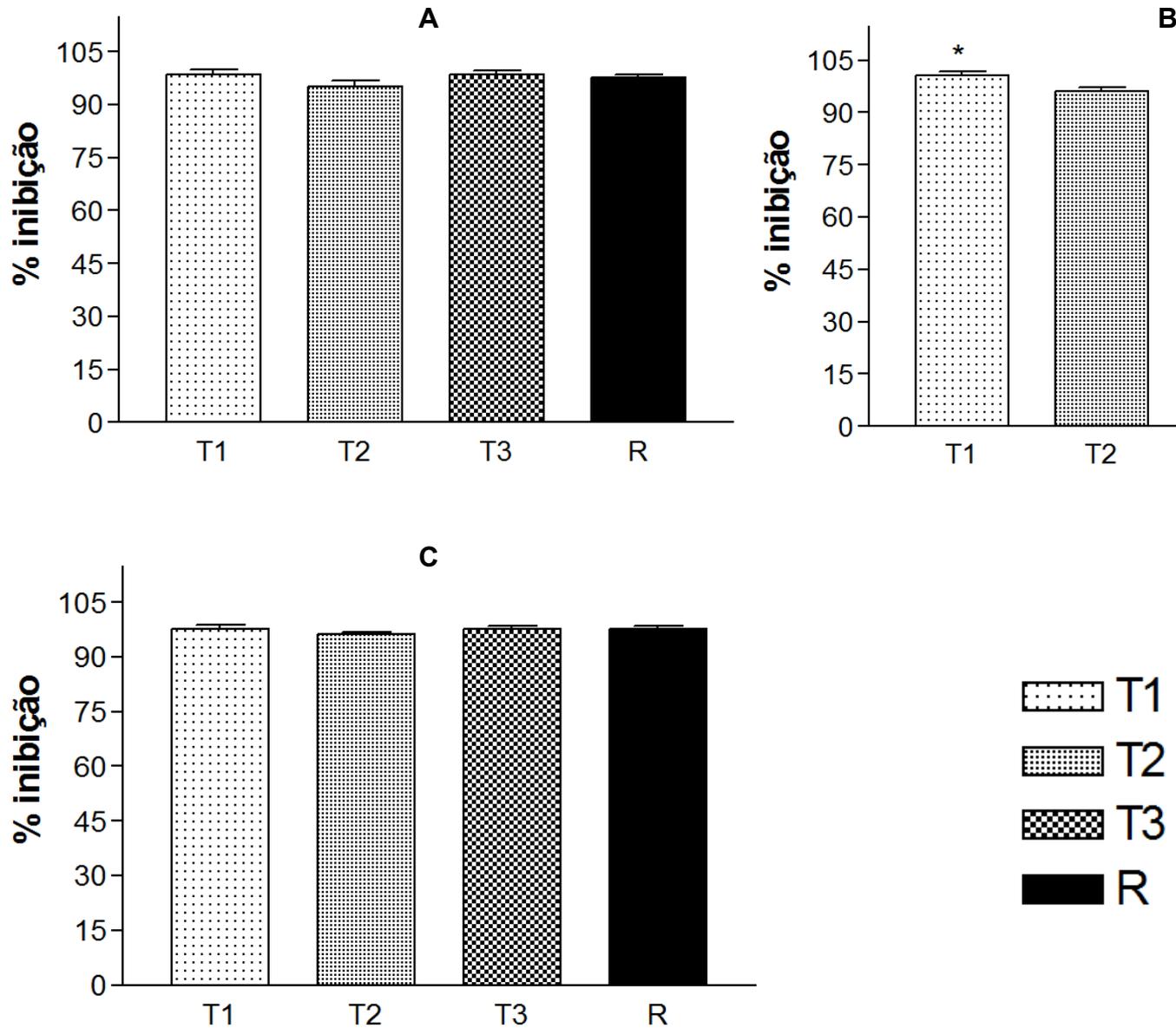
Baseado nos levantamentos feitos, levando em conta, forma farmacêutica, dosagem, popularidade do medicamento e resultado negativo para bioequivalência nos arquivos de testes realizados pelo LAB-SEFAR, o medicamento selecionado para avaliação da farmacocinética em ratos foi a Amoxicilina de 500 mg/5ml, suspensão oral que tem como referência o medicamento Amoxil[®] da empresa Glaxo Smith Kline (GSK). O fato de ensaios de bioequivalência terem sido negativos e, o alto consumo foram considerados para escolha devido ao risco para o tratamento da enfermidade e possível agravamento do quadro clínico do paciente.

4.1 POTÊNCIA MICROBIOLÓGICA

O primeiro ensaio testou as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 µg/ml padrão x amostra, com 17 h e 30 min de incubação em estufa. Contudo, o halo referente à menor concentração apresentou raio muito pequeno e, por isso, foi necessário repetir o teste aumentando as concentrações, testar a necessidade de pré-difusão e diminuir o tempo de incubação para 16 h. Foram então utilizadas diluições de 0,1; 0,2 e 0,4 µg/ml padrão x padrão e duas placas permaneceram em cima da bancada por 30 minutos antes de serem levadas à estufa (pré-difusão). Com o período de incubação de 16 h, foi verificado bom crescimento bacteriano e, portanto, considerado tempo ideal de estufa para o teste. As novas concentrações apresentaram bom halo e as placas com pré-difusão não apresentaram diferenças (dados não mostrados).

Após a determinação das concentrações e tempo de incubação, foram feitos três ensaios para cada amostra de medicamento. O medicamento T1 apresentou, na dose de 0,1 ng/ml, um percentual de inibição de 98,6%; na dose média 100,7% e na maior 97,7%. O resultado mostrado no teste da formulação T2 foi: 95,1%; 96,2% e 96,3% na menor, média e maior concentração, respectivamente. A amostra T3 apresentou os valores 98,5% para 0,1 ng/ml; 97,9% para 0,2 ng/ml e 97,7% para 0,4 ng/ml. No medicamento R, o resultado foi 97,5% 95,8% e 97,8%, em ordem da menor para a maior diluição (figura 3).

Figura 3 – Gráficos da potência microbiológica das amostras teste.



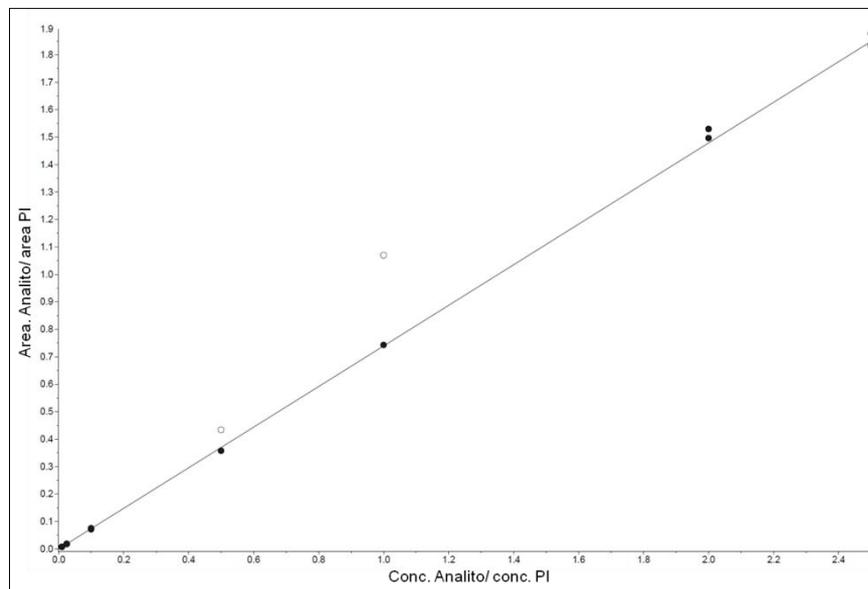
A – Percentual de inibição na concentração 01 ng/ml, B – concentração de 0,2 ng/ml e C – concentração de 0,4 ng/ml. Percentual de inibição = $(Ax100)/R$, em que A = amostra testada e R= referência (SQR).

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

4.2.1 Teste de Quantificação Inicial

A curva de calibração do teste de quantificação inicial teve dois pontos fora da curva (gráfico 1), mas, foi aprovada dentro dos critérios de avaliação. Além disso, todos os oito controles de qualidade foram aprovados. O controle de baixa concentração apresentou média de 25,67 ng/ml; coeficiente de variação de 4,45%; exatidão de 102,67% e desvio de 2,67%. O controle de qualidade de alta concentração teve média de 2028,35 ng/ml; cv de 2,71%; exatidão de 101,42% e desvio de 1,42%; dados resumidos no quadro 4.

Gráfico 1 - Curva de calibração do teste de quantificação inicial.



Curva de calibração feita em duplicata no teste de quantificação inicial. Regressão linear (“1/ (x * x)” ponderado): $y = 0.739x + -3,98e-005$ ($r=0.9996$).

Quadro 4 - Resultados dos oito controles do teste de quantificação inicial.

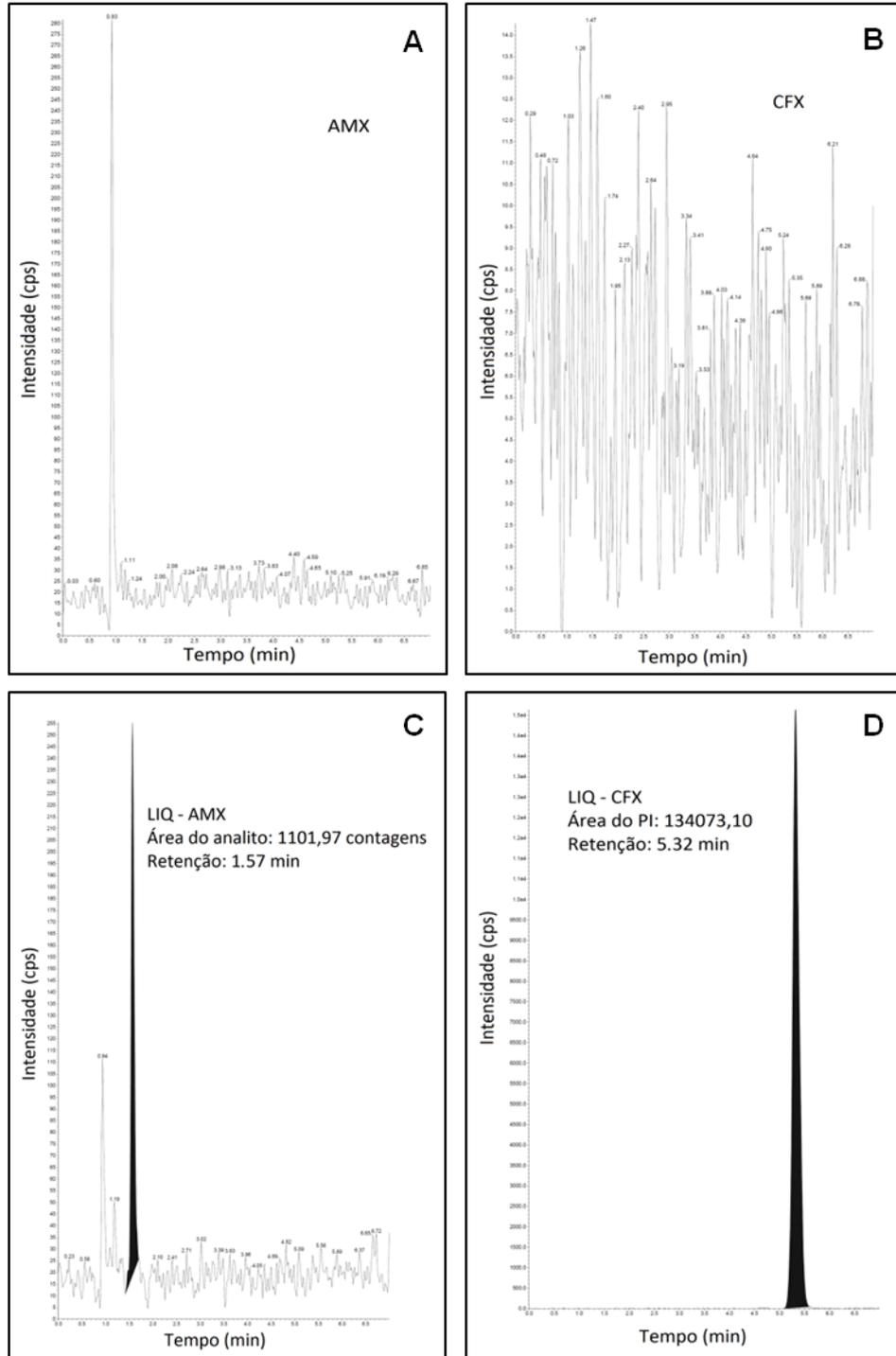
CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Média (ng/ml) n=8	CV (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
CQB	25.00	25.67	4.45	102.67	2.67
CQA	2000.00	2028.35	2.71	101.42	1.42

Foram feitos oito controles do CQB e oito do CQA.

4.2.2 Teste de Seletividade

O teste de seletividade não apresentou contaminação para nenhuma das amostras brancas testadas e todos os cromatogramas seguiram o mesmo padrão. O pico da amoxicilina, na amostra contendo LIQ, saiu no tempo de retenção de 1.57 min, e área 1101,97 contagens. Já a cefalexina teve tempo de retenção de 5.32 min. e área de 134073,10 contagens (figura 4).

Figura 4: Cromatogramas do teste de seletividade



Cromatogramas A e B referentes a amostra branca, A mostra a massa da amoxicilina (366,036) sem no tempo de retenção da substância. B apresenta muitos ruídos sem pico definido na massa 347,800 (cefalexina). As figuras C e D são relativas ao LIQ, sendo C o pico da AMX e D o CFX.

4.2.3 Teste de Precisão e Exatidão

O teste de precisão e exatidão foi realizado em três dias diferentes e, em cada um, foram feitos oito controles de cada CQ. No primeiro dia, o LIQ teve média 10,63 ng/ml; CQB 25,18 ng/ml; 973,89 ng/ml para CQM; 1960,81 ng/ml para o CQA e 1947,55 ng/ml para o CQD. O segundo dia gerou os seguintes resultados: LIQ 11,94 ng/ml; CQB 28,53 ng/ml; CQM 1045,57 ng/ml; CQA 2000,00 ng/ml e CQD 1904,78 ng/ml. E, os dados do terceiro dia foram: LIQ 10,92 ng/ml; CQB 26,31 ng/ml; CQM 953,19 ng/ml; CQA 2043,57 ng/ml; 2093,21 ng/ml. As médias obtidas após os três dias de testes foram: 11,17 ng/ml para o LIQ; 26,68 ng/ml para o CQB; 990,88 ng/ml no CQM; 2001,46 ng/ml para o CQA e 1981,85 ng/ml no CQD. Com isso, a precisão do limite inferior de quantificação foi de 6,17%; 6,39% no controle de baixa concentração; 4,89% no controle de média concentração; para o controle de alta obteve-se 2,07% e para o controle de diluição, 4,98%. A exatidão e o desvio foram, respectivamente, 111,66% e 11,66% para o LIQ, 106,70% e 6,39% para o CQB, 99,09% e 0,91% para o CQM, 100,07% e 0,07% para o CQA e 99,09% e 0,91% para o CQD. Os dados estão organizados no quadro 5.

Quadro 5 – Precisão e exatidão obtidos a partir de testes feitos em três dias distintos.

Data da análise	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
	Concentração experimental (ng/mL)				
02/07/2014	10.63	25.18	973.89	1960.81	1947.55
18/07/2014	11.94	28.53	1045.57	2000.00	1904.78
22/07/2014	10.92	26.31	953.19	2043.57	2093.21
Média	11.17	26.68	990.88	2001.46	1981.85
Precisão (CV %)	6.17	6.39	4.89	2.07	4.98
Exatidão %	111.66	106.70	99.09	100.07	99.09
Desvio %	11.66	6.70	-0.91	0.07	-0.91

4.2.4 Teste de Efeito Matriz

O teste de efeito matriz gerou média do fator matriz normalizado de 0,99 e CV de 4,36%.

Quadro 6 - Cálculo do fator matriz normalizado

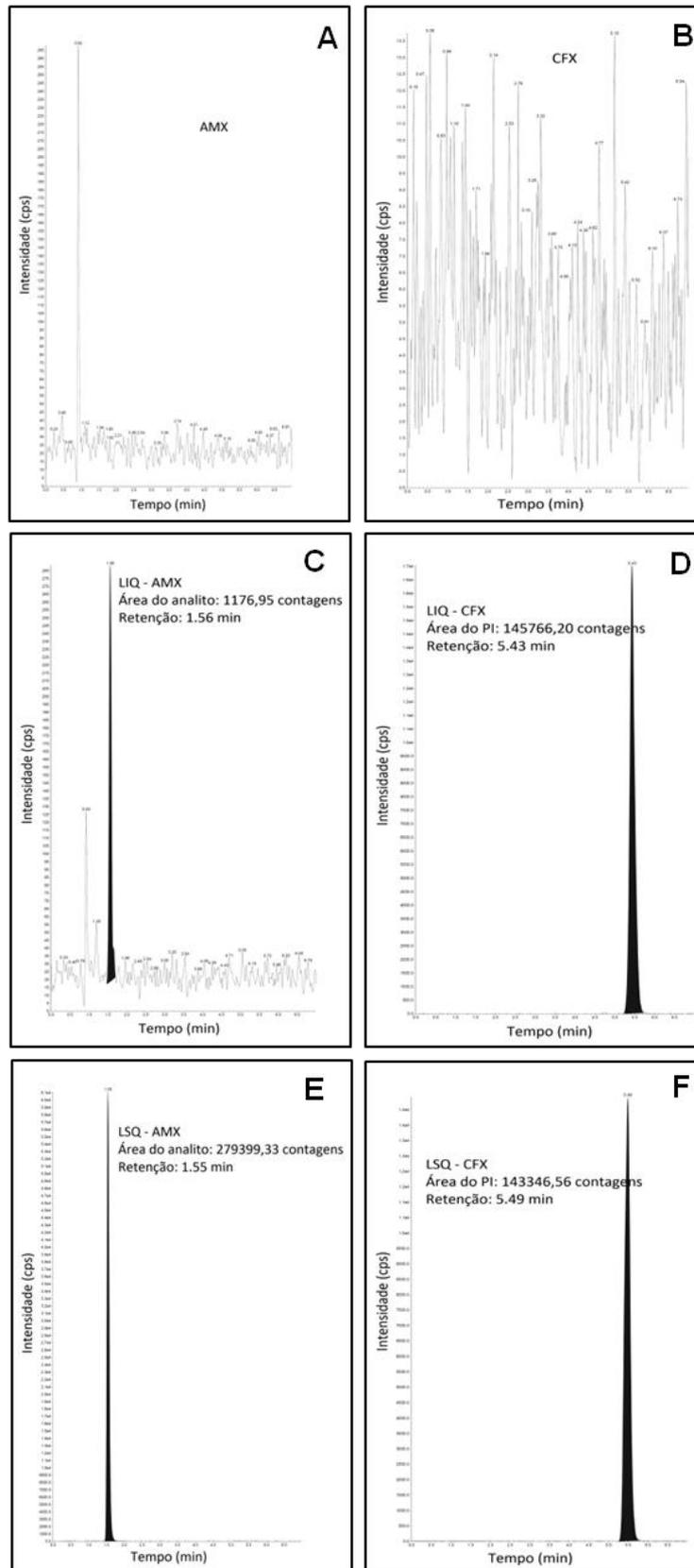
CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Média FMN	CV% FMN
B	25.00	0.99	4.36
A	2000.00		

FMN= (razão analito/ padrão interno (matriz))/ (razão analito/ padrão interno (solução)).
Aprovação para CV menor 15%.

4.2.5 Teste de Efeito Residual

O teste de efeito residual realizado com amostras seguindo ordem de injeção no equipamento, N, LIQ, LSQ, N e N, gerou bons resultados, em que as amostras N não apresentaram picos residuais nem para amoxicilina e nem para cefalexina. A amostra do limite inferior de quantificação, no tempo de 1.56 min apresentou pico de amoxicilina com área de 1176,95 contagens e, pico de cefalexina no tempo de retenção de 5.43 min e área de 145766,2 contagens. Os resultados do limite superior de quantificação apresentaram os seguintes valores, para amoxicilina: tempo de retenção em 1.55 min e área de 279399,33 contagens e, para cefalexina: retenção em 5.49 min. e área de 143346,56 contagens (figura 5).

Figura 5 - Cromatogramas do teste de efeito residual.



A amostra N não apresentou picos nem para AMX e nem para CFX (A e B). A figura C representa a amoxicilina do LIQ e a D mostra a cefalexina. As figuras E e F são referentes ao limite superior de quantificação, amoxicilina e cefalexina, respectivamente.

4.2.6 Testes de estabilidade

4.2.6.1 Teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho

O teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho comparou as médias das áreas das amostras recém-preparadas e das amostras teste, deixadas em temperatura ambiente por 29 h e 05 min. O resultado da média das áreas das oito replicatas da solução de trabalho 01, na concentração de 10 ng/ml das amostras recém-preparadas foi de 1202.86 contagens com coeficiente de variação (CV) de 5,39%. A média das amostras teste foi de 1222,36 ng/ml e 4,90% de CV e, a comparação entre as médias resultou em desvio de 1,62%. A solução mestre (SME) de 1000000 ng/ml foi diluída para 2000 ng/ml (CQA) e a média das áreas das amostras recém e pós foram de 253183,11 ng/ml e 2,18% CV e 262685,67 contagens e 2,78% CV; respectivamente, com desvio de 3,75%. A solução de trabalho do padrão interno foi testada na concentração de 1000 ng/ml e, as médias foram 168613,75 ng/ml e coeficiente de variação de 1,91% e, 164141.36 ng/ml e 3,04% CV para as amostras recentes e testes, respectivamente e, desvio entre elas foi de 2,65%. A solução mestre do padrão interno de 1000000 ng/ml foi diluída para 1000 ng/ml e a média das áreas das amostras recém-preparadas foi de 168981,26 ng/ml com CV de 1,91% e das amostras após 29 h foi de 165381,07 ng/ml e CV de 3,76% com desvio de 2,13% na comparação entre as médias (quadro 7).

Quadro 7 - Teste de estabilidade de curta duração das soluções de trabalho

Código da amostra	Amostras recém-preparadas		Amostras após 29h:05min (TEBCSTB)		Desvio (%)
	Média (ng/ml)	C.V. (%)	Média (ng/ml)	C.V. (%)	
STB01	1202.86	5.39	1222.36	4.90	1.62
SME	253183.11	2.18	262685.67	2.73	3.75
STB-PI	168613.75	7.85	164141.36	3.04	2.65
SME-PI	168981.26	1.91	165381.07	3.76	2.13

STB01 – Solução de trabalho 01 (10 ng/ml), SME – Solução mestre (1000000,0 ng/ml) diluída para 200 ng/ml. STB-PI – solução de trabalho do padrão interno (1000 ng/ml). SME-PI – Solução mestre do padrão interno (1000000 ng/ml) diluída para 1000 ng/ml.

4.2.6.2 Teste de estabilidade em temperatura de armazenamento das soluções de trabalho

A estabilidade em temperatura de armazenamento das soluções de trabalho também testou oito replicatas de cada solução recém-preparada e oito após 1049 h a -70 °C. As concentrações das soluções de trabalho e mestre foram as mesmas utilizadas no teste anterior. A média da STB01 recente foi de 8142,28 ng/ml com coeficiente de variação de 3,89% e após o tempo de exposição, a média obtida foi de 7687,15 ng/ml e CV de 3,49%. O desvio percentual para essa solução foi 5,59. A solução mestre teve média 1501001,53 ng/ml e CV 3,12% e, a média das amostras teste foi 1496266,09 ng/ml, CV de 4,97% e, desvio das médias de 0,32%. A solução de trabalho do padrão interno apresentou média das amostras recentes de 971101,94 ng/ml e CV 4,07% e, das amostras pós 935242,40 ng/ml e CV 2,50% resultando em desvio de 3,69%. E, a solução mestre do padrão interno teve como média das amostras recém-preparadas 920159,66 ng/ml e CV 2,60%; amostras pós 909146,79 ng/ml e CV 7,43% e; desvio de 1,20%.

Quadro 8 - Teste de estabilidade em temperatura de armazenamento das soluções de trabalho.

Código da amostra	Amostras recém-preparadas		Amostras após 1049h:00min (TEBTSTB)		Desvio (%)
	Média (ng/ml)	C.V. (%)	Média (ng/ml)	C.V. (%)	
STB01	8142.48	3.89	7687.15	3.49	-5.59
SME	1501001.53	3.12	1496266.09	4.97	-0.32
STB-PI	971101.94	4.07	935242.40	2.50	-3.69
SME-PI	920159.66	2.60	909146.79	7.43	-1.20

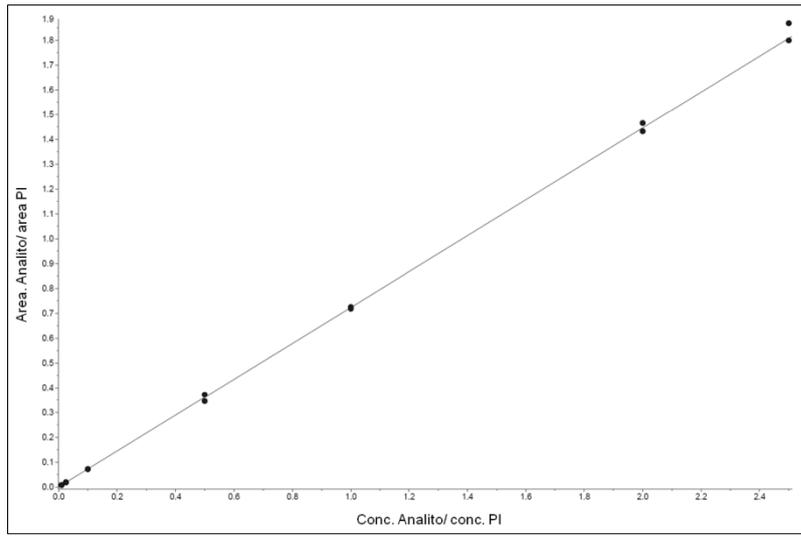
STB01 – Solução de trabalho 01 (10 ng/ml), SME – Solução mestre (1000000,0 ng/ml) diluída para 200 ng/ml. STB-PI – solução de trabalho do padrão interno (1000 ng/ml). SME-PI – Solução mestre do padrão interno (1000000 ng/ml) diluída para 1000 ng/ml.

4.2.6.3 Teste de estabilidade de pós-processamento

O teste de estabilidade de pós-processamento apresentou bom resultado da curva de calibração feita em duplicata, sendo o maior desvio de 4,81% e menor de 0,29% (gráfico 2). E, as concentrações médias obtidas com as oito replicatas de cada controle após 24h35min foram aprovadas. O controle de qualidade de baixa

concentração teve média 25,67 ng/ml; coeficiente de variação 2,82%; exatidão 102,70% e desvio de 2,70%. Já os valores para o controle de alta concentração foram: média 2101,30 ng/ml; CV 2,20%; 105,06% de exatidão e 5,06% de desvio. Os dados estão resumidos no quadro 9.

Gráfico 2 - Curva de calibração do teste de estabilidade de pós-processamento.



Curva de calibração feita em duplicata. Regressão linear ("1/ (x * x)" ponderado): $y = 0.723x + 0.00019$ ($r=0.9995$).

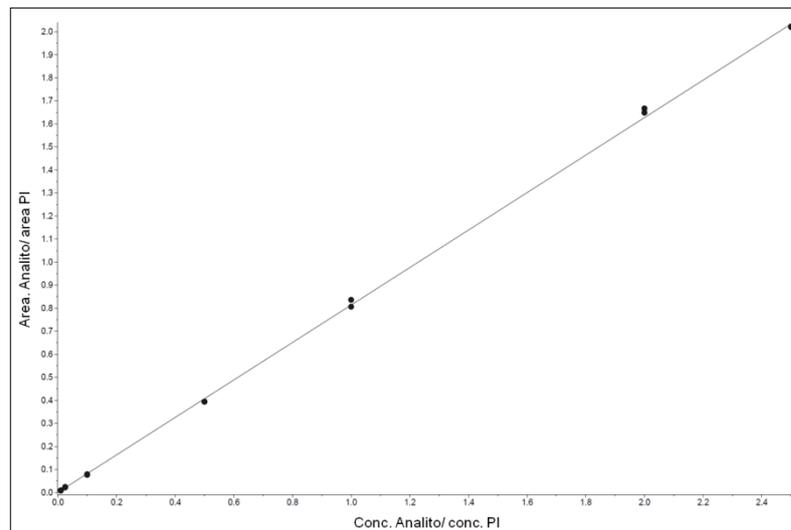
Quadro 9 - Resultados da concentração obtida das amostras teste do teste de estabilidade de pós-processamento.

CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Média (ng/ml) n=8	CV (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
CQB Amostras após 24h:35min	25.00	25.67	2.82	102.70	2.70
CQA Amostras após 24h:35min	2000.00	2101.30	2.20	105.06	5.06

4.2.6.4 Teste de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

A curva de calibração em duplicata do teste de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento apresentou resultados dentro dos parâmetros determinados e, o maior desvio foi de 14,24% e o menor de 0,55% (gráfico 3). A média do controle de qualidade de baixa concentração foi de 27,17 ng/ml; coeficiente de variação 4,61%; exatidão 108,70% e desvio de 8,70%. Já os valores para o controle de alta concentração foram: média 1967,66 ng/ml; CV 3,03%; 98,38% de exatidão e 1,62% de desvio. Dados resumidos no quadro 10.

Gráfico 3 - Curva de calibração do teste de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento.



Curva de calibração feita em duplicata. Regressão linear (“1/ (x * x)” ponderado): $y = 0.813 x + 0.000583$ ($r=0.9973$).

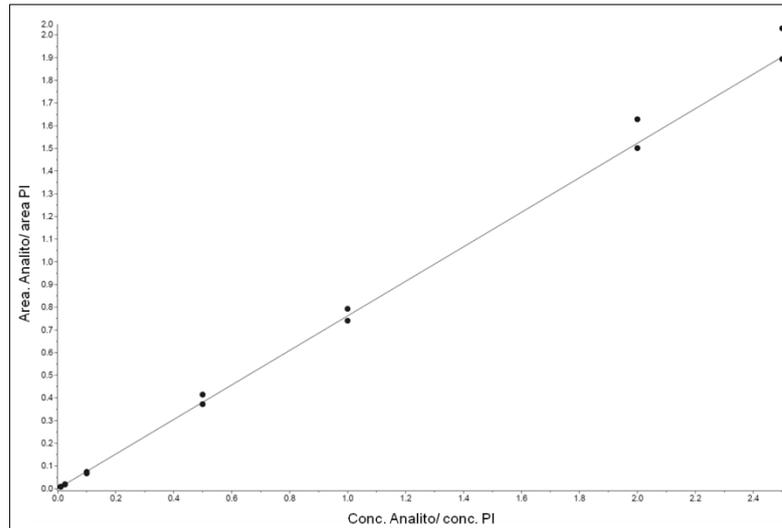
Quadro 10 - Resultado do teste de estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento.

CQ's	Conc. nominal (ng/mL)	Média (n=8)	CV (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
CQB Amostras após 545h:48min	25.00	27.17	4.61	108.70	8.70
CQA Amostras após 545h:48min	2000.00	1967.66	3.03	98.38	1.62

4.2.6.5 Teste de estabilidade de curta duração em temperatura ambiente

Obeve-se bom resultado no teste de estabilidade de curta duração em temperatura ambiente no qual, a curva de calibração em duplicata (gráfico 4) apresentou como maior e menor desvio, respectivamente, 12,50% e 0,25%. Na avaliação das amostras que permaneceram por 6 h e 05 min a temperatura ambiente, a média do CQB foi de 21,46 ng/ml; o CV 4,03%; exatidão de 85,85% e desvio de 14,15%. E, no CQA a média foi de 1759,60 ng/ml; CV 2,59%; exatidão 87,98% e desvio de 12,02% (Quadro 11).

Gráfico 4 - Curva de calibração do teste de estabilidade de curta duração em temperatura ambiente



Curva de calibração feita em duplicata. Regressão linear ("1/ (x * x)" ponderado): $y = 0.761 x + 0.000331$ ($r=0.9977$).

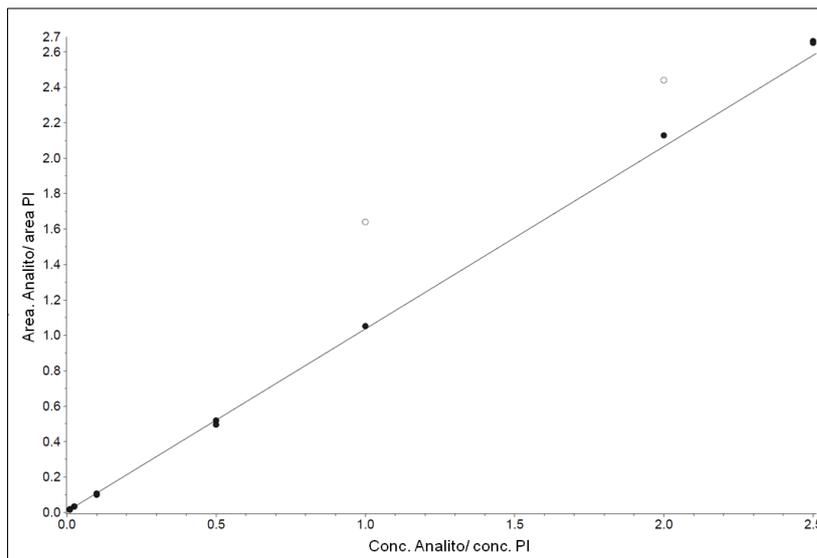
Quadro 11 – Resultados das concentrações experimentais obtidos no teste de estabilidade de curta duração em temperatura ambiente.

CQ's	Conc. nominal (ng/mL)	Média (ng/ml) n=8	CV (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
CQB Amostras após 06h:05min	25.00	21.46	4.03	85.85	14.15
CQA Amostras após 06h:05min	2000.00	1759.60	2.59	87.98	12.02

4.2.6.6 Teste de estabilidade de longa duração

A estabilidade de longa duração avaliou 16 amostras teste, sendo 8 na concentração de 25 ng/ml (CQB) e 8 de 2000 ng/ml (CQA), que estavam armazenadas à -70 °C por aproximadamente 4794 horas. Foi feita também a curva de calibração em duplicata (gráfico 5), dois controles N e dois Z. O controle de qualidade de baixa concentração teve média 26,84 ng/ml; coeficiente de variação 5,52%; exatidão 107,34% e desvio de 7,34%. Já os valores para o controle de alta concentração foram: média 1999,80 ng/ml; CV 3,37%; 99,99% de exatidão e 0,01% de desvio. Os dados estão resumidos no quadro 12.

Gráfico 5 - Curva de calibração do teste de estabilidade de longa duração



Curva de calibração feita em duplicata. Regressão linear ("1/ (x * x)" ponderado): $y = 1,03 x + 0,000625$ ($r=0,9945$).

Quadro 12: Resultado das concentrações do teste de estabilidade de longa duração.

CQS	Conc. nominal (ng/mL)	Média (ng/ml) n=8	CV %	Exatidão %	Desvio %
CQB Amostras após 4793h:45min	25,00	26,84	5,52	107,34	7,34
CQA Amostras após 4793:45min	2000,00	1999,80	3,37	99,99	0,01

CQB – Controle de qualidade de baixa concentração, CQA - controle de qualidade de alta concentração.

4.3 ESTABELECIMENTO DOS TEMPOS DE COLETA

O primeiro ensaio realizado utilizou um animal, que recebeu a dose de 10 mg/kg do medicamento de referência e, os tempos de coleta determinados foram: 0,15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h. Os resultados obtidos foram sequencialmente 0; 1495,23; 4010,39; 4585,21; 4537,48; 1448,36; 523,37 e 188,82 ng/ml, respectivamente. Não houve contaminação no ponto 0 porém, o alto valor no último tempo de coleta e concentrações excedendo o ponto mais alto da curva de calibração (2500 ng/ml) sugerem que além do ajuste dos tempos de coleta, a concentração administrada deve ser diminuída.

Baseado nos resultados do primeiro teste, o segundo ensaio utilizou dois animais, dose de 5 mg/kg e, tempos de coleta de: 0, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 1 h, 1 h e 20 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e 10 h. O animal 1 apresentou os seguintes resultados, em ordem com os tempos de coleta: 0; 154,51; 1119,35; 2097,2; 1933,03; 2131,63; 2636,17; 2514,79; 1392,42; 201,56; 60,7; 16,58 e 16,49 ng/ml. O animal 2 apresentou as concentrações de: 19,95; 418,05; 889,66; 1641,87; 1033,16; 2195,97; 2402,52; 2000,57; 1372,26; 258; 65,01; 21,05; 12,81 ng/ml. O animal 1, nos tempos 50 min, 1 h, 1 h e 20 min excedeu 2500 ng/ml, diferente do animal 2 que obteve todos os pontos dentro da curva, apesar de ter apresentado contaminação no tempo zero (figura 6, gráfico B). Portanto, decidiu-se testar mais um animal com dose de 3 mg/kg para que não houvesse risco de algum ponto ficar

fora da curva e os tempos de coleta foram alterados para 0, 10 min, 20 min, 40 min, 50 min, 1 h e 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e 10 h.

Os resultados do terceiro experimento foram: 0; 124,15; 308,65; 1201,56; 1264,02; 969,91; 760,4; 136,96; 27,74; 12,37; 6,19 ng/ml. Este teste exibiu bom resultado com todos os pontos dentro da curva de calibração e, para o ensaio foram otimizados os tempos de coleta para 0, 10 min, 20 min, 40 min, 50 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7 h e 9 h e dose de 3 mg/kg.

Figura 6: Resultados dos testes para estabelecimento dos tempos de coleta.

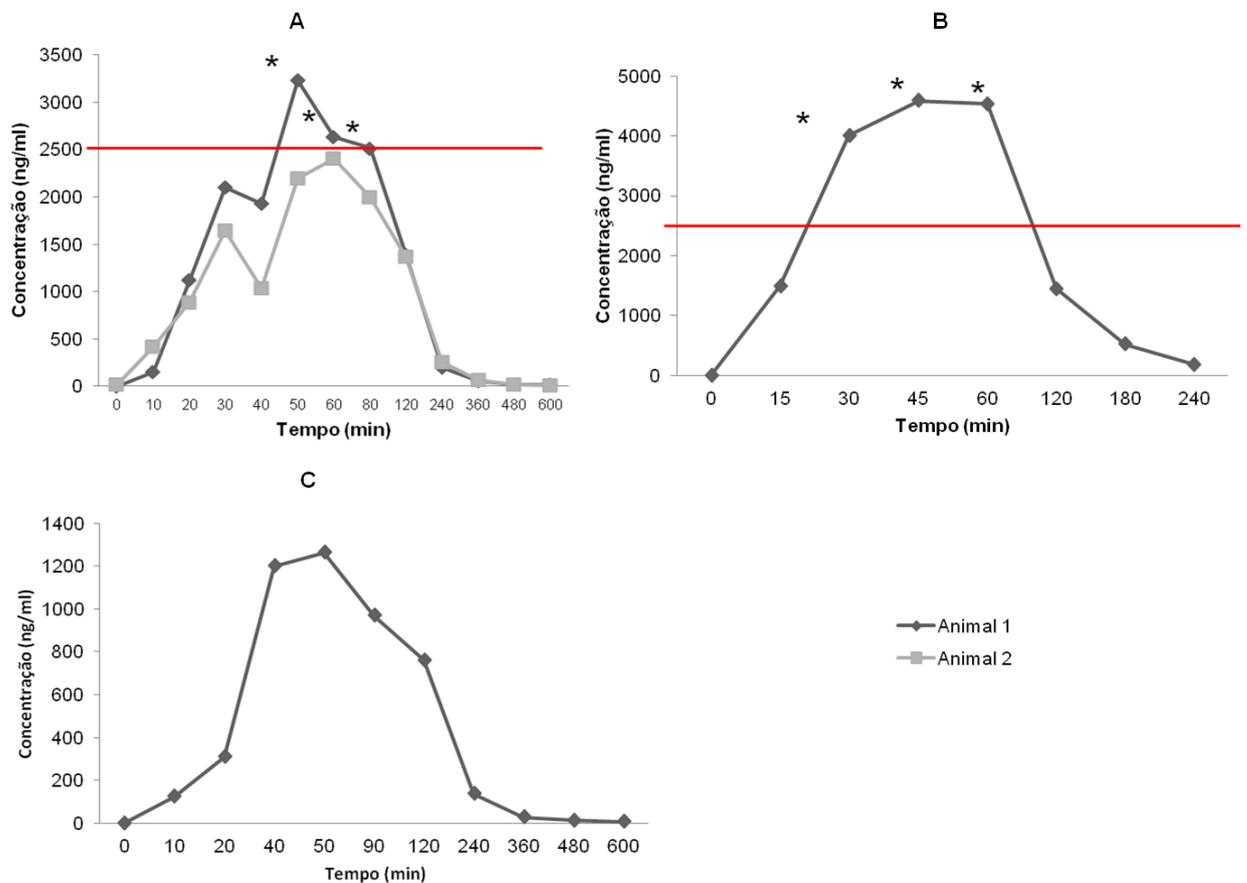
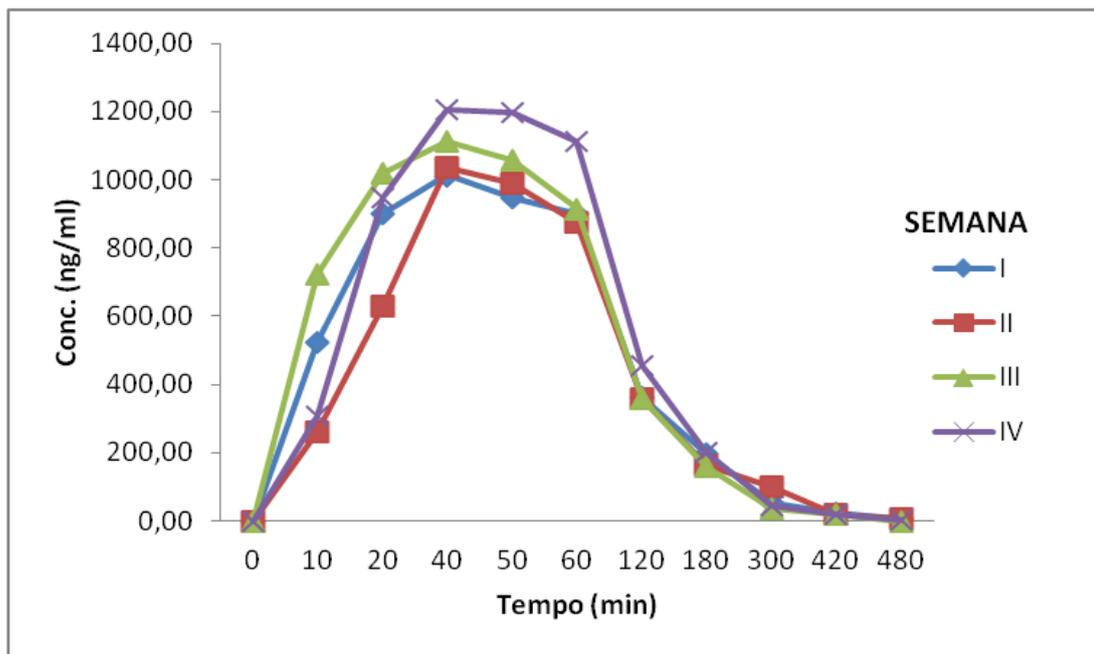


Gráfico A, primeiro teste para estabelecimento dos tempos de coleta com três pontos acima do limite da curva; B, três pontos do animal 1 acima da linha de corte, C, todos os pontos dentro da curva. Os pontos acima da curva não são seguramente quantificados. *Pontos que ultrapassaram a maior concentração da curva de calibração (2500 ng/ml).

4.4 BIOEQUIVALÊNCIA

O ensaio controle foi feito com quatro animais somente e, apresentou curvas das semanas I, II, III e IV bem próximas. O gráfico 6 representa as médias dos animais por semana e, o $C_{m\acute{a}x}$ da primeira semana foi 1012,71 ng/ml e $T_{m\acute{a}x}$ 40 min; concentração máxima 1037,51 ng/ml no tempo de 40 min na semana II; $C_{m\acute{a}x}$ 1110,54 ng/ml e $T_{m\acute{a}x}$ 40 min na terceira semana e; na última semana obteve-se $C_{m\acute{a}x}$ 1204,23 ng/ml também no tempo de 40 min após a administração do medicamento.

Gráfico 6 – Curva do teste dos animais controle

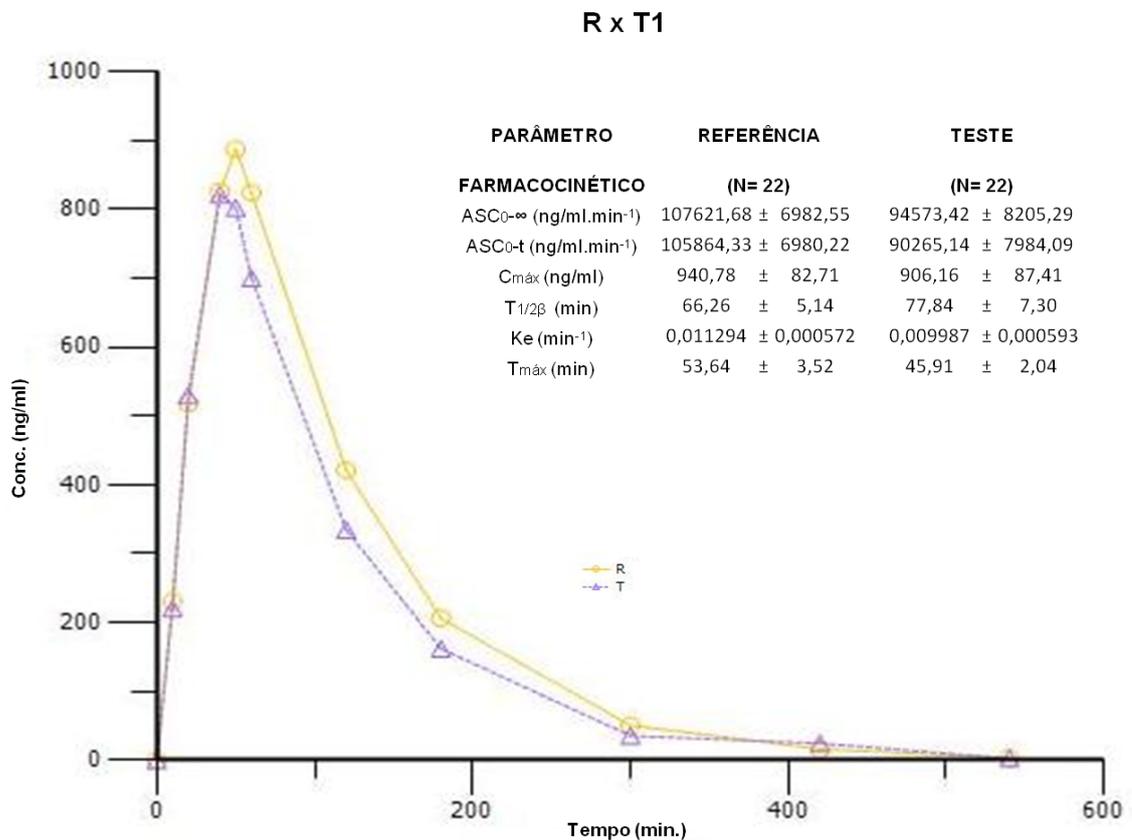


O gráfico representa curva das médias por semana dos quatro animais em concentração (ng/ml) por tempo (min). A linha azul representa a primeira semana de testes, a vermelha a segunda semana, a verde terceira e a quarta semana é representada pela linha roxa. Todas apresentaram o mesmo $T_{m\acute{a}x}$ e $C_{m\acute{a}x}$. Cada ponto marcado na curva representa a média aritmética dos 4 animais em cada ponto e coleta.

A bioequivalência dos medicamentos foi feita utilizando a formulação R como padrão de referência. A formulação T1 não foi considerada bioequivalente e, os valores absolutos da formulação T1 foram; a média aritmética da área sob a curva do zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$) foi de $94573,42 \pm 8205,29$ min*ng/ml e a área sob a curva de zero à última concentração mensurável (ASC_{0-t}) foi $90265,14 \pm 7984,09$ min*ng/ml; a concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$) foi $906,16 \pm 87,41$ ng/ml e o momento em que isso aconteceu ($T_{m\acute{a}x}$) foi $45,91 \pm 2,04$ min; a constante de eliminação (K_e) foi

$0,009987 \pm 0,000593$ min e, tempo de meia vida de eliminação ($T_{1/2\beta}$) $77,84 \pm 7,30$ min; dados resumidos na figura 7. Os dados do quadro 13 apresentam a comparação do medicamento T1 x R, $C_{m\acute{a}x}$ 94,54%, intervalo de confiança de 86,23 – 103,66 e poder de 0,9883; ASC_{0-t} 83,47%, intervalo de 75,50 – 95,27 e poder de 0,9762; $ASC_{0-\infty}$ 85,69% e intervalo de 77,56 – 94,66 e poder de 0,9775.

Figura 7 – Curva do teste de bioequivalência do medicamento T1 e parâmetros farmacocinéticos.



A curva representa a concentração (ng/ml) por tempo em minutos e, a linha amarela com círculos mostra os dados do medicamento de referência e a linha roxa com triângulos representa o medicamento genérico testado. Cada ponto marcado na curva representa a média geométrica dos 22 animais em cada ponto e coleta. Ao lado são apresentados os parâmetros farmacocinéticos do medicamento de referência e do medicamento teste, ambos testados na dose de 3 mg/kg. Valores referentes à média aritmética ± erro padrão. Erro padrão = desvio padrão/ \sqrt{n} .

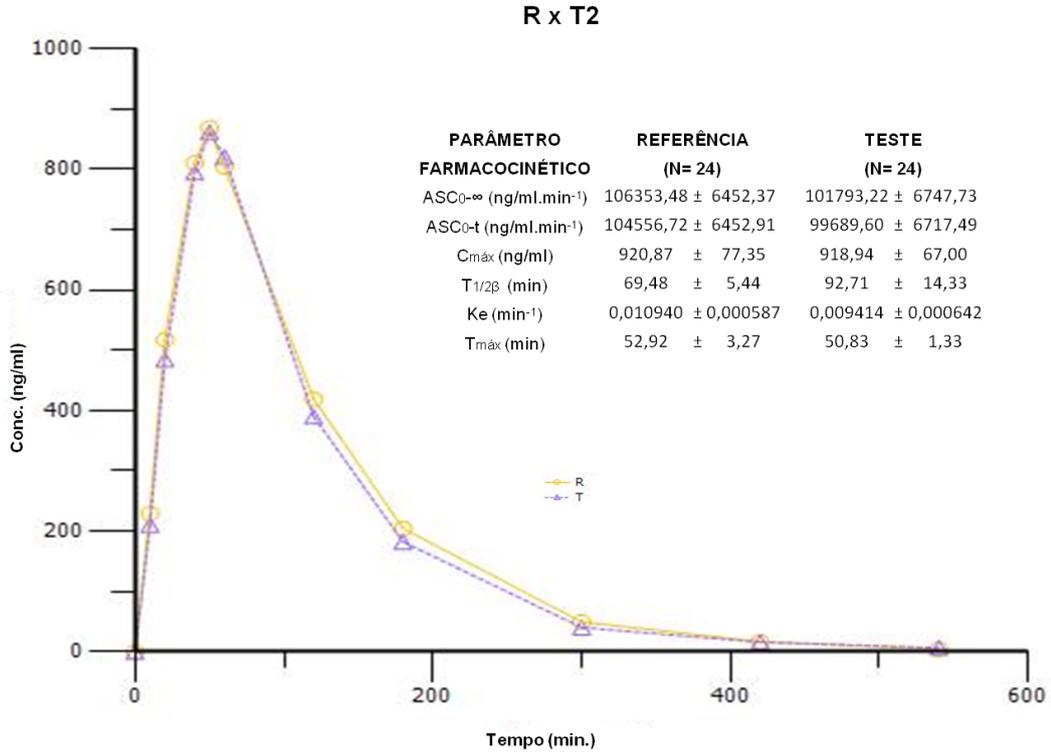
Quadro 13 – Análise da bioequivalência do medicamento T1

Resultado da Análise de Bioequivalência (R x T1)			
Parâmetro Farmacocinético	Razão* (%)	Intervalo de Confiança de 90%	Poder
*C_{máx} {ng/mL}	94,54	[86.23 - 103.66]	0,9883
ASC_{0-t} {min}{ng/mL}	83,47	[75.50 - 95.27]	0,9762
ASC_{0-∞} {min}*{ng/mL}	85,69	[77.56 - 94.66]	0,9775

O quadro representa as razões da comparação do medicamento de referência e do genérico teste. A marcação * representa o parâmetro farmacocinético avaliado para determinar a bioequivalência entre os medicamentos e o intervalo de confiança deve estar entre 90 e 125. Razão = (média geométrica T/R)*100. R= medicamento de referência; T= medicamento teste.

Já os resultados da análise do medicamento T2, foram positivos para bioequivalência. Os valores absolutos dessa formulação foram; média aritmética da ASC_{0-∞} foi de 106353,48 ± 6452,37 min*ng/ml e a ASC_{0-t} foi 104556,72 ± 6452,91 min*ng/ml; a C_{máx} foi 920,87 ± 77,35 ng/ml e o momento em que isso aconteceu (T_{máx}) foi 52,92 ± 3,27 min; o Ke foi 0,010940 ± 0,000587 min e, a meia vida de eliminação foi 69,48 ± 5,44 min; dados resumidos na figura 8. Na comparação do medicamento T2 x R; C_{máx} 100,70%, intervalo de confiança de 87,38 – 116,04 e poder de 0,8323; ASC_{0-t} 94,39%, intervalo de 83,05 – 107,28 e poder de 0,8923; ASC_{0-∞} 94,75% e intervalo de 83,55 – 107,46 e poder de 0,9012 (quadro 14).

Figura 8 – Curva do teste de bioequivalência do medicamento T2 e parâmetros farmacocinéticos



A curva representa a concentração (ng/ml) por tempo em minutos e, a linha amarela com círculos mostra os dados do medicamento de referência e a linha roxa com triângulos representa o medicamento genérico testado. Cada ponto marcado na curva representa a média geométrica dos 24 animais em cada ponto e coleta. Ao lado são apresentados os parâmetros farmacocinéticos do medicamento de referência e do medicamento teste, ambos testados na dose de 3 mg/kg. Valores referentes à média aritmética ± erro padrão. Erro padrão = desvio padrão/ √n.

Quadro 14 – Análise de bioequivalência do medicamento T2.

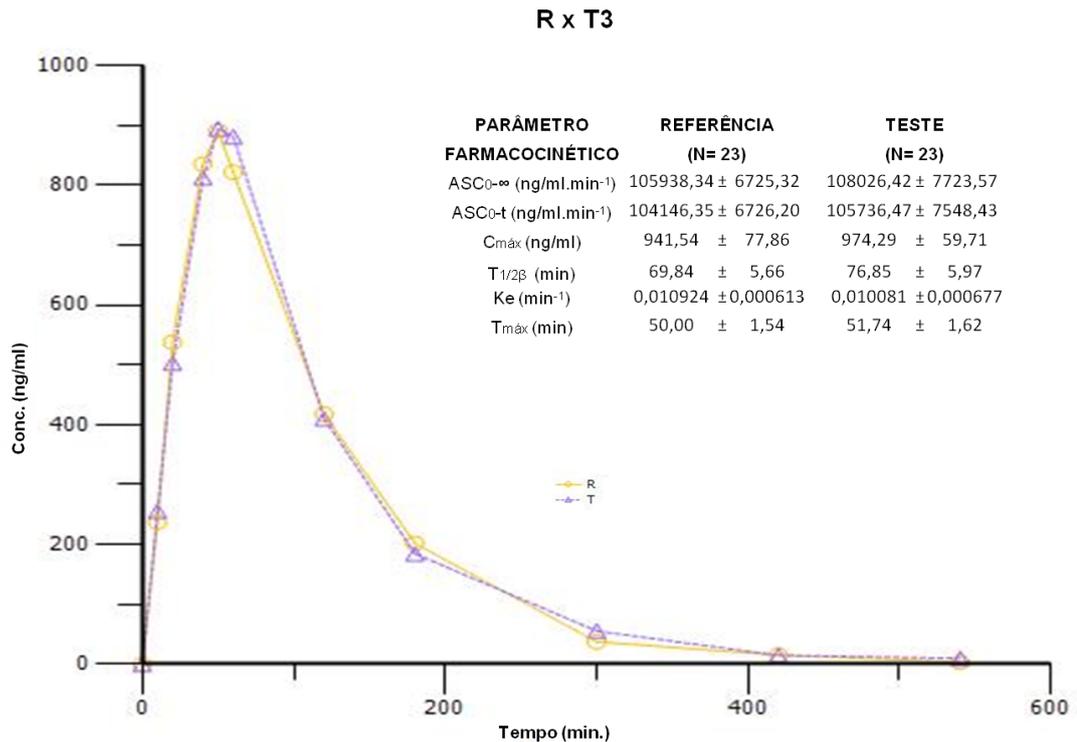
Resultado da Análise de Bioequivalência (R x T2)			
Parâmetro Farmacocinético	Razão* (%)	Intervalo de Confiança de 90%	Poder
C_{máx} {ng/mL}	100,70	[87.38 - 116.04]	0,8323
ASC_{0-t} {min}*{ng/mL}	94,39	[83.05 - 107.28]	0,8923
ASC_{0-∞} {min}*{ng/mL}	94,75	[83.55 - 107.46]	0,9012

O quadro representa as razões da comparação do medicamento de referência e do genérico teste. De acordo com os dados, o medicamento genérico T2 é bioequivalente ao de referência. Razão = (média geométrica T/R)*100. R= medicamento de referência; T= medicamento teste.

A formulação T3 também foi bioequivalente ao medicamento R e, a média da área sobre a curva de zero ao infinito foi 108026,42 ± 7723,57 min*ng/ml e ASC_{0-t} 105736,47 ± 7548,43 min*ng/ml; concentração máxima de 974,29 ± 59,71 ng/ml; tempo de meia vida de eliminação de 76,85 ± 5,97 min; constante de eliminação 0,010081 ± 0,000677 min e T_{máx} 51,74 ± 1,62 min (figura 9). Os valores encontrados

quando comparados ao R foram, $C_{m\acute{a}x}$ 106,58%, intervalo de confiança de 95,01 – 119,56 e poder de 0,9400; ASC_{0-t} 100,77%, intervalo de 87,64 – 115,87 e poder de 0,8426; $ASC_{0-\infty}$ 101,13% e intervalo de 88,12 – 116,06 e poder de 0,8511 (quadro 15).

Figura 9 – Curva do teste de bioequivalência do medicamento T3 e parâmetros farmacocinéticos.



A curva representa a concentração (ng/ml) por tempo em minutos e, a linha amarela com círculos mostra os dados do medicamento de referência e a linha roxa com triângulos representa o medicamento genérico testado. Cada ponto marcado na curva representa a média geométrica dos 23 animais em cada ponto e coleta. Ao lado são apresentados os parâmetros farmacocinéticos do medicamento de referência e do medicamento teste, ambos testados na dose de 3 mg/kg. Valores referentes à média aritmética ± erro padrão. Erro padrão = desvio padrão/√n.

Quadro 15 – Análise da bioequivalência do medicamento T3

Resultado da Análise de Bioequivalência (R x T3)			
Parâmetro Farmacocinético	Razão* (%)	Intervalo de Confiança de 90%	Poder
$C_{m\acute{a}x}$ {ng/mL}	106,58	[95.01 - 119.56]	0,9400
ASC_{0-t} {min}*{ng/mL}	100,77	[87.64 - 115.87]	0,8426
$ASC_{0-\infty}$ {min}*{ng/mL}	101,13	[88.12 - 116.06]	0,8511

O quadro representa as razões da comparação do medicamento de referência e do genérico teste. De acordo com os dados, o medicamento genérico T3 é bioequivalente ao de referência. Razão = (média geométrica T/R)*100. R= medicamento de referência; T= medicamento teste. Razão = (média

5. DISCUSSÃO

A desconfiança a cerca da qualidade dos produtos genéricos nos dias de hoje, quase 16 anos após a criação da lei nº 9.787/99 demonstra a necessidade de campanhas de esclarecimentos para a população e comprovações da qualidade pós-mercado a fim de assegurar aos prescritores confiança para adotar esses medicamentos como alternativa terapêutica ao pacientes (ANVISA, 1999a). Como já dito anteriormente, o baixo preço dos genéricos está associada à ausência de gastos com pesquisa e desenvolvimento e, em marketing e propagandas. Mas, os custos com o controle e garantia da qualidade são mantidos e devem seguir o guia de boas práticas de fabricação da Anvisa. Baseado nisso, pode-se dizer que a qualidade do medicamento está garantida.

Entretanto, algumas classes de medicamentos necessitam de um olhar mais atento em relação à qualidade e eficácia do produto, seja ela por motivos de estreita janela terapêutica, como os antiparkinsonianos e antiepiléticos ou, como no caso dos antibióticos, risco de desenvolvimento de resistência bacteriana. Contudo, o controle de qualidade realizado, em casos de suspeita de ineficiência do produto ou reações adversas é relativo ao teor, características organolépticas, microbiológicas e potência farmacológica.

De acordo com a problemática apresentada, nosso trabalho teve como objetivo principal desenvolver e estudar um modelo farmacológico que pudesse ser aplicado a estudos de bioequivalência em ratos e sua possível aplicação ao controle de qualidade pós-mercado de medicamentos. O teste de potência não reprovou nenhum dos medicamentos testados, mas a análise farmacocinética foi capaz de reprovar um dos três medicamentos genéricos testados.

A escolha do medicamento seguiu os critérios: (1) amplo consumo, (2) importância do medicamento no tratamento da doença e potencial risco ao paciente, (3) forma farmacêutica, (4) via de administração e (5) algum resultado negativo para bioequivalência. A eleição de um medicamento já testado anteriormente pelo laboratório SEFAR foi feita também, para que não houvesse necessidade de desenvolvimento de metodologia de extração, apenas uma adequação à capacidade volêmica do animal. Com isso, após a revisão dos arquivos, ficou evidente a escolha

da Amoxicilina (AMX), uma vez que a mesma já possuía estudo com finalidade de registro e que não foi aprovado no teste de bioequivalência e, por ser um importante medicamento no tratamento de infecções bacterianas. A Amoxicilina é um β -lactâmico do grupo das penicilinas e, seu mecanismo de ação atua impedindo a síntese da parede celular bacteriana (GOODMAN, 2006). É um antibiótico de amplo espectro e, principalmente por esse motivo, muito prescrito para tratamento de infecções causadas por bactérias de adultos e crianças (LIMA, 2008; SCARCELA, 2011).

Um dos ensaios utilizados para controle da qualidade pós-mercado de antimicrobianos é a potência microbiológica e, foi esse o primeiro teste realizado com as quatro amostras adquiridas no mercado. O resultado obtido não reprovou nenhum dos medicamentos, na menor e na maior dose, não houve diferenças significativas entre as formulações. Somente no produto T1, na dose de 0,2 ng/ml uma diferença de 5% foi observada, mas além de estar dentro da variação aceita pela farmacopeia, a possível alteração não ocorreu em todas as diluições o que pode significar um erro pontual. Portanto, o resultado foi aceito e todas as amostras foram consideradas com grau de potência aceitável de acordo com os padrões estabelecidos pela literatura específica. Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Farago, P. V. e colaboradores, que testou a potência da Amoxicilina em suspensões orais pelo mesmo método de cilindros em placa, de um medicamento genérico, um similar e o medicamento de referência, comercializados no Brasil e, concluíram que todas as amostras testadas estão dentro dos limites estabelecidos (FARAGO, 2006).

Apesar do teste não ter indicado nenhuma alteração no desempenho do medicamento quando se refere à potência, este não assegura o real efeito do medicamento. É permitido que o medicamento genérico apresentasse conteúdo do excipiente diferente do medicamento de referência, mas essas mudanças podem resultar em alteração na absorção, interação com o princípio ativo, entre outros processos de distribuição do medicamento entre os diferentes compartimentos orgânicos e com isso afetar a chegada do medicamento ao seu sítio de ação. Os excipientes podem ser usados, por exemplo, para melhorar o sabor ou aparência, auxiliar no processo de fabricação (agentes deslizantes, lubrificantes), promover a

estabilidade (antioxidantes). Alguns desempenham papel mais importante, como no caso de fármaco com baixa solubilidade, adiciona-se um surfactante ou agente molhante para facilitar a liberação e dissolução (ARIETA, 2014). Por isso, mudança no conteúdo do excipiente pode acarretar em variação da absorção e influenciar na biodisponibilidade do medicamento (SHIBATA et al, 2012). Foram observadas nas amostras, além da presença de corante e flavorizante, a dificuldade de resuspensão do medicamento R, além da quantidade maior do pó das formulações T1, T2 e T3 para mesma concentração de R.

A eficácia do tratamento contra determinada infecção depende principalmente da concentração do antibiótico no local de ação, que deve ser suficiente para inibir o crescimento do patógeno, mas não deve ser tóxica às células humanas. Se o tratamento não for capaz de manter um nível suficiente do medicamento no local de ação, aumenta-se a chance de desenvolvimento de resistência bacteriana, uma vez que nem todos os micro-organismos serão inativados e, o risco de disseminação da infecção para outros sítios, podendo culminar em uma infecção sistêmica e à morte (GOODMAN, 2006).

O teste capaz de avaliar a quantidade de medicamento disponível no sangue é o de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência, realizado somente para fins de registro e renovação, quando exigido (RDC nº 135/2003), é realizado em voluntários sadios humanos e possui elevados custos de realização devido à necessidade de contratação de um centro clínico credenciado, bem como os custos com os voluntários e os profissionais de saúde que fazem o acompanhamento dos mesmos. Com isso, o desenvolvimento de um modelo animal capaz de comprovar a bioequivalência tanto dos medicamentos genéricos quanto dos similares, asseguraria a eficácia, qualidade e segurança e, permitiria a realização de um controle pós-mercado desses fármacos (ANVISA, 2003b).

Para desenvolvimento do modelo experimental citado acima, inicialmente seria utilizada a técnica de canulação da veia jugular do animal através de processo cirúrgico, com anestesia e, com o objetivo de diminuir o estresse e melhorar o bem estar do animal, as coletas seriam realizadas sem contato com o roedor através de um sistema preso à caixa (NOLAN et al, 2008). Porém, a busca pela alta sensibilidade da análise resultou na melhora do desempenho do método e, a

quantidade de plasma necessária para quantificação passou de 200 µl para 25 µl, o refinamento do método diminuiu o número de animais necessários para realização do estudo e, mais importante, reduziu consideravelmente o desconforto e melhorou a recuperação pós-coleta dos animais. A diminuição de 87,5% da quantidade necessária de material possibilitou que um novo desenho experimental fosse adotado, possibilitando o desenvolvimento do trabalho no desenho apresentado.

A otimização do método de análise merece destaque, pois além da dificuldade da técnica cirúrgica, havia alta probabilidade de morte durante e após a cirurgia o que aumentaria muito o número de animais utilizados. E ainda, chance de entupimento do sistema da cânula, que resultaria na exclusão do roedor do estudo. A impossibilidade de utilizar o mesmo animal para diferentes formulações impediria a randomização adequada para o número de amostras, aumentaria a quantidade de ratos necessários para gerar um resultado significativo e, acrescentaria aos cálculos de incerteza estudo, a variabilidade individual (PETERNEL et al, 2010). Outras possíveis interferências nos resultados poderiam ser devido a utilização da salina para repor a volemia após a retirada de grande volume sanguíneo e, uso de anestésico/ analgésico antes e após a cirurgia e, o estresse cirúrgico a que os roedores estariam submetidos. Os animais utilizados seriam eutanasiados após o fim do estudo mas, no novo desenho experimental após o final dos testes, os roedores não foram imediatamente sacrificados porque poderiam ser úteis novamente para outros fins, contribuindo dessa forma, para a efetiva redução e refinamentos exigidos pelos conselhos de ética para uso de animais em todo o mundo.

Anterior à etapa farmacocinética, foi feita a validação do método analítico utilizado no estudo. Segundo a Anvisa, ela deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Ou seja, fornece evidências de que o método empregado para análise é adequado, rastreável e que os resultados são confiáveis (RIBANI et al, 2004). Todo o processo seguiu as diretrizes da RDC nº27/ 2012 que estabelece os requisitos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos no Brasil (ANVISA, 2012). O fato de ser credenciado junto à Anvisa e habilitado a realizar testes de bioequivalência, sendo o único presente no Rio de Janeiro e, a expertise do laboratório, em realizar rotineiramente estudos

farmacocinéticos possibilitou o rápido processo de validação e alta confiabilidade dos resultados obtidos.

A técnica de análise utilizada para detecção da Amoxicilina no plasma de ratos foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao espectro de massas e, uma vez que esta técnica é descrita na literatura como extremamente eficiente na determinação e quantificação da AMX em fluidos biológicos (KERC, OPARA, 2007; HOFFMAN et al, 1998; REYNS et al, 2008). A validação comprovou, através de diversos testes, as escolhas corretas para as substâncias utilizadas no estudo, como o padrão interno, fases móveis e colunas cromatográficas. Alguns dos parâmetros avaliados nesse processo permitiram que a etapa de coleta tivesse uma boa logística com a garantia de bom resultado. Um exemplo disso é o teste de seletividade que verificou a presença de possíveis interferentes, componentes da matriz e impurezas que possam coeluir com o analito de interesse. Este teste comparou amostras normais, lipêmicas e hemolisadas e conclui que a variação do plasma não interfere na quantificação da Amoxicilina. Outro parâmetro analisado com esses mesmos três tipos de amostras foi o teste de efeito matriz que garantiu, juntamente com o teste anterior, que o plasma foi uma boa escolha quanto matriz e que suas características químicas não interferiram na análise. Quanto ao tempo de permanência das amostras em freezer aguardando o momento da análise ou em cima da bancada durante o processamento, foram feitos os testes de estabilidade em diferentes tempos e condições que comprovou que a exposição do material a diversas variações de temperatura não influenciou no resultado, comprovando a estabilidade do material em condições de ensaio. Ao fim da validação, o conjunto de testes assegurou as condições do protocolo de coleta e armazenamento e garantiu a confiança dos resultados obtidos.

A utilização de animais para predição da farmacocinética de substância já é bastante utilizada na literatura como, um estudo que avalia a farmacocinética e farmacodinâmica de um novo composto em macacos (ITO et al, 2009), a avaliação da farmacocinética de um extrato vegetal em ratos (NAIR et al, 2014), artigo que buscam alguma correlação entre o estudos experimentais em ratos e humanos a respeito da absorção por administração via oral (BARVE, CHIOU, 1998) ou ainda a ligação entre perfis de concentração de três diferentes espécies animais e a humana

(CHEN, MAGER, KAGAN, 2013). Apesar de muitas outras publicações envolvendo a farmacocinética de ratos, a abordagem do presente trabalho em muito se diferencia.

Um estudo de Baracho e colaboradores compara a bioequivalência do maleato de enalapril de dois medicamentos similares, um genérico e o medicamento de referência. Contudo, o trabalho não apresenta dados de biodisponibilidade relativa não podendo, portanto, afirmar a bioequivalência dos medicamentos, de acordo com a RDC nº17/ 2007 (BARACHO et al, 2008). Outro estudo com ratos para determinação da farmacocinética utiliza quatro grupos, recebendo a mesma dosagem, mas as coletas foram feitas em tempos diferentes. Esse desenho experimental foi necessário devido a quantidade de sangue coletado (0,5 ml) em 12 tempos de coleta diferentes o que totalizaria um volume de 6 ml, inviável para a coleta em um único animal e que vai contra as normas estabelecidas pelo conselho nacional de controle de experimentação animal (CONCEA) (NAIR et al, 2014). Além disso, esse protocolo de estudo aumenta o desvio e adiciona a variabilidade individual nos resultados obtidos, o que diminui a robustez do ensaio. Sem a mudança de volume a ser coletado, permitido pela otimização do método analítico, nosso estudo também seria afetado pela variabilidade individual já que cada animal receberia apenas um medicamento, além da interferência da reposição volêmica. Com essa melhora na análise, o trabalho aumentou a confiabilidade dos resultados e seguiu todas as recomendações da Anvisa para estudos de bioequivalência, do CONCEA e, conseqüentemente, do CEUA Fiocruz para realização de ensaios com animais. O fato de cada animal ter sido analisado individualmente se diferencia de alguns artigos que utilizam o *pool* de plasma para analisar os pontos coletados o que gera também um impacto importante sobre o resultado, uma vez que desse modo não há como determinar a variação de resposta dos animais individualmente (SCHEIBLE et al, 2013).

O teste de quatro formulações diferentes exigiu a utilização do delineamento de Williams, mais usado na comparação de duas ou mais amostras, composto de quatro sequências e quatro períodos e, deste modo, elimina a variabilidade individual. O número de roedores utilizados em nosso estudo seguiu o recomendado para o número de formulações em estudo *crossover* 4 x 4, que exclui a ocorrência de possível efeito matriz, totalizando 24 animais, a fim de gerar poder de teste acima

de 80%, que significa que o n foi aceitável e o estudo bem conduzido, quanto maior a variabilidade, menor o poder do teste (BRAGA, 2008). Em nenhum dos artigos consultados, há preocupação com a correta randomização do grupo experimental e, no caso de ocorrência de efeitos de sequencia (residuais), a randomização adequada valida o estudo (ANVISA, 2006). Além disso, o presente trabalho procurou minimizar os interferentes que pudessem diminuir a confiabilidade dos resultados e, quanto mais parecido for o delineamento experimental em animais com os estudos feitos em humanos, mais inferências poderão ser feitas futuramente quando houver mais dados concordantes com estes apresentados.

Embora o estudo dos animais controle, que receberam durante as quatro semanas o mesmo medicamento, não tenha no momento os parâmetros farmacocinéticos para comparação, parece haver similaridade nas curvas. O fato de termos poucos animais para comparação, aumenta o coeficiente de variação e, pode ser por esse motivo que elas não se sobrepuseram. E, em conjunto com os dados obtido no teste de bioequivalência, podemos afirmar que o período de uma semana de intervalo (*washout*) entre as administrações foi suficiente para a recuperação do roedor e, eliminação completa do fármaco, que pode ser evidenciado pelos resultados do tempo zero da coleta, feito antes da administração do medicamento.

Os resultados do teste de bioequivalência confirmam que a discussão a cerca do controle de qualidade dos medicamentos feito atualmente e, a real importância dos resultados desses testes. A aprovação de todos os medicamentos quanto a potência microbiológica, afastaria a desconfiança quanto a eficácia do medicamento e aprovaria para o mercado, contudo, essa afirmação não é verdadeira e nossos resultados sugerem fortemente isso, uma vez que a aprovação de um ensaio validado para o controle de qualidade de medicamentos foi incapaz de determinar desvios na qualidade que só seriam detectados na fase de registro do medicamento, colocando com isso a saúde da população em risco. Para que o medicamento seja eficaz, ele deve estar disponível em concentração adequado no sítio de ação por tempo suficiente para combater a enfermidade, como já discutido anteriormente. O teste de biodisponibilidade mostrou que uma das formulações não é bioequivalente ao medicamento de referência e, quando analisado os dados da potência, o medicamento T1 não apresentou diferença no potencial de inibição no teste *in vitro*

que pudesse comprometer o uso do produto. Ou seja, o princípio ativo presente na suspensão oral funciona e, provavelmente, está na concentração indicada pelo fabricante, um teste de teor poderia confirmar a quantidade correta. Contudo, a presença do fármaco e sua efetividade *in vitro* não são suficientes para assegurar a eficácia *in vivo* do medicamento.

O fato das outras duas formulações serem bioequivalentes ao medicamento de referência garante que o resultado obtido para a formulação T1 não é falso-negativo, pois confirma a boa execução de todas as etapas e que o delineamento experimental foi confiável. Além disso, o poder do teste é outro indicativo da confiabilidade do ensaio e, para serem aprovados, todos devem estar acima de 80%. Os medicamentos T2 e T3 apresentaram perfil muito próximo ao do medicamento de referência com $ASC_{0-\infty}$ 94,53% e 100,62%, respectivamente.

Fica claro com isso, que há uma importante lacuna nas respostas obtidas pelos testes exigidos para fins de registro e para controle de qualidade pós-mercado, uma vez que, como discutido anteriormente, há forte sugestão da incapacidade dos testes de potência farmacológica, teor e dissolução de preverem com eficiência a eficácia do medicamento. É importante destacar que os testes pós registro não levam em conta a participação do organismo complexo como dos mamíferos, feito apenas *in vitro*, sendo difícil mimetizar a resposta obtida com a real farmacocinética do medicamento.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que somente a realização de testes de potência não é suficiente para prever outras possíveis alterações no medicamento. Apesar de nenhuma alteração ter sido identificada no ensaio de potência microbiológica, o teste de bioequivalência em ratos reprovou uma das amostras.

Apesar das amostras não terem sido em quantidades significativas para que fosse representativa de um lote, já que foi testado apenas um frasco de cada marca, os resultados foram satisfatórios para um primeiro estudo de estabelecimento do modelo animal. E, mais testes serão necessários para diversificar a classe medicamentosa e realizar possíveis testes de comparação dos resultados obtidos em animais com aqueles feitos em humanos a fim de traçar uma correlação no perfil farmacocinético.

Conclui-se, por fim, que os nossos dados sugerem que o controle de qualidade pós-mercado realizado nos dias de hoje, quando feito, não é plenamente capaz de inferir que a eficácia está de acordo com o esperado. A fiscalização deve ser feita não apenas nos medicamentos genéricos ou similares, mas também nos de referência para que o padrão de qualidade e segurança seja o mesmo para todos.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei n. 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 11 de fev. 1999.

ANVISA. Resolução - RDC nº 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 de mai. de 2003a.

ANVISA. Resolução - RDC nº 133, de 29 de maio de 2003. Dispões sobre o registro de medicamento similar e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 de mai. de 2003b.

ANVISA. Resolução RE nº 1170, de 19 de abril de 2006. Publica o guia para provas de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência de medicamentos. Revoga a Resolução RE nº 397, de 12 de novembro de 2004. **Diário Oficial da União**, 19 abr. 2006.

ANVISA. Resolução - RDC nº 17, de 02 de março de 2007. Aprova o regulamento técnico para registro de medicamento similar. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de mar. de 2007.

ANVISA. **Blog da rede sentinela**. Brasília, [2012a]. Disponível em: <<http://redesentinela-anvisa.blogspot.com.br/p/sobre-rede-sentinela.html>>. Acesso em: 07/08/2014.

ANVISA. Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, 17 mai. 2012b.

ANVISA. Resolução - RDC nº 58, de 10 de outubro de 2014. Dispões sobre as medidas adotadas junto à Anvisa pelos titulares de registro de medicamento para a intercambialidade de medicamentos similares com o medicamento de referência. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de out. de 2014.

ARIETA, A. G. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: Impact on bioequivalence. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V.65, p.89-97, 2014.

BARACHO et al. Estudo da bioequivalência de quatro diferentes marcas comerciais de maleato de enalapril em ratos espontaneamente hipertensos. **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol 23, n.2, p.173, 2008.

BERTOLDI, Andréa D.; BARROS, Aluísio J. D.; HALLAL, Pedro C.. Generic drugs in Brazil: known by many, used by few. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n.6, dez. 2005.

BRAGA, D. M. **Planejamento e análise de estudos de bioequivalência: comparação de delineamentos do tipo cross-over**. Dissertação de Mestrado - Departamento de Estatística do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal: **Centro Gráfico**, 292 P., 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.916, de 30 de outubro de 1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de Nov. de 1998.

BRASIL. República Federativa do Brasil. Lei nº 9782 de 26 de fevereiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Aquisição de medicamentos para assistência farmacêutica no SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

CARVALHO, M. C. R. D; ACCIOLY J. H.; RAFFIN, F. N. Representações sociais do medicamento genérico por consumidores residentes em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n.3, mar. 2006b.

CARVALHO, M. C. R. D; ACCIOLY J. H.; RAFFIN, F. N. Representações sociais do medicamento genérico por usuários. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 4, dez. 2006a.

CHEN T., MAGER D. E., KAGAN L. Interspecies Modeling and Prediction of Human Exenatide Pharmacokinetics. **Pharm Res.** V.30, p.751–760, 2013.

CHIOU, W.L.; BARVE, A. Linear correlation of the fraction of oral dose absorbed of 64 drugs between humans and rats. **Pharmaceutical Research.**V.15 n 11, p.1792-1795, 1998.

FARAGO et al. Método microbiológico para doseamento da potência da amoxicilina em suspensões orais. **Acta. Farm. Bonaerense.** V. 25, n. 1, p.112-6, 2006.

GANTHER, J.M.; KRELING D. H. Consumer perceptions of risk and required cost savings for generic prescription drugs. **J Am Pharm Assoc.**, V.40, p.378-83, 2000.

GOODMAN & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. Décima primeira edição. Rio de Janeiro: **McGraw-Hill Interamericana do Brasil**, 2006

HOFFMAN et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic rationales for the development of an oral controlled-release amoxicillin dosage form. **Journal of Controlled Release.** V.54, p.29–37, 1998.

ITO et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of CS-526 in Cynomolgus monkeys. **Biol. Pharm. Bull.** V.32, n.12, p.2010-2017, 2009.

IDEC. **Idec constata que preço de medicamentos sobe acima da inflação em quatro anos.** São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.idec.org.br/em-acao/em-foco/idec-constata-que-preco-de-medicamentos-sobeacima-da-inflaco-em-quatro-anos>>. Acesso em: 10 Jun 2013.

KERC, J., OPARA, J. A new amoxicillin/ clavulanate therapeutic system: Preparation, in vitro and pharmacokinetic evaluation. **International Journal of Pharmaceutics.** V.355, p. 106-113, 2007.

LIMA et al. Utilização de um sistema de gerenciamento de benefícios farmacêuticos (PBM) para a caracterização do perfil de prescrição e aquisição de antibióticos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 44, n. 2, Jun. 2008

NAIR et al. A validated HPLC-ESI-MS/MS method for quantification of 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid from rat plasma and its application to pharmacokinetic study using sparse sampling methodology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** V.100, p.190–198, 2014

NOLAN, T. E., LOUGHNANE M., JACOBSON, A. Tethered Infusion and Withdrawal in Laboratory Animals. **ALN Magazine**. 01 Jul 2008.

PETERNEL, L.; Skrajnar, S.; Cerne, M. A comparative study of four permanent cannulation procedures in rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. V.61, p. 20–26, 2010

PORTELA et al. Políticas públicas de medicamentos: trajetória e desafios. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 31, n 11, p. 09-14, 2010.

PRÓ- GENÉRICOS. **História dos medicamentos genéricos no Brasil**. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.progenericos.org.br/historia.shtml>>. Acesso em: 09/06/2013.

RAMSEY, J.; Andersen, M.E. A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V.73, p.159-175, 1984

RIBANI et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Vol. 27, n.5, p.771-780, 2004.

ROCHA et al. Levantamento de dados sobre o conhecimento e informação acerca dos medicamentos genéricos em uma população de pacientes do serviço de saúde ambulatorial do Recife, Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n.5, maio 2007.

REYS et al. Rapid method for the quantification of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues. **Journal of Chromatography B**. V.861, p.108–116, 2008.

SANT et al. Abordagem fisioterapêutica na doença de Parkinson. **Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, Passo Fundo, v. 5, n. 1, p. 80-89. Jan./jun. 2008.

SINGH, S.S. Preclinical Pharmacokinetics: An approach towards safer and efficacious drugs. **Current Drug Metabolism**. V. 7, n. 2, p.165-182, 2006.

SCARCELA, A. M. A.; MUNIZ, J. W. A.; CIRQUEIRA, J. Z. Investigação do uso indiscriminado de amoxicilina em crianças na faixa etária de 2 a 10 anos. **Cenarium Farmacêutico**, n. 4, Mai/ Jun 2011.

SHIBATA et al. Comparison of Particle Size and Dispersion State among Commercial Cyclosporine Formulations and Their Effects on Pharmacokinetics in Rats. **Chem. Pharm. Bull.** V.60, n. 8, p. 967-975, Ago 2012.

WARD, K. W.; SMITH, B.R. A. Comprehensive quantitative and qualitative evaluation of extrapolation of intravenous pharmacokinetic parameters from rat, dog, and monkey to humans clearance. **Drug Metabolism and Disposition.** V. 32, n. 6, p.603-611, 2004.

WARD, L. S. Levothyroxine and the problem of interchangeability of drugs with narrow therapeutic index. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 55, n.7, Oct. 2011