UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE BIOFARMACÊUTICA DA
AMPICILINA SOB AS FORMAS DE SUSPENSÃO E CÁPSULAS:
ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* (BIOEQUIVALÊNCIA)**

VLADI OLGA CONSIGLIERI

Tese para obtenção do Grau de DOUTOR

Orientador:

Prof. Tit. JOÃO FERNANDES MAGALHÃES

Co-orientador:

Profª. Drª. SÍLVIA STORPIRTIS

São Paulo

1996

1496J

VLADI OLGA CONSIGLIERI

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE BIOFARMACÊUTICA DA
AMPICILINA SOB AS FORMAS DE SUSPENSÃO E CÁPSULAS:
ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* (BIOEQUIVALÊNCIA)**

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Tit. ***João Fernandes Magalhães***

Presidente e Orientador

Profª. Dra. ***Maria Palmira Daflon Gremião***

1º. Examinador

Profª. Dra. ***Maria Vitória Lopes Badra Bentley***

2º. Examinador

Prof. Tit. ***Seizi Oga***

3º. Examinador

Prof. Dr. ***Jorge Luiz Seferin Martins***

4º. Examinador

São Paulo, 18 dezembro de 1996

AGRADECIMENTOS

Ao Professor João F. Magalhães pelo incentivo constante, orientação e ajuda nos momentos difíceis.

À Professora Sílvia Storpirtis pela orientação, apoio e amizade.

Aos colegas da Área de Farmacotécnica, Maria Valéria R. V. De-Paola e Humberto Gomes Ferraz pela colaboração na realização deste trabalho.

À Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário (DCMHU) pelo apoio e colaboração.

À EMS Indústria Farmacêutica Ltda pelo financiamento do projeto.

À Ting Hui Ching pela inestimável colaboração nos estudos estatísticos.

Aos Professores e amigos Telma M. Sakuda, Mitsuko T. Ohara e Jorge L. S. Martins pelos incentivos.

Às alunas e ex-alunas Andrea M. Pinheiro, Cristiane Z. Adrião, Letícia F. Kida e Clarislene Ferreira.

Aos técnicos da Área de Farmacotécnica Sr. Jamil Enéas e Dona Regina Célia.

Aos demais colegas das Áreas de Farmacotécnica e Controle de Qualidade.

À minha mãe Elsa e ao meu pai Dante (*in memoriam*) por sempre terem incentivado e apoiado os meus projetos.

Aos meus queridos Fernando e Nelson pela paciência, apoio e, principalmente, por estarem presentes nesta etapa de minha vida.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS.....	8
2.1.1 Definições e conceitos	8
2.1.2 Fatores que influem na biodisponibilidade de medicamentos.....	9
2.1.2.1 <i>Fatores relacionados ao fármaco.....</i>	10
2.1.2.2 <i>Fatores relacionados à forma farmacêutica</i>	12
2.1.2.3 <i>Fatores relacionados à absorção dos medicamentos.....</i>	17
2.2 ESTUDO DA BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS.....	19
2.2.1 Parâmetros farmacocinéticos para determinação da bioequivalência.....	20
2.2.1.1 <i>A partir de dados de concentração sanguínea</i>	20
2.2.1.2 <i>A partir de dados de excreção urinária.....</i>	22
2.2.2 Objetivos dos estudos de bioequivalência	23
2.2.3 Desenho experimental	25
2.2.4 Análise estatística dos resultados	25
2.3 AMPICILINA.....	27
2.3.1 Breve histórico sobre a origem das penicilinas	27
2.3.2 Principais propriedades físico-químicas da ampicilina.....	29
2.3.2.1 <i>Sinonímia.....</i>	29
2.3.2.2 <i>Fórmula e estrutura químicas</i>	29
2.3.2.3 <i>Características espectrofotométricas</i>	29
2.3.2.4 <i>Outras características físico-químicas</i>	30
2.3.3 Aspectos farmacológicos da ampicilina	31
2.3.3.1 <i>Farmacologia.....</i>	31
2.3.3.2 <i>Farmacologia clínica.....</i>	31
2.3.3.3 <i>Toxicologia.....</i>	32
2.3.3.4 <i>Farmacocinética</i>	32
2.3.3.5 <i>Relação estrutura-atividade.....</i>	34
2.3.3.6 <i>Uso terapêutico</i>	35
2.3.4 Estudos de bioequivalência da ampicilina	36
2.3.5 Aspectos analíticos da ampicilina.....	47
3. PROPOSIÇÃO	50
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	52
4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	55

4.1.1 ETAPA A: Avaliação da qualidade farmacêutica <i>in vitro</i>	55
4.1.1.1 Amostras	55
4.1.1.2 Padrão	55
4.1.1.3 Reagentes	55
4.1.1.4 Equipamentos	55
4.1.1.5 Métodos	56
4.1.2 ETAPA B: Validação da metodologia analítica empregada nos ensaios <i>in vivo</i>	59
4.1.2.1 Amostras	59
4.1.2.2 Padrão	59
4.1.2.3 Reagentes	59
4.1.2.4 Equipamentos	59
4.1.2.5 Construção da reta de calibração	59
4.1.2.6 Teste para verificar a presença de interferentes	60
4.1.2.7 Teste de recuperação da ampicilina em urina e da estabilidade das soluções	60
4.1.2.8 Ensaio piloto <i>in vivo</i>	60
4.1.3 ETAPA C: Determinação da bioequivalência dos produtos	61
4.1.3.1 Amostras	61
4.1.3.2 Planejamento estatístico	61
4.1.3.3 Seleção dos voluntários para o estudo de biodisponibilidade: critérios de inclusão e exclusão	62
4.1.3.4 Protocolo do teste de bioequivalência	64
4.1.3.5 Determinação quantitativa da ampicilina nas amostras de urina	64
4.1.4 Etapa D: Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos e avaliação estatística dos resultados	66
4.1.4.1 Métodos empregados	66
5. RESULTADOS	68
5.1. ETAPA A: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FARMACÊUTICA <i>IN VITRO</i>	69
5.2. ETAPA B: VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA EMPREGADA NOS ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	73
5.3 ETAPA C: DETERMINAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA DOS PRODUTOS	79
5.4 CÁLCULO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	92
6. DISCUSSÃO	101
7. CONCLUSÕES	117
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	120
9. RESUMO	132
10. SUMMARY	134

1 INTRODUÇÃO

Até meados da década de sessenta, produtos que continham o mesmo fármaco, na mesma dosagem e apresentados sob forma farmacêutica semelhante eram considerados similares intercambiáveis. Esperava-se, portanto, que esses produtos exibissem o mesmo desempenho quando administrados ao organismo. Entretanto, sabe-se hoje que a eficácia clínica de um medicamento não pode ser atribuída somente à atividade intrínseca de seu princípio ativo. Fatores ligados às propriedades físico-químicas dos fármacos e excipientes empregados na formulação, além das características dos processos de manufatura, são responsáveis pela alteração do efeito dos medicamentos, uma vez que afetam a biodisponibilidade dos mesmos ¹⁰².

Muitos relatos surgiram na literatura relativos a intoxicações e ineficácia clínica, o que motivou estudos promovidos pelo *Food and Drug Administration* (FDA-USA), que resultaram na regulamentação de critérios relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência ¹⁰³.

A popularização dos ensaios de bioequivalência tem se justificado principalmente por dois motivos. O primeiro é que os custos envolvidos nos ensaios de bioequivalência são muito menores que aqueles relativos a uma triagem clínica completa e o segundo são as elevadas exatidão e precisão na determinação do fármaco e de seus metabólitos nos fluidos biológicos como sangue e plasma, o que permite obter um completo perfil de concentração sanguínea mesmo após a administração de uma dose única ⁵⁶.

No Brasil, a publicação do Decreto 793 de 05/04/93, que trata da denominação genérica dos medicamentos, trouxe à tona diversos problemas, entre eles, a intercambiabilidade de medicamentos considerados similares por conterem um certo fármaco nos mesmos teor e apresentação.

Deve-se considerar que dificilmente há duas formulações idênticas. Isto deve ser estendido também para dois lotes distintos de um mesmo produto, ou ainda para dois comprimidos dentro de um mesmo lote. Nesse sentido, o objetivo dos estudos de bioequivalência é demonstrar que os perfis produzidos pelas formulações estudadas diferem, ou não, de forma significativa.

Os antibióticos são muito consumidos no Brasil, entre eles a ampicilina é comercializada por mais de trinta fabricantes sob diversas apresentações: cápsulas, comprimidos, suspensão oral e injetável intramuscular. Considerando-se que cada apresentação possui características próprias relativas à produção, tais como técnica de fabricação, equipamentos e matérias primas empregados, forma farmacêutica, posologia,

pessoal envolvido etc., é de se esperar a ocorrência de diferenças no desempenho terapêutico desses produtos, uma vez que os testes físicos e físico-químicos referentes à identidade, ao teor de princípio ativo etc., não garantem a biodisponibilidade dos mesmos ¹⁰³.

A ampicilina é um antibiótico pertencente ao grupo das penicilinas ácido-resistentes, de uso oral, amplo espectro e elevada potência. Possui baixa toxicidade, mínima incidência de efeitos colaterais e custo relativamente reduzido, características estas que colaboram para que este fármaco seja considerado o antibiótico de escolha no tratamento de um grande número de doenças infecciosas.

Até o momento, não se conhecem estudos sobre a bioequivalência dos produtos do mercado nacional contendo ampicilina. Assim sendo, para que estes produtos possam ser considerados similares intercambiáveis, devem ser equivalentes terapêuticos e, para tanto, uma condição necessária, mas não suficiente, é sua bioequivalência. Dentre as formas farmacêuticas comumente empregadas na terapêutica, as sólidas são aquelas que potencialmente geram problemas relativos à biodisponibilidade.

As propriedades físicas da ampicilina como matéria prima, que podem influir em sua biodisponibilidade incluem área superficial (relacionada com a distribuição do tamanho de partículas), polimorfismo e solvatação. Um outro fator apontado por vários autores está relacionado com o tipo de matéria-prima empregado, havendo evidências de que a biodisponibilidade da forma anidra é maior que da triidratada, uma vez que é mais solúvel ^{2, 51, 119}.

A Farmacopéia Americana apresenta especificações no teste de dissolução para a maioria das monografias de formas sólidas incluídas em sua última revisão ¹¹⁰. Entretanto, mesmo que um produto seja considerado aprovado frente ao teste oficial de dissolução, não há garantia de seu desempenho no organismo. Nesse sentido, a maioria das pesquisas na área estão direcionadas a estudar uma correlação entre os parâmetros de dissolução e absorção.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS

2.1.1 Definições e conceitos

A absorção é um pré-requisito para a atividade terapêutica de fármacos de ação sistêmica quando administrados por via extra-vascular. Muitas vezes considerada sinônimo de absorção ou como propriedade das formas farmacêuticas relacionada à efetividade dos fármacos, a biodisponibilidade tem sido, nos últimos anos, associada às referências de qualidade dos medicamentos. Segundo o FDA ¹¹⁰, o conceito de biodisponibilidade é definido pela quantidade e velocidade de absorção do fármaco, a partir de um produto farmacêutico e que se encontra disponível no sítio de ação ^{33, 88, 106}.

A partir desse conceito, o FDA definiu outros conceitos de uso geral, descritos a seguir:

Equivalentes farmacêuticos: são medicamentos que apresentam mesma forma farmacêutica e via de administração com idêntica quantidade do mesmo princípio ativo. Por exemplo, medicamentos contendo o mesmo sal ou éster de um fármaco, veiculado na mesma forma farmacêutica e dose, podendo diferir nos excipientes, e que cumpram com as especificações farmacopeicas quanto à identidade, potência, qualidade e pureza e, se aplicável, uniformidade de conteúdo e tempo de desintegração e/ou dissolução ^{11, 25, 33, 88, 115}.

Alternativas farmacêuticas: são medicamentos que contêm diferentes sais, ésteres ou complexos de uma idêntica porção ativa do fármaco ou de seu precursor, mas não necessariamente a mesma quantidade ou forma farmacêutica. Essas formas farmacêuticas também devem cumprir com os requisitos farmacopeicos listados anteriormente para os equivalentes farmacêuticos ^{11, 25, 33, 88, 115}.

Medicamentos bioequivalentes: são equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas que comprovadamente tenham a mesma biodisponibilidade, ou seja, que não exibam diferenças significativas entre a quantidade de fármaco absorvida e na velocidade de absorção, quando administrados na mesma dose da porção ativa, sob mesmas condições experimentais ^{25, 33, 88, 115}.

Consequentemente, a bioequivalência implica na comparação de dois ou mais produtos farmacêuticos quanto aos aspectos de quantidade absorvida de fármaco e velocidade de absorção ²⁵.

Na literatura podem ser encontrados inúmeros relatos demonstrando que a biodisponibilidade dos medicamentos pode ser muito variável, podendo levar à ocorrência de efeitos tóxicos ou à redução da ação e até ineficácia terapêutica. Entretanto, nem sempre é possível observar esses efeitos, sobretudo no caso de fármacos em que a curva dose-resposta está relativamente situada em amplos intervalos de efetividade, nos quais apenas pronunciadas variações de disponibilidade poderiam traduzir-se em respostas terapêuticas inadequadas ²⁵.

2.1.2 Fatores que influem na biodisponibilidade de medicamentos

As características próprias do fármaco e de sua liberação, a partir da forma farmacêutica, podem exercer grande influência na quantidade e na velocidade de absorção. Considerando que o fármaco pode ser absorvido somente após solubilização, as formas sólidas são aquelas que, potencialmente, exibem maiores problemas de biodisponibilidade ¹⁵. Na **Figura 1**, a seguir, estão ilustradas as diferentes etapas do processo de liberação do princípio ativo:

Figura 1. Resumo esquematizado dos processos envolvidos na liberação dos fármacos após administração oral de formas farmacêuticas sólidas ⁶⁵.

Como pode ser observado, a etapa de dissolução assume importância fundamental na absorção, uma vez que a grande maioria dos fármacos é absorvida por difusão passiva das moléculas dissolvidas. Uma das principais causas relacionadas à insuficiente absorção é a inadequada liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, que se deve a deficiências na formulação ou nas técnicas de fabricação ²⁵.

2.1.2.1 Fatores relacionados ao fármaco

Solubilidade do fármaco

Para que haja absorção do fármaco, é necessário que suas moléculas se encontrem em solução no local de absorção. A dissolução de formas farmacêuticas sólidas é um pré-requisito para a disposição do fármaco na circulação sistêmica após administração oral e depende, em grande parte, da solubilidade do fármaco no fluido biológico que circunda o local de administração ^{57, 84}. Solutos polares e espécies ionizadas são mais solúveis em água. Embora a ionização diminua a transferência de fármacos através das membranas biológicas, aumenta sua taxa de dissolução nos fluidos gastrintestinais. Enquanto uma grande parte do fármaco se encontra ionizada, a fração não ionizada é rapidamente absorvida, sendo repostada na mesma velocidade de forma que, dificilmente, torna-se uma etapa limitante da absorção. A solubilidade de ácidos e bases fracas é, geralmente, dependente do pH. Portanto, fármacos pouco solúveis absorvidos por difusão passiva exibem menor velocidade de absorção que os mais solúveis ^{15, 63}.

No caso de medicamentos administrados por via tópica (dérmica, vaginal e retal, por exemplo), a solubilidade do fármaco no veículo ou excipiente tem grande influência: em geral, obtém-se o máximo de absorção quando a concentração do fármaco no veículo é igual à sua solubilidade. Concentrações abaixo da saturação diminuem a absorção enquanto que concentrações superiores podem servir de reservatórios para manter uma solução saturada ^{26, 63}.

Tamanho de partícula

A área superficial das partículas do fármaco é um fator que influencia sua dissolução e, portanto, sua absorção. O tamanho da partícula determina a área superficial, ou seja, quanto menores as partículas maior a área superficial e mais rapidamente se dissolvem. O tamanho das partículas não parece ter grande influência em fármacos muito solúveis, entretanto, exerce efeito pronunciado no caso de fármacos com baixa solubilidade ^{12, 51, 63}.

Há muitos exemplos de fármacos pouco solúveis cujo tamanho de partícula pode influenciar significativamente a absorção gastrintestinal, como nos corticosteróides e seus ésteres relativamente insolúveis, sulfonamidas e griseofulvina. Por essa razão, muitas vezes, esses fármacos são processados na forma micronizada ou microcristalina, que além de propiciar maior absorção, podem fornecer menor variabilidade individual, como comprovado para a sulfadiazina administrada sob as formas de suspensão e comprimidos ^{66, 67, 114}. Há casos, entretanto, cuja redução do tamanho de partícula pode levar à diminuição da absorção e, portanto, da biodisponibilidade do fármaco por via oral. O efeito da acidez e dos fluidos

gástricos acarreta, frequentemente, na decomposição do fármaco, o que pode ser acelerado se o fármaco estiver totalmente dissolvido no estômago, como o que ocorre, por exemplo, com a penicilina G e a eritromicina. Nesses casos, a desintegração deve ser preferencialmente retardada e o tamanho de partícula controlado para que quantidades adequadas da porção inalterada possa ser absorvida e alcançar os níveis plasmáticos terapêuticos ⁶⁷.

Segundo PRISTA e col. ⁸⁴, existe um tamanho ótimo de partícula que favorece a dissolução, que deve ser suficientemente pequeno para aumentar de forma significativa a superfície de contato com o solvente, mas que não comprometa a molhabilidade do fármaco com o aparecimento de cargas elétricas no decorrer das operações de subdivisão.

Também deve ser considerado que os processos de subdivisão de partículas e micronização podem modificar a estrutura cristalina do sólido. O estradiol, barbitúricos e trióxidos de alumínio são facilmente convertidos dessa maneira, alterando suas propriedades físico-químicas ⁶⁶.

Forma cristalina

Estima-se que cerca de 1/3 dos compostos orgânicos apresentem duas ou mais formas cristalinas diferentes. Esse fenômeno, denominado de polimorfismo, é responsável por diferenças nas propriedades físico-químicas dos polimorfos como densidade, difração de raios X, ponto de fusão e solubilidade, entre outras. Desta forma, os fármacos no estado sólido podem apresentar diferentes formas cristalinas com características distintas de dissolução, ocasionando alterações na biodisponibilidade. O palmitato de cloranfenicol, por exemplo, é metaestável originalmente, podendo se transformar na forma estável, com perda da atividade. Além disso, o polimorfismo pode acarretar inúmeros problemas de formulação como crescimento de cristais e a perda da estabilidade física em suspensões, modificações do estado cristalino por processos tecnológicos e problemas de estabilidade química. Um fármaco pode não possuir forma cristalina, mas apresentar-se sob forma amorfa, geralmente, de maior solubilidade, o que, portanto, pode levar a diferentes respostas biológicas quando administrado no estado sólido ^{12, 15, 51, 114}.

Outro aspecto importante com relação à forma cristalina é que esta pode apresentar diferentes estados de solvatação. Geralmente, quanto mais hidratado o cristal, menor sua solubilidade e dissolução, constituindo mais um fator que pode ser significativo na absorção de um fármaco ¹⁵.

Estabilidade no trato gastrintestinal

O fármaco não está sujeito apenas às variações de pH no trato gastrintestinal, como também não podem se esquecer os efeitos da ação enzimática. Nesse sentido, é necessário estudar a influência do pH e enzimas e os mecanismos de decomposição dos fármacos e, conseqüentemente, os procedimentos de proteção que podem ser aplicados. ARANCÍBIA ¹² cita como exemplo a produção de ésteres como mecanismo de proteção para a eritromicina, cuja estabilidade em pH ácido pode ser significativamente aumentada com o emprego do propionato de eritromicina laurilsulfato que após contato de 40 minutos em meio gástrico apresenta 97,3% de atividade contra 3,5% correspondente à eritromicina base e 2,0% do estearato, estes últimos, após contato de 5 minutos.

2.1.2.2 Fatores relacionados à forma farmacêutica

As formas farmacêuticas têm grande influência na velocidade de absorção dos fármacos, sendo que, na administração por via oral, as formas líquidas (soluções) são aquelas que apresentam mais rápida e completa absorção. Entretanto, quando se administra uma forma sólida, os processos de desagregação, desintegração e dissolução, tendem a retardar essa absorção. De modo geral, a velocidade de liberação do fármaco, a partir de formas farmacêuticas sólidas, aumenta na seguinte ordem: comprimidos revestidos ou drágeas, comprimidos, cápsulas, pós e suspensões. As suspensões geralmente possuem melhor disponibilidade que os pós pois o sólido se apresenta finamente dividido e uniformemente distribuído na fase líquida, expondo maior área superficial ¹⁵. Por outro lado, os comprimidos são as formas que costumam apresentar mais problemas relacionados à dissolução uma vez que há maior complexidade na adição dos adjuvantes e nos processos envolvidos para sua fabricação ²⁴.

A dificuldade em se conseguir voluntários e a inexistência de modelos animais adequados inviabilizam o estudo de biodisponibilidade como rotina no controle de qualidade de medicamentos. Por esse motivo, procuram-se métodos *in vitro* que sejam equivalentes ou que possam prever o comportamento dos fármacos no organismo. Um desses métodos é o teste de dissolução que pode ser conduzido com a construção da curva de fármaco dissolvido em função do tempo ou quantificando sua fração dissolvida em um tempo fixo. Com o teste de dissolução pode-se, ainda, simular as variações de pH do TGI, com o uso de tampões e metodologia adequada, obtendo um perfil de dissolução mais próximo com aquele que ocorre *in vivo* ²⁹. Na elaboração de um novo produto, o estudo inicial para estimar a biodisponibilidade deve ser realizado *in vivo*, sendo que, paralelamente, deve ser desenvolvido ensaio *in vitro* cujos resultados possam ser correlacionados com aqueles obtidos

no estudo de biodisponibilidade. Qualquer modificação na formulação ou mesmo na matéria-prima, requer nova avaliação *in vivo* ¹⁰⁴.

Dissolução dos fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas e suspensões

Quando um fármaco é administrado por via oral na forma de comprimido, cápsula ou suspensão, a velocidade de absorção é frequentemente controlada pelo tempo de dissolução do fármaco nos fluidos biológicos do sítio de absorção, ou seja, a velocidade de dissolução é frequentemente limitante para o processo de absorção, nesse caso diz-se que a absorção é limitada pela dissolução ^{15, 41}. Se o processo de dissolução é rápido ou se o fármaco é administrado na forma de solução, a absorção depende apenas da sua capacidade em transpor membranas ¹¹. O ensaio de dissolução nas formas farmacêuticas sólidas substituiu, nos compêndios oficiais, o de desintegração, uma vez que era difícil relacionar o tempo de desagregação com a quantidade de fármaco dissolvida. SANCHEZ-MORCILLO e col. ⁹¹, procuraram correlacionar esses dois testes, o que foi conseguido, dentro de níveis aceitáveis de confiança, com apenas cinco das oito amostras de comprimidos de dexametasona por eles estudadas.

Noyes & Whitney observaram que há uma equação geral que descreve o processo de dissolução ^{11, 12, 63, 65, 66, 67, 84}:

$$dC/dt = kS(C_s - C)$$

onde: dC/dt é a velocidade de dissolução, k é uma constante, S é a área superficial do sólido a dissolver, C_s é a solubilidade do fármaco no solvente e C é a concentração do fármaco no solvente no tempo t . A constante k é igual a D/h , onde D é o coeficiente de difusão do fármaco e h a espessura da camada de difusão. A camada de difusão é um fino filme estacionário de solução adjacente à superfície do sólido. Essa camada é saturada de fármaco onde a concentração do mesmo é igual a C_s . O termo $(C_s - C)$ da equação de Noyes-Whitney representa o gradiente de concentração entre a camada de difusão e o solvente de dissolução (ou fluido biológico). Quando a absorção é limitada pela velocidade de dissolução, C é desprezível comparado a C_s e, portanto, a equação anterior pode ser escrita como:

$$dC/dt = DSC_s/h$$

Quando o sólido é introduzido no meio de dissolução, o fármaco rapidamente satura a camada de difusão, as moléculas do fármaco se difundem da camada de difusão para o líquido de dissolução (etapa lenta do processo) e são rapidamente substituídas na camada de difusão por novas moléculas provenientes da superfície do sólido.

A solubilidade (C_s) de muitos fármacos aumenta com o aumento da temperatura, portanto, a dissolução é um processo dependente da temperatura. O coeficiente de difusão é inversamente proporcional à viscosidade, ou seja, a medida que aumenta a viscosidade do meio, a velocidade de dissolução diminui. A agitação do meio pode afetar a espessura da camada de difusão, conseqüentemente quanto maior a agitação, menor a espessura dessa camada e mais rápida será a dissolução. Alterações nas características do solvente, como pH, que afetem a solubilidade do fármaco, alteram a velocidade de dissolução. O mesmo pode ser dito para o uso de diferentes sais do fármaco, ou de outras formas químicas ou físicas do fármaco, com diferentes solubilidades. Aumentando a área superficial (S) do fármaco exposto ao meio de dissolução pela redução do tamanho das partículas ou aumentando a molhabilidade do sólido pelo solvente, geralmente aumentam a dissolução ^{15, 41}. Além da diminuição do tamanho de partículas, outros processos têm sido utilizados visando aumentar a velocidade de dissolução, como o uso de misturas eutéticas e soluções sólidas, formação de coprecipitados e, mais recentemente, a inclusão do fármaco em ciclodextrinas ¹².

Influência do pH na velocidade de dissolução

O pH pode influir sensivelmente na solubilidade e no grau de ionização de fármacos constituídos por ácidos ou bases fracos, portanto, diferenças significativas na dissolução podem ocorrer ao longo do trato gastrointestinal ⁴⁹. A velocidade de dissolução de ácidos fracos aumenta com o aumento do pH, enquanto o oposto ocorre com as bases fracas, portanto, estas últimas tem velocidade máxima de dissolução no suco gástrico e os ácidos fracos, mínima velocidade de dissolução, que aumenta gradativamente, à medida que partículas desse ácido são transportadas através do trato gastrointestinal, para pHs maiores. Esse fato é importante pois, é desejável que as bases fracas tenham rápida velocidade de dissolução em pH ácido, uma vez que a residência no estômago é curta e essa velocidade pode diminuir sensivelmente no intestino delgado, não permitindo que se tenha total absorção do fármaco ^{15, 41}.

Influência dos adjuvantes farmacotécnicos e das técnicas de produção

Os adjuvantes, também denominados excipientes, são substâncias adicionadas às formulações com finalidades diversas como diluentes, desagregantes, aglutinantes, lubrificantes, emulsificantes, agentes suspensores, flavorizantes, veículos, corretivos de pH, etc. Os adjuvantes não apresentam atividade terapêutica e, a princípio, não devem modificar as propriedades farmacológicas do fármaco. Embora sempre tenham sido considerados inertes, sabe-se hoje que podem influir de forma significativa no desempenho terapêutico dos fármacos ^{15, 33}.

Geralmente, os diluentes são substâncias digeríveis e que não deveriam retardar a liberação dos fármacos. Mas alguns diluentes insolúveis empregados não se enquadram nessa descrição. Há relatos que hidróxido de alumínio, trissilicato de magnésio e óxido de magnésio diminuem a biodisponibilidade das tetraciclinas e inibem a velocidade de cessão e absorção da prednisona e hidroclorotiazida ^{24, 33, 36}. Os adjuvantes podem interagir com o fármaco, formando complexos cuja absorção através das membranas é reduzida, como por exemplo os cátions Ca^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} , que originam complexos com a tetraciclina de difícil absorção. Da mesma forma, sulfato de cálcio e fosfato dicálcico, usados como diluentes em comprimidos e cápsulas, quando associados às tetraciclinas, reduzem sensivelmente sua absorção, provavelmente pela formação do complexo tetraciclina-cálcio. Há casos, entretanto, cuja complexação do fármaco pode facilitar a absorção, mediante a neutralização de cargas, como ferro-EDTA que tem maior lipossolubilidade que o ferro, e, portanto, maior absorção ¹⁵.

Os lubrificantes como estearato de magnésio, talco, estearato de alumínio e ácido esteárico, são agentes hidrofóbicos e, conseqüentemente, diminuem a velocidade de dissolução porque dificultam a umectação. Os lubrificantes graxos de baixa viscosidade, exercem efeito retardador de dissolução mais acentuado e isso ocorre porque durante a compressão há elevação da temperatura ultrapassando seu ponto de fusão, distribuindo-se sobre as partículas formando uma película contínua. Ao contrário, a deposição de lubrificantes graxos de alta viscosidade forma uma película porosa, o que permite a infiltração de líquido para dissolução. Por outro lado, os lubrificantes solúveis, como laurilsulfato de sódio e oleato de sódio, parecem não afetar a dissolução ^{24, 36}.

Os aglutinantes são empregados para fornecer resistência mecânica aos comprimidos e diminuir o volume dos pós. Sua adição leva ao aumento do tempo de desagregação e, conseqüentemente, maior tempo para a dissolução. Amido e goma arábica conduzem a produtos com velocidades de dissolução maiores que aqueles obtidos com etilcelulose, tanto por via úmida como por via seca. A gelatina exerce efeito retardador mais acentuado enquanto que PVP parece não influir na liberação do fármaco. Em contrapartida, dos agentes desagregantes, espera-se que aumentem a velocidade de liberação do fármaco, como de fato ocorre com amido e resinas catiônicas. Entretanto, derivados da celulose, mesmo a celulose microcristalina, melhoram a desintegração mas podem retardar a dissolução, pois tendem a aumentar a viscosidade, diminuindo a difusão das moléculas do fármaco ^{24, 34, 36}.

A presença de tensoativos (os polissorbatos e laurilsulfato de sódio, por exemplo) na formulação tanto pode aumentar como diminuir a absorção do fármaco, o que é explicado por três mecanismos: aumento da dissolução do fármaco, aumento da permeabilidade das membranas biológicas e redução da porção livre do fármaco disponível para absorção pela

sua incorporação em micelas. Além disso, os tensoativos podem modificar o coeficiente de difusão do fármaco, alterando a tensão superficial da superfície da membrana ¹⁵.

As técnicas de produção dos medicamentos também têm grande participação na disponibilidade dos fármacos. Por exemplo, na elaboração de comprimidos, pode haver sensíveis diferenças relacionadas à sua preparação, aos processos de incorporação dos adjuvantes, à força de compressão empregada e, ainda, às condições e tempo de armazenamento ³³.

A resistência mecânica dos comprimidos está diretamente relacionada à velocidade de liberação do fármaco e é determinada pelo processo de obtenção empregado que pode ser por compressão direta, granulação úmida ou granulação seca. A velocidade de dissolução depende principalmente do aglutinante, na granulação úmida, e da força de compressão na compressão direta. Diferenças na porosidade do granulado também influem na liberação do fármaco e dependem do tipo de granulador empregado. Adicionalmente, o tamanho de partícula do fármaco pode sofrer modificações, por aglomeração ou ruptura durante os processos de granulação ou compressão ^{24, 36}.

A força de compressão determina a porosidade do comprimido, que por sua vez, é reponsável pela penetração de líquido para desagregação e dissolução. Força de compressão baixa leva à ruptura de cristais, seguida de aglomeração, o que diminui a velocidade de dissolução. Entretanto, com o aumento da força de compressão, a ruptura desses cristais gera maior superfície e, portanto, maior a dissolução. Com forças de compressão muito elevadas, há fusão, novamente, dessas partículas e, conseqüentemente, queda na velocidade de dissolução ^{24, 36}.

No caso de cápsulas gelatinosas, a dissolução do fármaco depende, inicialmente, da dissolução da própria cápsula, da penetração de líquido na mistura de pós e da desagregação desses pós. A liberação do fármaco, assim como nos comprimidos, está sujeita ao efeito dos excipientes ²⁴.

O tempo e as condições de armazenamento tendem a modificar as características das formas sólidas, aumentando a umidade, o que acarreta em aumento da dureza e da velocidade de dissolução. Quanto maior a umidade inicial, maior o endurecimento com o envelhecimento da preparação. O uso de goma arábica como aglutinante diminui a velocidade de dissolução com o tempo, o que parece não ocorrer quando se emprega PVP ^{24, 36}. GORDON e col. ⁴⁴ demonstraram que o tempo, a temperatura e a umidade podem influenciar a ação de substâncias como crospovidona, croscarmellose sódica e amido glicolato de sódio, empregados como "super-desintegrantes" para melhorar as características de desintegração e dissolução de fármacos em comprimidos por granulação a seco. Nesse sentido, a embalagem

e o acondicionamento adequados são fatores importantíssimos na manutenção da estabilidade e das características de dissolução das formas farmacêuticas ⁷⁷.

2.1.2.3 Fatores relacionados à absorção dos medicamentos

Para um medicamento de administração extravascular, a absorção é definida como a quantidade de fármaco inalterado que atinge a circulação sanguínea. Portanto, a porção metabolizada ou quimicamente transformada no sítio de aplicação ou em trânsito, não pode ser considerada como absorvida. Faz-se distinção entre as definições de absorção e biodisponibilidade, uma vez que esta última refere-se não só à quantidade absorvida como também à velocidade de absorção. De forma mais geral, o termo biodisponibilidade pode ser empregado para indicar a disponibilidade de fármaco (ou parte ativa do mesmo) no tecido ou órgão alvo, a partir do local de administração enquanto absorção refere-se ao total de fármaco transportado pelo organismo. Na absorção gastrointestinal também deve ser considerado o efeito da presença de enzimas do próprio trato gastrointestinal (TGI) e da flora intestinal, que podem modificar ou inativar os fármacos. A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas administradas pelas vias oral, dérmica, vaginal, retal e parenteral extravascular, em geral, ocorre por difusão passiva através das membranas biológicas que formam barreiras lipídicas ⁶³.

Velocidade de esvaziamento gástrico

Fármacos de caráter básico que são preferencialmente absorvidos no intestino delgado são absorvidos de forma retardada se houver esvaziamento gástrico lento. Por outro lado, os ácidos fracos, na retenção estomacal, apresentam condições favorecidas, já que permanecem mais tempo no local de absorção. A velocidade de esvaziamento gástrico pode variar em função de vários aspectos: nas mulheres e idosos é menor, na posição supina o tempo de residência no estômago é menor, presença de alimentos, doenças como diabetes e outras ^{12, 25, 33, 63}.

Influência da dieta

Os alimentos sólidos tendem a reduzir a velocidade de esvaziamento gástrico, afetando a absorção de medicamentos cuja absorção se dá no intestino. A presença de alimentos no TGI, pode diminuir significativamente a quantidade de líquido para dissolução do fármaco, exercendo efeito negativo na absorção do mesmo. Além disso, pode haver interação entre fármacos e alimentos, com a produção de compostos insolúveis ou complexos macromoleculares de difícil absorção. Os alimentos podem, ainda, influir aumentando as secreções do TGI, como a bilis, por exemplo, que devido a sua natureza tensoativa e solubilizante, pode acelerar a dissolução e absorção de compostos pouco solúveis ^{25, 33}.

Efeito de primeira passagem

Outro aspecto importante a ser considerado na absorção está relacionado com o efeito de primeira passagem que ocorre com a metabolização dos fármacos a nível de parede intestinal e do sistema hepatoportal, resultando na diminuição da fração intacta do composto que atinge a circulação. A influência desse efeito pode ocasionar a diminuição ou até anulação da ação terapêutica ²⁵.

2.2 ESTUDO DA BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS

A introdução de medicamentos genéricos, com a expiração das patentes dos laboratórios inovadores, trouxe à tona preocupações sobre a biodisponibilidade desses produtos uma vez que o desempenho *in vivo* das novas formulações era totalmente desconhecido^{53, 96}.

Muitos trabalhos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a biodisponibilidade ou bioequivalência de produtos genéricos, de novas formulações de medicamentos já existentes no mercado e, ainda, de preparações de liberação controlada^{13, 14, 16, 23, 30, 39, 42, 43, 45, 69, 79}.

Os principais fatores que desencadearam a realização dos inúmeros estudos de bioequivalência foram os elevados custos envolvidos na triagem clínica completa de novos medicamentos juntamente com o desenvolvimento de tecnologia bioanalítica, especialmente a cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, radioimunoensaio, enzima-imunoensaio, fluorescência imunoensaio, radioreceptor ensaio e outras, que melhoraram substancialmente a especificidade, a sensibilidade e a precisão na determinação de fármacos juntamente com seus produtos de biotransformação presentes em pequenas quantidades nos fluidos biológicos^{53, 56, 83}.

Nos Estados Unidos, para obtenção do registro junto ao FDA, órgão federal de controle de medicamentos e alimentos, o medicamento genérico deve ser um equivalente farmacêutico do medicamento original. O Code of Federal Regulations²⁸ estabelece quais produtos e como devem ser avaliados com relação à biodisponibilidade e bioequivalência¹¹². Uma publicação do FDA intitulada *Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations* vem sendo editada desde 1980, tendo em vista a seleção no uso de medicamentos genéricos. Esse compêndio, chamado de *Orange Book*, embora não sendo oficial, contém informações de domínio público que determinam quais produtos são terapeuticamente equivalentes. Também estão incluídos todos os produtos aprovados pelo FDA em eficácia e segurança e, no caso de medicamentos de vários laboratórios, aqueles bioequivalentes⁶².

No Brasil, Argentina e outros países que, até recentemente, não reconheciam a Lei de Patentes, podem ser considerados medicamentos genéricos, não apenas os que apresentam denominação genérica mas também aqueles comercializados sob uma marca registrada de fabricante nacional ou diferente do inovador. No Brasil, medicamentos similares a outros já registrados de acordo com especificações gerais regulamentadas, tem direito a registro

sanitário ¹¹². A publicação do Decreto 793 de abril de 1993, sobre a denominação genérica de medicamentos, resultou na constatação da necessidade de desenvolver estudos de bioequivalência dos produtos fabricados no mercado nacional para que possam ser intercambiados terapeuticamente ¹⁰³. Mesmo antes da publicação do Decreto vários estudos nesse sentido já estavam sendo conduzidos por pesquisadores nacionais ^{72, 78, 92}.

A determinação da biodisponibilidade e bioequivalência implica na avaliação da quantidade e da velocidade de absorção de um fármaco a partir de sua forma de administração, e para tanto, são determinados os parâmetros farmacocinéticos que melhor se correlacionam com os efeitos terapêuticos no organismo ^{12, 101}.

Os estudos farmacocinéticos em voluntários humanos fazem parte do projeto de desenvolvimento de um produto farmacêutico, situando-se na interface entre os estudos pré-clínicos em animais e a população de pacientes-alvo. A farmacocinética deve ser considerada como a comprovação inicial da eficácia e segurança, fornecendo as primeiras informações clínicas do novo medicamento e facilitando a comparação da farmacocinética humana com a farmacocinética clínica e toxicocinética, além de quantificar a proporcionalidade da dose ^{55, 107}.

2.2.1 Parâmetros farmacocinéticos para determinação da bioequivalência

Como já mencionado, os parâmetros farmacocinéticos determinados nos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos relacionam-se com a quantidade de fármaco absorvida e à velocidade do processo de absorção ^{17, 103}. Esses parâmetros podem ser obtidos a partir dos resultados da quantificação do fármaco nos fluidos biológicos, como sangue e urina, após administração extravascular ⁸⁸.

2.2.1.1 A partir de dados de concentração sanguínea ^{25, 33, 83}

Em geral, há três parâmetros de fundamental importância e que são os mais frequentemente estudados: a concentração máxima obtida ($C_{máx.}$), o tempo no qual essa concentração é alcançada ($t_{máx.}$) e a área sob a curva da concentração plasmática ou sanguínea *versus* tempo (AUC).

A $C_{máx.}$ representa a maior concentração do fármaco no sangue após a administração extravascular e é diretamente proporcional à fração absorvida do fármaco. Farmacocineticamente a $C_{máx.}$ pode ser descrita pela seguinte equação ^{25, 33}.

$$C_{m\acute{a}x} = \frac{FD}{Vd} \cdot e^{-K \cdot t_{m\acute{a}x}}$$

em que F é a fração da dose D absorvida; Vd é o volume de distribuição aparente do fármaco no organismo e K a constante da velocidade de eliminação. Portanto, $C_{m\acute{a}x}$ representa a quantidade de fármaco absorvida.

O tempo máximo ($t_{m\acute{a}x}$) está diretamente relacionado à velocidade de absorção e pode ser expresso matematicamente pela equação a seguir:

$$t_{m\acute{a}x} = \frac{\ln ka / K}{ka - K}$$

em que ka é a constante da velocidade de absorção.

A área sob a curva (AUC) é o parâmetro mais importante na determinação da biodisponibilidade pois constitui a fração do fármaco absorvida após administração de dose única do medicamento. Pode ser representada, matematicamente, como segue:

$$AUC = \frac{FD}{K \cdot Vd}$$

Como pode ser observado, AUC é diretamente proporcional à dose absorvida, representando a quantidade de fármaco realmente disponível para ser distribuída. O denominador $K \cdot Vd$ expressa o Clearance total do fármaco no organismo, ou seja, a velocidade de eliminação do fármaco a partir do volume de distribuição. Indivíduos que apresentam variações quanto ao volume de distribuição, devem ser eliminados dos estudos de bioequivalência pois podem levar a erros no cálculo de AUC ³³. Supondo que a depuração total entre os voluntários é constante, AUC constitui um excelente parâmetro para obter as quantidades relativas absorvidas. Se adotada a AUC de uma injeção intravenosa como referência, já que possui, por definição biodisponibilidade igual a 100%, pode se calcular a biodisponibilidade absoluta (F_{abs}) ^{33, 83, 93, 103, 115}:

$$F_{abs} = \frac{AUC_{ev} \cdot D_{iv}}{AUC_{iv} \cdot D_{ev}}$$

Onde ev e iv representam parâmetros da administração extra e intravascular, respectivamente.

A determinação da bioequivalência (%F) ou seja, da biodisponibilidade relativa entre dois produtos (a e b) resulta da comparação de suas AUCs ^{12, 25, 88}:

$$\%F = \frac{AUC_a}{AUC_b} \cdot 100$$

2.2.1.2 A partir de dados de excreção urinária

Esse método pode ser aplicado para fármacos excretados predominantemente pela via renal na forma não biotransformada. Nesse caso, os parâmetros mais importantes são a quantidade total acumulada do fármaco excretada na urina e a velocidade com que essa excreção ocorre ^{25, 33, 100, 103}. Segundo RITSCHER ⁸⁸, esses parâmetros representam a quantidade total de fármaco eliminada na forma inalterada na urina em tempo infinito (Ae^∞), altura do pico resultante da curva obtida plotando o logaritmo das velocidades médias de excreção *versus* tempo médio (Ct_p) e o tempo necessário para atingir esse pico (t_p).

A escolha desses parâmetros pode ser explicada uma vez que a eliminação do fármaco inalterado é um processo cinético de primeira ordem cuja velocidade de aparecimento na urina é proporcional à sua quantidade no organismo. A equação a seguir, define a velocidade de excreção do fármaco ^{93, 100}:

$$\log \frac{dA}{dt} = \log ku \cdot D - \frac{K \cdot t}{2,303}$$

Nesta equação, A é a quantidade de fármaco eliminado inalterado na urina, D é a dose administrada, t é o tempo, K e ku são constantes de velocidade de eliminação total e renal, respectivamente. Considerando que as velocidades de excreção urinária determinadas experimentalmente, na realidade, não são instantâneas, mas sim velocidades médias em determinado período de tempo ($\Delta A / \Delta t$), então, a velocidade média de excreção se aproxima muito à velocidade instantânea no ponto médio de coleta da urina (t_m). Quando plotados os resultados de $\log(\Delta A / \Delta t)$ *versus* t_m , obtém-se o gráfico da **Figura 2**: Com a extrapolação da reta obtida, é possível calcular ku, já que a intersecção com o eixo fornece o $\log ku \cdot D$ ¹⁰⁰. Observando-se a equação que originou o gráfico, têm-se que o coeficiente angular da reta é igual a $-K/2,303$ ^{25, 90}.

Figura 2. Curva de excreção urinária do logaritmo das velocidades médias em determinado período de tempo $\log(\Delta A/\Delta t)$ versus o tempo médio (t_m)¹⁰⁰.

A partir do gráfico de $\log(\Delta A/\Delta t)$ versus t_m , STORPIRTIS¹⁰⁰ calculou k_u , K e k_m (constante da velocidade de metabolização) da antipirina no estudo farmacocinético desse fármaco em pacientes portadores de hepatopatias.

2.2.2 Objetivos dos estudos de bioequivalência

Os ensaios de bioequivalência se justificam para apenas dois tipos de produtos: modificações de uma formulação já existente no mercado ou versões genéricas de um produto inovador. Desta forma, o único objetivo desse tipo de estudo é obter evidência de que não há diferença significativa entre a formulação em teste e a de referência. Em geral, os resultados são empregados por um órgão oficial que estabelece os padrões de proximidade entre os perfis. Cada padrão estabelecido é constituído de um ou mais critérios de aceitação para cada medida de biodisponibilidade considerada necessária na avaliação^{12, 56, 112}.

De forma geral, esse conceito estatístico pode ser resumido em uma probabilidade geral (Pr), com certo grau de segurança, em função de parâmetros comparados entre o produto teste e referência, compreendidos dentro de limites previamente estabelecidos^{28, 56, 110}:

$$Pr = \{ \Delta_1 \leq f(\theta, \theta_r) \leq \Delta_2 \} \leq 1 - P$$

Em que,

Δ_1 e Δ_2 = intervalo de bioequivalência (limites estabelecidos)

$1-P$ = probabilidade de segurança

θ_t e θ_r = parâmetros do produto teste e referência

Portanto, um padrão bem definido para um produto específico deve estabelecer claramente:

1. *Qual(is) medida(s) de bioequivalência e quais parâmetros de distribuição devem satisfazer o critério.* As medidas de biodisponibilidade de importância na determinação de um padrão são dependentes do fármaco ou formulação e do tipo de estudo. As medidas mais frequentemente usadas que descrevem o perfil da concentração por tempo são área sob a curva (*AUC*), *C_{máx.}* e *T_{máx.}*. A importância relativa de cada medida depende do tipo de estudo. Há quatro tipos de estudo mais comuns: dose única em jejum e sob determinado regime alimentar, dose múltipla em jejum e sob determinado regime alimentar ^{56, 110}.

2. *A amplitude do intervalo de bioequivalência para cada parâmetro.* A amplitude do intervalo de bioequivalência é a principal via para determinação da significância clínica. Para a razão da tendência central, Δ_I é geralmente adotado como 80%, ou para uma diferença, 20% da referência. A origem dessa especificação de 20% não está bem esclarecida, mas parece estar relacionada com outros limites da Farmacopéia Americana, como aqueles de potência. A largura desse intervalo é provavelmente baseada em medidas como *AUC* e *C_{máx.}*, e, tem-se reconhecido que intervalos menores (90 a 111%, por exemplo) são mais apropriados para fármacos que tem estreito índice terapêutico ou que apresentam efeitos tóxicos muito intensos. Por outro lado, os fármacos com grande variabilidade dia-a-dia para um mesmo indivíduo ou ainda, parâmetros muito variáveis, deveriam ter limites maiores ^{56, 110}.

3. *A função dos parâmetros estimados que é significativa.* Deve-se escolher quais os melhores parâmetros de distribuição estatística para comparação dos perfis dos produtos teste e referência. O parâmetro de distribuição estatística mais comumente empregado é a medida da tendência central, avaliada pela comparação das médias, geralmente pela diferença das médias. Entretanto, podem também ser usadas a razão das médias geométricas ou a mediana ^{56, 110}.

4. *O nível probabilístico de segurança.* A segurança de que um determinado parâmetro do produto teste corresponde à referência é medido por *1-P*. Esta é a probabilidade de que a verdadeira diferença (ou razão) caia dentro da zona de segurança, definida pelo intervalo de bioequivalência. Quanto menor *P*, maior é a segurança. *P* pode ser definido como o risco ou probabilidade de aceitar um determinado parâmetro da formulação teste como aceitável, conforme o critério, quando na realidade não o é. Geralmente *P* é fixado como 0,05 para a maioria dos parâmetros (nível $\alpha=5\%$) ^{56, 110}.

2.2.3 Desenho experimental

A maior dificuldade dos ensaios de bioequivalência reside no emprego de seres humanos uma vez que existe grande variabilidade entre os indivíduos. Desta forma, a escolha do grupo de indivíduos participantes dos estudos de bioequivalência deve ser fundamentada em parâmetros capazes de manter homogêneas as características do grupo. Devem ser considerados a idade, a relação peso-altura, hábitos de vida, estado de saúde, devendo ser excluídos aqueles que apresentarem alergias a fármacos, tratamentos em andamento, dependência a drogas como álcool, tabagismo e outras. Nos ensaios, todos os indivíduos devem ser submetidos às mesmas condições, ou seja, mesmo período de jejum, dieta semelhante, mesma quantidade de líquido ingerido etc ²⁵.

O planejamento adequado do experimento deve ter como objetivo minimizar a variabilidade que pode advir de várias fontes: *a.* variabilidade inter-indivíduo; *b.* variabilidade intra-indivíduo, ocasionada por variações das características de absorção de um mesmo voluntário em períodos distintos do mesmo estudo; *c.* efeito dos períodos que pode ser causado por ação residual de tratamentos precedentes; *d.* erro experimental e *e.* variabilidade devida a tratamentos diferentes, como administração de produtos ou dosagens diferentes ^{25, 56}.

Para diminuir essa variabilidade biológica, frequentemente são empregados ensaios cruzados, onde cada indivíduo é submetido a todos os tratamentos em diferentes períodos. Dessa forma, cada pessoa funciona como seu próprio controle, fornecendo mais precisão nas determinações uma vez que diminui a variação intraindivíduo. Nesses ensaios cruzados, a distribuição dos tratamentos é aleatória e, para evitar acúmulo de tratamentos para um mesmo voluntário, emprega-se, preferivelmente, o *quadrado latino*, que permite controlar a heterogeneidade entre tratamentos e períodos. A principal desvantagem desse procedimento é que o número de períodos deve ser igual ao número de tratamentos e ao número de voluntários. Se o número de voluntários for maior que o de tratamentos, deve ser um múltiplo desse número. Quando o número de tratamentos é ímpar, em geral, empregam-se dois quadrados latinos ^{25, 33, 74, 119}.

2.2.4 Análise estatística dos resultados

Segundo o critério preconizado na última revisão da Farmacopéia Americana ¹¹⁰, a média dos valores dos parâmetros farmacocinéticos estudados do produto-teste deve estar dentro dos limites de 80 a 120% do produto referência empregando intervalo de confiança de 90%, nível de significância $P=0,05$. A análise estatística deve compreender método

paramétrico e a análise de variância (ANOVA) deve estudar a influência da sequência (grupo ou ordem) de administração, indivíduos, períodos ou fases e o tratamento (produtos) ⁵⁶.

A ANOVA é empregada nos estudos cruzados pois permite identificar as fontes de variação e estimar a variância de todos os dados obtidos. Esse método consiste em diferenciar, dentro da soma dos quadrados devida à variação total de uma série de observações, a soma dos quadrados correspondentes às variâncias independentes incluídas no experimento e a soma dos quadrados do erro experimental. As variâncias são comparadas pelo teste F , que é igual à variância das médias divididas pela variância do erro experimental ou residual. Este último inclui causas aleatórias ²⁵.

Para aplicação da análise de variância (ANOVA) é necessário que se cumpram os seguintes aspectos ^{74, 82, 110}:

1. A administração dos produtos aos voluntários deve ser aleatória, ou seja, a sequência de administração dos produtos deve se realizar ao acaso.
2. As variâncias devem ser homogêneas, isto é as variâncias associadas aos dois tratamentos e das sequências devem ser iguais.
3. Linearidade do modelo estatístico: os efeitos do modelo estatístico como indivíduos, sequência, período e tratamento, devem ser aditivos e independentes.
4. Independência e distribuição normal dos resíduos.

No caso do não cumprimento de alguma dessas premissas, deve-se aplicar método estatístico não paramétrico ^{74, 82}.

2.3 AMPICILINA

2.3.1 Breve histórico sobre a origem das penicilinas

Em 1929, Fleming designou por *penicilina*, um caldo filtrado da cultura de uma espécie de *Penicillium* que apresentava propriedades inibidoras sobre culturas de estafilococos. Mesmo uma década depois, ainda havia pouca informação sobre sua natureza química. Apenas em 1940, CHAIN e colaboradores isolaram a penicilina na forma sólida, mas ainda impura, e anunciaram sua efetividade *in vivo* contra vários microrganismos patogênicos ³⁸.

No mesmo ano, ABRAHAM E CHAIN descreveram a ação da penicilinase, enzima produzida por bactérias, que inativava a penicilina e reduzia, rapidamente, seu espectro de ação contra Gram positivos para apenas dois microrganismos: *Streptococcus pyogenes* e *Treponema pallidum* ^{38, 54, 118}.

No ano de 1943, MAC PHILLAMY, WINTERSTEINER e ALICINO do grupo SQUIBB, conseguiram cristalizar o sal sódico da benzilpenicilina. Este importante fato facilitou o estudo químico do composto puro. Análises cristalográficas realizadas através dos raios X empregadas na elucidação dos produtos de degradação da penicilina e projeções da densidade eletrônica de seus sais, conduziram à identificação da fórmula β -lactâmica em 1945 ¹¹⁸.

Na década de 40, foram realizadas várias tentativas para sintetizar novas penicilinas visando melhorar o uso clínico dessa categoria de antibióticos: SHEEHAN e colaboradores obtiveram a síntese do núcleo β -lactâmico que possibilitou a obtenção da 5-fenilpenicilina e do análogo sulfonil da benzilpenicilina. Esses pesquisadores também foram bem sucedidos na síntese total da penicilina V ⁵⁴.

Em 1958, BATCHELOR e colaboradores, isolaram um novo composto, o ácido 6-aminopenicilânico, a partir da fermentação da penicilina G. Descobriu-se também que as penicilinas G e V podiam ser hidrolisadas em ácido 6-aminopenicilânico por amidases com bom rendimento. Com a disponibilidade do ácido 6-aminopenicilânico e o desenvolvimento das técnicas de síntese, foi possível preparar inúmeras outras penicilinas, mantendo a estrutura do núcleo e variando os grupamentos da cadeia lateral, o que não era possível, inicialmente, apenas por fermentação ^{54, 95, 118}. Os compostos de maior importância clínica estão relacionados no **Quadro 1**, a seguir:

Quadro 1. Principais penicilinas empregadas clinicamente ^{54, 95}. Nome, estrutura química, propriedades e atividade biológica. **Estrutura básica:**

Nome genérico	Nome químico	Estrutura química, R =	Propriedades
Ampicilina	D-α(-)-Aminobenzilpenicilina		amplo espectro, ácido-resistente, bem absorvida, β-lactamase sensível
Penicilina G	Benzilpenicilina		ação contra G(+), ácido-sensível, β-lactamase sensível
Penicilina V	Fenoximetilpenicilina		ação contra G(+), ácido-resistente, bem absorvida, β-lactamase sensível
Feneticilina	Fenoxietilpenicilina		ação contra G(+), ácido-resistente, bem absorvida, β-lactamase sensível
Fenbenicilina	Fenoxibenzilpenicilina		ação contra G(+), ácido-resistente, bem absorvida, β-lactamase sensível
Meticilina	2,6-Dimetoxifenilpenicilina		ação contra G(+), ácido-sensível, resistente a alguns tipos de β-lactamases
Oxacilina	3-Fenil-5-metil-4-isoxazolilpenicilina		ação contra G(+), ácido-resistentes,
Cloxacilina	3-o-Clorofenil-5-metil-4-isoxazolilpenicilina		resistentes à maioria de β-lactamases, absorção oral, intensa ligação
Dicloxacilina	3-o-Clorofenil-5-metil-4-isoxazolilpenicilina		às proteínas plasmáticas
Carbenicilina	α-Carboxibenzilpenicilina		amplo espectro, ação contra <i>P. aeruginosa</i> , ácido-sensível, inativa por via oral

A ampicilina, descrita pela primeira vez em 1961 por Rolison e Stevens, foi o primeiro antibiótico β -lactâmico com atividade contra *Enterobacteriaceae* e *Haemophilus influenza* 31, 38, 58.

2.3.2 Principais propriedades físico-químicas da ampicilina

2.3.2.1 Sinonímia 20, 27, 31, 37, 71, 73

ampicillinum

D[-]- α -aminobenzilpenicilina

ácido (6R)-6-(α -D-fenilglicilamino) penicilânico

ácido D-(2-amino-2-fenilacetamido)-3,3-dimetil-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico

2.3.2.2 Fórmula e estrutura química 12, 27, 31, 37, 71, 73

C₁₆ H₁₉ N₃ O₄ S

2.3.2.3 Características espectrofotométricas

2.3.2.3.1 Absorção ultravioleta 27, 37

Em solução aquosa ácida exibe três picos: 257 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 9,2$), 262 nm e 268 nm. Em solução tampão fosfato de:

- pH 5,3: 257 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 8,69$), 262 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 7,81$), 268 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 5,61$);

- pH 7,0: 257 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 7,94$), 262 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 6,69$), 268 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 5,61$);

- pH 9,5: 257 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 7,28$), 262 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 5,03$).

Com o aumento do pH, a absorbância diminui, não sendo observado pico a 268 nm em pH 9,5. Soluções metanólicas saturadas de ampicilina triidratada apresentam absorção máxima nos comprimentos de onda de 258, 262 e 268 nm.

2.3.2.3.2 Espectro infravermelho ^{27, 37}

Empregando pastilha de KBr, os principais picos podem ser observados nos comprimentos de onda de 1775, 1693, 1526, 1308, 1497 e 1583.

2.3.2.4 Outras características físico-químicas ^{27, 31, 37, 54, 71, 73}

Peso molecular (anidra, triidratada e sódica)	349,4; 403,5 e 371,4
pKa a 25°: -COOH, -NH ₂ (sódica e triidratada)	2,66; 7,24 e 2,5; 7,3
Solubilidade em água (anidra, triidratada, e sódica)	1 em 170; 1 em 150 e 1 em 2
Solubilidade em álcool (anidra e triidratada)	< 1 em 10.000
Solubilidade em solventes orgânicos	muito pouco solúvel

A ampicilina se apresenta na forma de pó cristalino, branco de odor característico e sabor amargo. É obtida por fermentação, preparada a partir do ácido 6-aminopenicilânico. Apenas a forma D(-) é usada clinicamente e, para administração oral, podem ser empregadas as formas anidra ou triidratada. O sal sódico (C₁₆ H₁₈ N₃ Na O₄ S), de peso molecular 371,4 é higroscópico e solúvel em duas partes de água e presta-se à preparação de formas farmacêuticas de administração intravascular. A ampicilina pode, ainda, ser administrada por via oral na forma de ésteres inativos (pró-fármacos), pivampicilina (I) e talampicilina (II) que, após hidrólise por esterases inespecíficas presentes no trato gastrointestinal, originam a ampicilina livre que é rapidamente absorvida ^{20, 27, 31, 37, 52, 71}.

Outros ésteres, também introduzidos na terapêutica na tentativa de melhorar a absorção e/ou a biodisponibilidade, e que atuam como pró-fármacos, liberando a ampicilina *in vivo*, por hidrólise, são a bacampicilina, o éster etoxi-carboniloxi-etílico da ampicilina; a hetacilina e a sarpicilina ^{59, 60, 98}.

2.3.3 Aspectos farmacológicos da ampicilina

2.3.3.1 Farmacologia

As penicilinas correspondem a uma classe de antibióticos constituídos de um núcleo principal formado por um anel tiazolidínico conectado a outro anel β -lactâmico, no qual está ligada uma cadeia lateral. Essa cadeia é responsável pela maioria das propriedades farmacológicas e antibacterianas das penicilinas. A ampicilina pertence à classe das penicilinas ácido-resistentes e, portanto, ativo por via oral. Nesse antibiótico, o anel benzílico da cadeia lateral amplia o espectro de ação contra bactérias Gram positivas. O amino grupo da cadeia lateral, possibilita a entrada do antibiótico pela membrana das bactérias Gram negativas. Sua ação antibacteriana, bem como das penicilinas em geral, é resultante da inibição da enzima transpeptidase, envolvida na última etapa da síntese da estrutura da parede heteropolimérica da bactéria. Essa parede constitui-se de peptidoglicam, que graças às ligações cruzadas entre resíduos terminais de glicina e de D-alanina, apresenta rigidez física e estabilidade mecânica. A inibição da formação dessas pontes cruzadas resulta na formação de uma parede frágil acarretando no seu rompimento, o que inviabiliza a célula ^{9, 31, 71}.

2.3.3.2 Farmacologia clínica

A ampicilina tem ação bactericida contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. A grande desvantagem do uso deste antibiótico está relacionada a sua sensibilidade às β -lactamases (penicilinasas) produzidas por microrganismos como alguns *Staphylococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Aerobacter*. A ampicilina é rapidamente hidrolizada pela β -lactamase, tornando-se inativa contra a maioria das infecções estafilocócicas. Apresenta eficácia contra a maioria das cepas de meningococos, pneumococos e gonococos, como

Branhamella catarrhalis, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, algumas enterobactérias como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* e *Shigella* spp. É também eficaz contra muitos anaeróbios e *Actinomyces* spp.^{31, 71, 86}.

Inicialmente foi empregada com êxito no tratamento de infecções causadas por *Haemophilus influenzae*, entretanto, particularmente em crianças, de 10 a 20% dos microrganismos isolados atualmente são resistentes ao antibiótico. Similarmente, vem aumentando a porcentagem de cepas de *Salmonella* spp., *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Shigella* spp. insensíveis à ampicilina. Cerca de 50% das cepas de *E. coli* isoladas e a maioria das de *Shigella* e *Enterobacter* são, hoje, resistentes. A ampicilina não apresenta atividade contra *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Permanecem, ainda, sensíveis a baixas concentrações do antibiótico, *Streptococcus viridans* e *Listeria monocytogenes*. Além da ação antibacteriana da ampicilina, não há outras atividades farmacológicas^{31, 71}.

Há dois tipos de estratégias para combater a inativação pelas β -lactamases. Uma é o desenvolvimento de novos derivados que possuam maior resistência à ação dessas enzimas e a outra é a administração simultânea de compostos inibidores como sulbactam e ácido clavulânico. Sulbactam é o 1,1-dióxido do ácido penicilânico, antibiótico semi-sintético de limitado espectro de ação que inibe as β -lactamases irreversivelmente e, por esse motivo, é administrado em combinação com ampicilina. Antibióticos β -lactamase-resistentes, como cloxacilina, e ainda os aminoglicosídeos, também são administrados juntamente à ampicilina. O sinergismo resultante dessas associações permite aumentar o espectro de ação da ampicilina, incluindo mais microrganismos aeróbios e alguns anaeróbios^{38, 71, 76, 87}.

2.3.3.3 Toxicologia

Assim como outras penicilinas, a ampicilina não apresenta potencial mutagênico ou teratogênico³¹.

2.3.3.4 Farmacocinética

A ampicilina é mais estável em meio ácido que a benzilpenicilina e, portanto, à ação do suco gástrico. Os alimentos podem reduzir a absorção do fármaco, por isso deve ser administrado no mínimo de 30 a 60 minutos antes das refeições. Cerca de 30% da dose oral é absorvida, com um pico de concentração plasmática de 2,0 a 6,0 mg.L⁻¹ duas horas após a administração de 500 mg. A relação dose/absorção é linear para doses baixas, portanto, duplicando a dose administrada, a concentração plasmática corresponderá ao dobro. Na

administração intramuscular de 500 mg, observa-se um pico de concentração plasmática de 7 a 17 mg.L⁻¹, após cerca de uma hora ^{27, 31}.

A meia-vida da ampicilina é de 1 a 2 horas (segundo alguns autores de 0,8 a 1,2 horas ³², 1,2 a 1,5 horas ⁹, menos que uma hora ³⁴) e a porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas de cerca de 20%. Distribui-se por todo o organismo e pode ser detectada em concentrações menores que a plasmática em vários tecidos, exceto no fígado e rins. A penetração na barreira hemato-encefálica geralmente é baixa, entretanto, nas inflamações agudas, onde são administradas doses diárias de 150 mg/Kg, concentrações de 3 mg/L podem ser alcançadas no fluido cérebro espinhal. A ampicilina também atravessa a barreira placentária, mas os níveis no líquido amniótico, no primeiro trimestre da gravidez, não atingem concentrações terapêuticas. Pequenas quantidades do antibiótico são secretadas pelo leite ^{31, 71}.

O Clearance renal da ampicilina é menor que o da benzilpenicilina em função de sua maior meia-vida. A excreção renal se dá por filtração glomerular e por secreção tubular. Após a administração oral, de 21 a 74% da dose são excretados na forma inalterada na urina ^{2, 4, 9, 31, 34, 37, 50, 51, 59}. Após administração por via intravenosa esse valor aumenta para 70 a 90% ^{31, 34, 37, 59}. Essa eliminação pode ser reduzida com administração simultânea de probenecida. A meia-vida da ampicilina pode ser maior em pacientes com disfunção renal, não necessitando de ajuste de dose, exceto em casos de comprometimento renal muito acentuado. A ampicilina é também excretada pela bile porém em quantidades variáveis ⁷¹.

O metabolismo hepático é uma via de eliminação pouco importante, uma vez que apenas cerca de 10% da dose são biotransformados no fígado, originando o ácido penicilóico, derivado inativo (**Figura 3**) ^{31, 34}. Um outro derivado foi proposto como sendo o epímero 5 S do ácido penicilóico e que também é eliminado na urina ⁷⁶.

Figura 3 Biotransformação hepática da ampicilina ^{31, 76}

Na **Tabela 1** estão resumidos alguns dos principais parâmetros farmacocinéticos da ampicilina.

Tabela 1 Principais parâmetros farmacocinéticos da ampicilina ^{27, 31, 71}

Meia-vida plasmática	de 1 a 2 horas
Volume de distribuição	de 0,2 a 0,5 L/Kg
Clearance plasmático	de 3 a 4 mL/min. Kg
Ligação a proteínas	20%
Taxa de distribuição no sangue (plasma/sangue total)	1,8
Metabolismo pré-sistêmico	baixo
Absorção por via oral	de 30 a 40%

2.3.3.5 Relação estrutura-atividade

A atividade da ampicilina sobre as bactérias é expressa em termos de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. A concentração mínima inibitória média para enterococos é cerca de 1,5 mg/L ^{31, 54}. A concentração mínima inibitória para microrganismos Gram-positivos varia de 0,02 a 6 µg/mL e para Gram-negativos de 0,02 a 8 µg/mL ⁷¹.

2.3.3.6 Uso terapêutico

2.3.3.6.1 Indicações^{31, 54, 71, 87}

A ampicilina se tornou, nos anos setenta, um dos mais efetivos antibióticos de amplo espectro, abrangendo infecções dos tratos gastrointestinal, respiratório e urinário devidas a *Staphylococci*, *Streptococci*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, certas estirpes de *Escherichia coli* e algumas espécies de *Salmonella*, *Shigella* e *Moraxella*.

A ampicilina é indicada no tratamento de infecções urinárias, particularmente aquelas devidas a *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Streptococcus faecalis*, em virtude das altas concentrações alcançadas na urina após sua administração oral. Também é eficaz e segura na terapia de infecções urinárias na gestação. O uso crônico desse antibiótico, por exemplo, em afecções recorrentes de pacientes com defeitos anatômicos no trato urinário ou bexiga neurogênica, pode levar à ocorrência de microrganismos resistentes, como *Klebsiella*, *Enterobacter* e mesmo *Candida*. A resistência à ampicilina atinge cerca de 50% das cepas de *E. coli*, impedindo que seja empregada no tratamento presuntivo das infecções urinárias.

Nas crianças, a otite média é causada principalmente por *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, ambos sensíveis à ação da ampicilina.

A ampicilina pode ser empregada na bronquite crônica e até na pneumonia, se comprovada a sensibilidade do agente etiológico.

Febres tifóide e paratifóide podem ser tratadas com penicilinas, incluindo ampicilina, entretanto, a resposta é mais lenta que a terapia com cloranfenicol. Esta diferença pode ser devida à maior eficácia deste último antibiótico contra *Salmonella*, uma vez que há resistência à ampicilina por parte de muitas espécies de *Salmonella*.

As bactérias que mais frequentemente causam meningite são *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*, todas, geralmente, sensíveis à ampicilina. Até 1974 era considerado fármaco de escolha no tratamento da meningite, entretanto, com o aparecimento de cepas resistentes de *H. influenzae*, não deve ser usado sozinho. A administração geralmente é por via intravenosa e a via intratecal não é recomendada.

A ampicilina pode ser empregada sózinha no tratamento de septicemia causada por bactérias sensíveis, entretanto recomenda-se que seja associada a outro fármaco, por exemplo

um aminoglicosídeo como a gentamicina, caso o principal agente causador não seja conhecido.

A ampicilina é indicada em colangites desde que a bactéria causadora seja sensível. Nesse caso, a terapia desse tipo de infecção requer atenção uma vez que a baixa concentração do antibiótico na bile, frequentemente encontrada em pacientes com doença obstrutiva causada por *Klebsiella spp* e *Bacteróides fragilis*, pode comprometer o tratamento.

O tratamento de escolha para o combate à gonorréia constitui-se de dose única intramuscular de penicilina procaina de 2.400.000 UI e 1 g de probenecida por via oral. Entretanto, a ampicilina pode ser uma alternativa, sendo administrada em dose única oral de 2 g, combinada com 1 g de probenecida, ou em doses orais menores administradas de 5 a 7 dias. A gonorréia sistêmica deve ser tratada apenas com benzilpenicilina.

A maioria das endocardites infecciosas são devidas a espécies patogênicas de estreptococos, bactérias produtoras de penicilinase, sendo inadequado, portanto, o tratamento com penicilinas. Entretanto, menos frequentemente, há endocardites causadas por *Streptococcus faecalis*, que podem se combatidas com ampicilina associada a um aminoglicosídeo (gentamicina, por exemplo), que aumenta a sua eficácia, reduzindo a concentração mínima inibitória para a ampicilina.

A ampicilina é indicada para o tratamento da listeriose, recomendada especialmente em neonatos.

2.3.3.6.2 Contra-indicações

Uma vez que há a alergenidade cruzada entre a ampicilina e as demais penicilinas, o seu uso está contraindicado em pacientes com histórico de alergia às penicilinas. Pacientes portadores de febre glandular ou leucemia linfática devem evitar o uso do antibiótico pois podem desenvolver erupções ^{31, 54}.

2.3.4 Estudos de bioequivalência da ampicilina

Uma vez que a presença de excipientes e as diferentes técnicas de produção podem afetar significativamente a liberação do fármaco de sua forma de administração, é de se esperar que a biodisponibilidade possa variar em função desses parâmetros ⁹. Inúmeros relatos comprovam que há diferenças na disponibilidade da ampicilina sobretudo nas formas orais. Na literatura são apresentados muitos trabalhos comparando a biodisponibilidade desse

fármaco sob diversas formas farmacêuticas. A preocupação nesses estudos se justifica, principalmente, por ser a ampicilina o antibiótico mais frequentemente prescrito no tratamento de muitas doenças infecciosas, especialmente em países em desenvolvimento, em função do baixo custo.

Considerando que, pelas características físico-químicas, a ampicilina apresenta risco potencial de inequivalência biológica, DUGAL e col. ³², realizaram estudos para investigar a influência do tamanho da cápsula e da compactação do pó na biodisponibilidade do antibiótico. Para tanto, estudaram três formulações sob a forma de cápsulas com 250 mg de ampicilina triidratada, dentre as quais uma comercial, que foi considerada como referência. Nas duas primeiras variaram o tamanho das cápsulas e o processamento: uma delas foi granulada antes do encapsulamento. As técnicas analíticas empregadas para determinação do antibiótico nos produtos foram a espectrofotometria no visível da Farmacopéia Britânica de 1968 e o método biológico da Farmacopéia Americana 18 ed., este último, também aplicado na determinação de ampicilina no plasma. Para o ensaio de bioequivalência, foram selecionados nove voluntários do sexo masculino, divididos de forma aleatória em três grupos segundo o Quadrado Latino. A área sob a curva (*AUC*) das amostras de sangue foi determinada pelo método dos trapezóides e as constantes de eliminação (*Ke*), aparentemente de primeira ordem, foram obtidas pelas curvas de regressão dos mínimos quadrados do logaritmo da última concentração sérica *versus* tempo. As concentrações séricas de cada voluntário foram interpretadas segundo modelo aberto de um único compartimento. O método de Wagner-Nelson foi aplicado para determinar a fração absorvida da dose. Também foram calculadas as meias vidas de absorção e as curvas de *AUC* acumuladas. Os resultados foram submetidos a testes estatísticos que não demonstraram diferenças significativas ($P=0,05$) entre as amostras estudadas.

AIACHE e col. ¹, num estudo semelhante, compararam a biodisponibilidade da ampicilina apresentada sob as formas de suspensão oral e cápsulas. Participaram do estudo cinco voluntários sadios, de ambos os sexos, que foram selecionados após serem submetidos a exames clínicos. Amostras de sangue e urina foram coletadas em períodos pré estabelecidos e o método analítico escolhido para determinação da quantidade de ampicilina nos fluidos biológicos foi o microbiológico. Os parâmetros farmacocinéticos estudados foram as constantes de absorção e eliminação, meia vida de eliminação, concentração plasmática máxima, tempo em que foi atingida a concentração máxima, área sob a curva de concentração plasmática (*AUC*) *versus* tempo. Também foi determinada a porcentagem de eliminação urinária. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância, que permitiu verificar a variação experimental em função dos grupos, ordem de administração e dos medicamentos.

Foram calculados os intervalos de confiança. Não foi encontrada diferença significativa entre as amostras estudadas, o que chamou à atenção dos autores uma vez que, com o uso dos agentes suspensores como pectina, sílica coloidal e xarope, esperava-se diminuição na biodisponibilidade da ampicilina sob a forma suspensão. Concluíram que as características próprias da ampicilina, por exemplo diâmetro de partículas e forma cristalina podem ser mais importantes em sua biodisponibilidade que as variantes de formulação por eles estudadas.

Preocupados com os problemas de biodisponibilidade da ampicilina, ANDRADE e col.⁹ estudaram três produtos comerciais contendo o antibiótico na forma de cápsulas, e correlacionaram os resultados obtidos no teste *in vivo* com suas dissoluções *in vitro*. Nos trabalhos foram incluídos oito voluntários sadios, do sexo masculino, divididos dois a dois, em quatro grupos, em desenho experimental cruzado. A dose administrada foi de 1 g, sendo que, além das cápsulas, administraram uma solução contendo mesma quantidade do fármaco. Amostras de urina foram coletadas de 15 em 15 minutos nas primeiras 2,5 horas e depois de hora em hora até 24 horas após a dose, e analisadas pelo método espectrofotométrico baseado na formação de complexo cúprico em pH 6,0 e posterior leitura a 325 nm (Método de DOADRIO e GARCIA-MIRASIERRA modificado). Foram determinadas as constantes de absorção pelo Método de Wagner-Nelson²⁵ e realizada a análise de variância testando os grupos de indivíduos, os períodos e os produtos. Esse estudo revelou diferenças significativas apenas quanto aos produtos em relação à solução, sendo que os três produtos comerciais foram considerados bioequivalentes. Além disso, foi obtida boa correlação entre as meias vidas de dissolução, em HCl 0,1 N, e de absorção.

Os ésteres talampicilina, hetacilina, bacampicilina e pivampicilina são pró-fármacos da ampicilina que, por hidrólise, liberam o antibiótico e, portanto, constituem formas alternativas para melhorar sua absorção gastrointestinal^{31, 34, 52, 59}. Vários pesquisadores compararam a biodisponibilidade da ampicilina com a de seus ésteres com o objetivo de comprovar vantagens na absorção por via oral.

Bacampicilina e pivampicilina foram estudadas por EHRNEBO e col.³⁴, que, verificaram maior velocidade de absorção da bacampicilina na forma comprimidos, seguida pela pivampicilina (cápsulas), quando comparada com comprimidos de ampicilina. Esse trabalho, com cinco voluntários sadios do sexo masculino, seguiu delineamento experimental cruzado e as quantidades de ampicilina foram determinadas no plasma e urina pelo método microbiológico usando *Sarcina lutea*. O modelo farmacocinético empregado foi o aberto de dois compartimentos, apresentando absorção aparente de ordem zero. Como conclusão os pesquisadores apresentaram a melhor biodisponibilidade de ambos os ésteres em comparação à ampicilina e nenhuma diferença significativa entre bacampicilina e pivampicilina.

A pivampicilina, após administração por via oral, é rapidamente hidrolisada e de 60 a 70% da dose administrada é eliminada como ampicilina na urina num período de seis horas. Na forma de cloridrato, apresenta como desvantagem o sabor amargo que dificulta seu emprego em preparações pediátricas. Por esse motivo, foram desenvolvidos seus correspondentes sais pamoato e probenecida. Ambos apresentam sabor que pode ser facilmente corrigido com o emprego de flavorizantes e o segundo libera quantidades de probenecida suficientes para inibir a excreção tubular renal da ampicilina. Embasados nessas informações, HITZENBERGER e col.⁵², compararam a absorção e excreção de uma suspensão de ampicilina triidratada, cápsulas contendo cloridrato de pivampicilina, suspensão de pamoato de pivampicilina e cápsulas de pivampicilina-probenecida. O estudo foi realizado em 12 voluntários do sexo masculino, num ensaio randomizado cruzado com período de *wash out* de 4 dias. A partir de amostras de sangue e urina foram determinados os seguintes parâmetros farmacocinéticos: meia-vida, níveis plasmáticos de ampicilina e de probenecida, biodisponibilidade relativa e quantidade de ampicilina recuperada na urina. A quantidade recuperada na urina e a biodisponibilidade relativa foram maiores para as preparações contendo pivampicilina, nas diferentes formas, quando comparadas às com ampicilina. Outra conclusão foi que, em dose única, não houve influência bloqueadora renal da probenecida, quando administrado o sal pivampicilina-probenecida.

Com o objetivo de mascarar o sabor desagradável da bacampicilina, SJÖVALL e col.⁹⁴, prepararam microcápsulas de cloridrato de bacampicilina recobertas com filme de etilcelulose de diferentes espessuras, cujos conteúdos de polímero variaram de 17 a 37%. As microcápsulas foram, então, empregadas no preparo de suspensões contendo agentes flavorizantes. Foram determinados a cinética de dissolução *in vitro* e o desempenho *in vivo* num estudo de biodisponibilidade com 12 voluntários. A análise sensorial das suspensões também foi realizada. As quantidades do antibiótico foram analisadas no plasma e urina pelo método microbiológico empregando *Micrococcus luteus*. Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram área sob a curva (*AUC*), pelo método dos trapezóides, concentração máxima (*C_{máx}*), constante de velocidade de absorção (*k_a*) e quantidade recuperada na urina. A liberação do fármaco no ensaio de dissolução foi correlacionada com os picos de concentração plasmática individuais e com as áreas sob as curvas. Os pesquisadores obtiveram relação linear significativa entre a meia vida de dissolução e os parâmetros farmacocinéticos estudados, sendo que o teste de dissolução pode ser preditivo para a biodisponibilidade do cloridrato de bacampicilina sob a forma de suspensão de microgrânulos. Os resultados também comprovaram que esse fármaco pode ter seu sabor amargo atenuado pelo emprego das microcápsulas sem, no entanto, diminuir sua biodisponibilidade.

As vantagens do emprego da hetacilina em substituição à ampicilina são discutidas por JUSKO & LEWIS ^{59, 60}, que compararam as propriedades farmacocinéticas da hetacilina às da ampicilina; em indivíduos normais e, visando ajuste da posologia, em indivíduos anéfricos e submetidos à hemodiálise. Os estudos farmacocinéticos por eles conduzidos, baseados em determinações fluorimétricas no sangue e urina, conduziram à conclusão de que, embora a rápida conversão da hetacilina produza os níveis plasmáticos iniciais diferenciados, a hetacilina é equivalente à ampicilina, tanto em indivíduos normais como em pacientes portadores de deficiência renal. Os autores ressaltam que é discutível a administração de um precursor equimolar inativo, uma vez que, se a conversão não for suficientemente rápida pode haver eliminação sem o efeito terapêutico correspondente. Entretanto, a maior vantagem tem lugar na administração por forma de infusão devido à sua estabilidade química, pois a ampicilina é rapidamente eliminada.

A sarpicilina, é um derivado semi-sintético mais recente da penicilina, correspondente ao éster metoximetílico da hetacilina. É um antibiótico com características básicas, não ionizável, muito lipofílico e com o mesmo espectro de ação antimicrobiana da ampicilina. Esse derivado é de particular importância pois fornece altas concentrações de ampicilina nos tecidos, principalmente em regiões mais ricas em lipídeos como o cérebro, próstata, fluido cérebro-espinhal e pulmões. Além disso, após administração oral de dose única, foram constatadas vantagens em relação à ampicilina como: absorção mais rápida, níveis plasmáticos mais altos e mais rapidamente atingidos e maior volume de distribuição. Comprimidos tamponados e cápsulas gelatinosas duras e moles contendo 250 mg de sarpicilina foram estudados do ponto de vista farmacocinético, visando a escolha da forma farmacêutica que possibilitasse melhores condições de biodisponibilidade ⁹⁸.

A partir da observação de que a dissolução de cápsulas de ampicilina apresentava grande variação entre os fabricantes do mercado sudanês, ALI e col. desenvolveram diversos estudos confrontando formas farmacêuticas, fabricantes e o tipo de matéria prima (anidra, triidratada ou o éster bacampicilina) empregada na produção desses medicamentos ²⁻⁶. Como a forma anidra é mais solúvel que a triidratada, avaliaram o desempenho *in vivo* após administração de cápsulas contendo apenas ampicilina nas duas formas e concluíram que a ampicilina anidra apresentou maior absorção, tanto na quantidade como na velocidade, em relação à ampicilina triidratada, provavelmente em função de sua maior solubilidade ².

Esse resultado conflita com o trabalho de HILL e col. ⁵¹, que, comparando os parâmetros de dissolução e biodisponibilidade da ampicilina sob as formas anidra e triidratada, encontraram diferentes resultados. Com a finalidade de eliminar outras fontes de

variação, esses pesquisadores submeteram ambas as matérias primas a prévio tratamento, como purificação, micronização e determinação da distribuição do tamanho de partículas. Foram determinadas as velocidades intrínsecas de dissolução e solubilidades em água destilada e ácido clorídrico diluído (0,053 N). A disponibilidade *in vivo*, foi determinada a partir de amostras de sangue e urina de 27 voluntários de ambos os sexos, que receberam cápsulas contendo as duas matérias-primas. Os métodos analíticos foram a espectrofotometria no UV para os ensaios físico-químicos e o microbiológico nos estudos de bioequivalência. A velocidade de dissolução da ampicilina triidratada foi menor que a da anidra em água mas, em HCl, a dissolução das duas formas foi idêntica. As médias dos valores de concentrações séricas e das quantidades recuperadas na urina confirmaram a similar biodisponibilidade das formas anidra e triidratada.

PRISTA e col.⁸⁴ estudaram a velocidade de dissolução de alguns fármacos de natureza ácida e de seus respectivos sais, incluindo ampicilina anidra e sódica. Segundo eles, geralmente são menos solúveis em água os fármacos de natureza ácida que os seus sais de sódio ou de potássio. Todavia, quando se ingere um fármaco salificado, o ácido clorídrico gástrico promove sua decomposição, liberando-o na forma de ácido livre. Nesse caso, pode parecer que não há nenhuma vantagem em se administrar o fármaco na forma de sal, uma vez que a acidez estomacal o transforma novamente na forma original. Contudo, quando ocorre essa acidificação, muitas vezes, há a precipitação do composto sob a forma de partículas muito finas, o que pode levar à dissolução mais rápida e completa. De fato, foi comprovado, com a determinação do tamanho de partículas, densidade e da velocidade de dissolução, que os fármacos obtidos em meio clorídrico a partir dos respectivos sais, simulando o que ocorre no TGI, apresentaram maior tenuousidade e maior velocidade de dissolução. Com relação à ampicilina, todavia, o aumento na solubilidade verificado foi muito pequeno e isto levou os autores a concluir que, possivelmente, as partículas tornaram-se mais dificilmente molháveis, dificultando sua dissolução.

O trabalho de TSUJI e col.¹⁰⁸, motivado pelas discrepâncias encontradas na literatura acerca da solubilidade da ampicilina, teve como objetivo verificar se a dissolução é etapa limitante da sua biodisponibilidade, conforme o relato de HILL, ou não. Para isso, compararam quantitativamente a estabilidade, a solubilidade e a cinética de dissolução da ampicilina e de outras penicilinas anfotéricas em função do pH. Diversas características físico-químicas foram determinadas nas formas de ampicilina anidra, sódica e triidratada, como *pKa*, solubilidade, velocidade de decomposição, velocidade de dissolução e coeficiente de difusão. Os resultados obtidos indicam que a taxa de degradação do grupamento beta-lactâmico das aminopenicilinas no estômago são pouco significativos e não devem afetar seus

níveis plasmáticos após administração oral. Acima de pH 3, as velocidades de dissolução dos diferentes antibióticos foram independentes do pH, enquanto que abaixo desse valor de pH, a dissolução aumentou com o aumento da acidez do meio. Quando administrados com suficiente quantidade de água, a dissolução não é etapa limitante para a absorção das aminopenicilinas. Portanto, embora haja diferenças de solubilidade entre a ampicilina anidra e a triidratada, não deve haver comportamento distinto entre a biodisponibilidade de ambas, o que está em concordância com os resultados de HILL ⁵¹. Às diferentes conclusões de outros autores, TSUJI e col. atribuem os efeitos decorrentes de fatores farmacotécnicos.

ALI e col. estudaram também os efeitos da alimentação, comparando diferentes tempos de administração da ampicilina com relação às refeições e o tipo de dieta alimentar, cujas conclusões apontam para diferenças significativas na absorção da ampicilina ⁶. A biodisponibilidade de bacampicilina foi avaliada em dois lotes de fabricantes distintos ³ e, em outro trabalho, frente à influência da dieta alimentar ⁵. Segundo os autores, a absorção do éster, diferentemente da ampicilina, não parece sofrer influência do conteúdo gástrico se administrada às refeições. Em todos esses estudos, esse grupo de pesquisadores, recrutou voluntários sadios, geralmente em número de cinco e do sexo masculino, e a biodisponibilidade foi avaliada a partir de resultados da excreção urinária. O método de análise da ampicilina na urina foi o espectrofotométrico de SMITH e col. ⁹⁵, que, conforme os pesquisadores, foi satisfatório quanto à sensibilidade e exatidão nas determinações. Esse mesmo método foi aplicado por ANGELUCCI & BALDIERI ¹⁰ na determinação do antibiótico em fluidos biológicos e validado por ALI e col. ⁷ frente ao método microbiológico para a análise da ampicilina em amostras de urina.

A influência da alimentação na absorção da ampicilina foi investigada por vários outros pesquisadores, entretanto, há discrepâncias entre os resultados divulgados. HAMID & BEG ⁴⁸ estudaram os efeitos do tipo de alimentos e tempo de refeição em relação à administração do antibiótico, determinando a biodisponibilidade a partir das concentrações plasmáticas obtidas empregando o método microbiológico com *Sarcina lutea*. As amostras de 250 mg de ampicilina triidratada na forma de cápsulas foram administradas a 6 voluntários sadios do sexo masculino que receberam cinco tratamentos distintos variando o tipo de alimentos e o tempo da refeição com relação à administração. A análise farmacocinética incluiu o cálculo das meias vidas de absorção e gráficos de área sob a curva de concentração plasmática (*AUC*) versus tempo. A principal conclusão é de que há grande influência da alimentação na biodisponibilidade de ampicilina e que para melhor absorção, o antibiótico deve ser administrado em jejum e pelo menos uma hora e meia antes das refeições.

Muitos trabalhos foram desenvolvidos como objetivo de avaliar a influência das técnicas de fabricação e de adjuvantes farmacotécnicos na biodisponibilidade da ampicilina. Como por exemplo, JIMENEZ e col. que, visando melhorar a absorção desse antibiótico por via oral, prepararam diferentes formulações contendo concentrações de 24, 50 e 80% de celulose microcristalina ⁵⁷ e, num outro trabalho, de uréia ⁵⁸ e compararam seu desempenho *in vitro*, através de dissolução em fluxo contínuo, e *in vivo*, teste de bioequivalência em coelhos, com uma preparação-referência contendo apenas ampicilina e lactose. Todas as preparações estudadas foram na forma de cápsulas, exceto a que continha 80% do adjuvante (celulose microcristalina ou uréia), que foi preparada na forma de comprimidos em função do volume resultante. Análises térmicas diferenciais e de ressonância magnética nuclear foram realizadas para verificar eventuais formações de complexos especiais ou transformações dos compostos originais. As determinações quantitativas da ampicilina foram feitas segundo o método fluorimétrico de JUSKO e col ^{59, 60}. Os resultados obtidos das curvas de cinética de dissolução e de concentração plasmática *versus* tempo, permitiram concluir que ambos os adjuvantes testados aumentaram a disponibilidade da ampicilina, sendo que, o efeito da celulose microcristalina foi proporcional à quantidade adicionada, entretanto, no caso da uréia, o aumento significativo sobre a biodisponibilidade ocorreu apenas com a porcentagem de 80%.

Outros autores dirigiram suas pesquisas no mesmo sentido, procurando avaliar a biodisponibilidade da ampicilina, comparando especialidades farmacêuticas existentes nos mercados locais, medicamentos genéricos, tipos de matéria-prima e excipientes empregados, formas farmacêuticas, bem como interações com alimentos ou outros medicamentos. No **Quadro 2**, a seguir, estão resumidos alguns desses trabalhos.

Quadro 2. Trabalhos publicados referentes à biodisponibilidade e bioequivalência da ampicilina.

Referência	Tipo de estudo	Amostras	Métodos	Conclusões
HASSANZADEH ⁵⁰	Bioequivalência, cruzado, com 12 voluntários, dose única	4 lotes de cápsulas e 1 comprimido de ampicilina na forma triidratada	Determinação da quantidade excretada na urina, método espectrofotométrico ¹⁰	Não houve diferença significativa
LÓPEZ e col. ⁷⁰	Bioequivalência, cruzado, dose única, 12 voluntários	2 lotes de cápsulas (gelatina dura e mole) e 2 comprimidos (convencionais e oblongos) de 500 mg de ampicilina triidratada	Determinação da quantidade excretada na urina pelo método espectrofotométrico ¹⁰	As cápsulas de gelatina mole forneceram a melhor biodisponibilidade
OGUNBONA & AKANNI ⁸⁰	Bioequivalência, cruzado, dose única, 9 voluntários	2 lotes de cápsulas de produtos genéricos <i>versus</i> 1 lote referência, contendo 250 mg de ampicilina	Determinação da quantidade acumulada na urina e velocidade de excreção urinária do fármaco pelo método espectrofotométrico ¹⁰	Apenas um lote foi considerado bioequivalente ao produto referência
TAYLOR e col. ¹⁰⁵	Bioequivalência, cruzado, dose-múltipla (4), 6 voluntários	Produto-teste <i>versus</i> produto referência de 500 mg	Determinação da concentração sanguínea pelo método microbiológico: <i>AUC</i> , <i>C_{máx}</i> , <i>T_{máx}</i> e <i>T_{1/2}</i>	As duas formulações foram consideradas bioequivalentes
PUCK ⁸⁵	Bioequivalência, cruzado, dose única, 12 voluntários	2 produtos sob a forma de cápsulas (1g e 2 x 500 mg)	Determinação dos níveis plasmáticos (<i>AUC</i>), e de excreção urinária	As duas formas de dosagem foram consideradas bioequivalentes
TANIGAWARA e col. ¹⁰⁴	Biodisponibilidade, cruzado, 4 voluntários, dose única	Solução injetável e solução oral de ampicilina sódica, pó e cápsulas de ampicilina triidratada e cápsulas de ampicilina anidra	Determinação de ampicilina na urina por HPLC. Cálculo da recuperação do fármaco na urina, tempo médio de residência (<i>MRT</i>), tempos médios de absorção, desintegração e dissolução.	A absorção da ampicilina liberada é a etapa limitante do processo uma vez que o tempo médio de absorção é o maior.

Quadro 2. /Continuação.

Referência	Tipo de estudo	Amostras	Métodos	Conclusões
WELLING e col. ¹¹⁶	Comparação da biodisponibilidade da ampicilina e amoxicilina em condições de jejum e de dietas padronizadas, 6 voluntários, cruzado, dose única	Cápsulas de ampicilina triidratada e de amoxicilina triidratada	Determinação da concentração sanguínea e da quantidade excretada na urina de ambos os antibióticos pelo método microbiológico, com <i>Sarcina lutea</i> .	A absorção oral dos dois fármacos foi reduzida quando administrados imediatamente após refeição e a biodisponibilidade da amoxicilina diminuiu com a ingestão de pequenos volumes de água na administração.
WHYATT e col. ¹¹⁷	Bioequivalência de produtos contendo ampicilina, cruzado, 14 voluntários, dose única	As amostras foram 17 produtos do mercado de diferentes fabricantes. Um dos produtos foi tomado como referência para os estudos de bioequivalência.	Determinação da concentração sérica de ampicilina, concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$), tempo em que $C_{m\acute{a}x}$ foi atingida ($t_{m\acute{a}x}$) e área sob a curva (AUC). O método analítico desenvolvido previamente pelos autores foi o turbidimétrico com <i>Staphylococcus aureus</i>	Não houve diferença significativa na biodisponibilidade entre os produtos estudados, apesar da grande variabilidade observada na absorção do antibiótico intra e interindivíduos
ROSENCWEIG e col. ⁸⁹	Comparação de parâmetros farmacocinéticos e da atividade antibacteriana, estudo cruzado <i>in vivo</i> , 9 voluntários, dose única	Doses orais equimolares de cloridrato de bacampicilina e ampicilina triidratada	Determinação de constantes de absorção (k_a), excreção fecal (k_f), distribuição (k_{12}, k_{21}) e excreção renal e extra-renal (k_{el}), AUC , MBD (maior diluição que não continha desenvolvimento bacteriano)	Absorção de bacampicilina foi 5 vezes mais rápida e 30% maior que a de ampicilina. MBD determinada nas amostras de urina e sangue demonstrou maior ação antibacteriana da bacampicilina

Quadro 2. / Continuação.

Referência	Tipo de estudo	Amostras	Métodos	Conclusões
MURAI e col. ⁷⁶	Comparação do desempenho farmacocinético entre doses individuais e combinadas de dicloxacilina e ampicilina, 4 voluntários, dose única	Cápsulas de dicloxacilina sódica e de ampicilina triidratada	Determinação do tempo médio de permanência (<i>MRT</i>) e excreção acumulada no tempo infinito (X_u^∞). As determinações de ampicilina na urina foram realizadas por HPLC	A biotransformação de ampicilina é diminuída com a administração simultânea de dicloxacilina enquanto que a velocidade de excreção e o <i>MRT</i> não se alteraram. Para a dicloxacilina não houve alteração.
VILA-JATO & PEREZ-LANZAC ¹¹³	Biodisponibilidade, cruzado, 10 voluntários, dose única	Cápsulas de ampicilina triidratada e de ampicilina potássica, solução de ampicilina sódica e ampicilina em suspensão.	Determinação da quantidade acumulada de ampicilina na urina (<i>U_{máx}</i>) pelos métodos espectrofotométrico ¹⁰ e espectrofluorimétrico ⁵⁹ ; constante de velocidade de excreção (<i>ke</i>) e tempo de latência (<i>r</i>)	Não houve diferenças significativas entre as cápsulas de ampicilina triidratada e potássica. A quantidade de fármaco excretada nas três formas farmacêuticas são estatisticamente iguais, embora a absorção tenha sido mais rápida na forma solução.

Na literatura também foram descritos trabalhos relativos à biodisponibilidade da ampicilina, ou de seus ésteres, em indivíduos portadores de deficiência hepática (LEWIS & JUSKO ⁶⁸) e pacientes submetidos à retirada parcial de porções do intestino delgado, cirurgia indicada em casos extremos de obesidade (KAPMANN e col. ⁶¹).

2.3.5 Aspectos analíticos da ampicilina

Nos estudos farmacocinéticos, o método preferencial para análise é a cromatografia líquida de alta eficiência que tem elevadas sensibilidade e especificidade. Para a ampicilina, um método alternativo é o ensaio microbiológico empregando microrganismo sensível, como *Sarcina lutea* ^{27, 31}. Este último, entretanto, apresenta desvantagens como baixa precisão e reduzida seletividade uma vez que produtos de biotransformação ou outros antimicrobianos podem interferir nos resultados ⁶³.

Segundo HURWITZ & CARNEY ⁵⁵ técnicas fundamentadas em GLC, TLC, HPLC e cromatografia de adsorção não podem ser adaptados para sua análise e de seus produtos de biotransformação no plasma uma vez que não apresentam sensibilidade adequada. Métodos com melhor sensibilidade como, por exemplo, os fluorimétricos com sensibilidade da ordem de 0,1 µg/mL, tem sido usados com essa finalidade ^{59, 60}. A extração da ampicilina e derivados com tetraetilamônio pode otimizar as análises cromatográficas de plasma permitindo níveis de detecção de até 1 µg/mL ⁵⁵, como foi demonstrado no trabalho de HURWITZ & CARNEY ⁵⁵ que desenvolveram uma metodologia para extração da ampicilina e seus metabólitos, visando determinação específica no plasma. Sua técnica fundamenta-se na modificação do coeficiente de partição com o uso de compostos de amônio quaternário e extrações combinadas com solventes orgânicos e tampão fosfato pH=7.

VENTURA e col. ¹¹⁰, utilizaram um método por cromatografia líquida de alta eficiência convencional empregando acetonitrila para a quantificação da ampicilina em materiais biológicos humanos. A detecção foi realizada a 220 nm.

HAGINAKA & WATAI ^{46, 47} afirmam que, nos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, a detecção, em geral, é feita empregando a banda de absorção original no ultravioleta, que leva a resultados de sensibilidade e seletividade reduzidas. Por esse motivo, desenvolveram dois métodos, com tratamentos pré e pós coluna, conseguindo detectar concentrações de 0,1 a 0,5 µg/mL de ampicilina inalterada em amostras de urina e plasma. No primeiro caso, procederam à acetilação seguida de reação com 1,2,4-tiazol e cloreto mercúrico. No outro trabalho, após a separação cromatográfica, o tratamento das amostras

envolveu a decomposição alcalina seguida de reação com cloreto mercúrico, otimizando a detecção.

A baixa absorbância da ampicilina na região ultravioleta também foi considerada por LANBECK-VALLÉN e col.⁶⁴ para o desenvolvimento de técnica de cromatografia líquida de alta eficiência adequada à detecção de pequenas quantidades do antibiótico em amostras de urina, plasma após administração de produtos pediátricos. O método baseia-se na separação da ampicilina em uma primeira coluna e reação para obter o mercaptídeo mercúrico do ácido penicilânico. Numa segunda coluna ocorre a reação com fluorescamina para possibilitar a detecção fluorimetricamente, aumentando a sensibilidade.

Métodos espectrofotométricos para determinar a ampicilina na presença de produtos de degradação ou de precursores foram desenvolvidos por BUNGARD²¹ e MONTELEONE e col.⁷⁵. Os primeiros empregaram uma técnica envolvendo a acetilação prévia da ampicilina com anidrido acético, possibilitando a formação do mercaptídeo mercúrico do ácido α -acetamidobenzilpenicilênico, detectado a 325 nm, após aquecimento com as soluções de imidazol e de cloreto mercúrico. Para a detecção de ampicilina, na matéria prima hetacilina, MONTELEONE e col.⁷⁵, descreveram uma técnica na qual o solvente utilizado é o dimetilsulfóxido, fornecendo estabilidade à hetacilina, e reação com Níquel II, resultando em espécie absorvente a 330 nm. A principal vantagem é que, em solventes aquosos, a hetacilina libera a ampicilina, o que não ocorre com o uso de dimetilsulfóxido, melhorando a exatidão.

A reatividade da ampicilina com ninidrina, sob condições controladas de temperatura e pH, foi aproveitada por CELLETTI e col.²², no desenvolvimento de um método espectrofotométrico automatizado para resolução de misturas de ampicilina e cloxacilina em associações farmacêuticas.

Nos compêndios oficiais são apresentados diversos métodos analíticos para a ampicilina matéria-prima e em medicamentos. A Farmacopéia Americana, em suas duas últimas edições^{107, 108} recomenda a cromatografia líquida de alta eficiência para análise da matéria prima e mantém o método iodométrico para a determinação da ampicilina em formas farmacêuticas.

Na Farmacopéia Britânica de 1968¹⁹, para análise da matéria prima e cápsulas, está descrito um método espectrofotométrico, o mesmo relatado um ano antes por SMITH e col.⁹⁵, baseado na leitura da absorbância, a 320 nm, do composto formado após a degradação da ampicilina a 75° C, sob condições controladas de pH e na presença de traços de cobre. Em 1954, STOCK e col.⁹⁹ já haviam estudado essa reação para a benzil penicilina. Esse método

é específico para o antibiótico não degradado uma vez que a sua estrutura intacta é fundamental para a reação, não sofre interferência do ácido 6-aminopenicilânico e seus resultados foram concordantes com aqueles provenientes do método microbiológico com *Bacillus subtilis*. O método foi considerado simples, exato, reprodutível e com a vantagem de permitir análise de muitas amostras, pois a solução, após reação, apresenta boa estabilidade⁹⁵. ANGELUCCI & BALDIERI¹⁰ aplicaram essa técnica para a determinação de ampicilina em fluidos biológicos como plasma, bile e urina, que apresentou boa correlação com resultados obtidos do teste microbiológico com *Sarcina lutea*.

Na última edição da Farmacopéia Britânica²⁰, o método adotado é a volumetria em meio aquoso, com nitrato mercúrico e a determinação do ponto final é potenciométrica. O cálculo da quantidade de ampicilina intacta é realizado por diferença dos resultados entre a titulação do antibiótico degradado em meio de Na OH 1M e titulação direta de sua solução.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem por finalidade avaliar a qualidade farmacêutica de medicamentos do mercado nacional contendo ampicilina, determinando características físicas e físico-químicas de lotes distintos de cápsulas e suspensão oral.

Determinar, comparativamente, a cinética de dissolução dessas formas sólidas.

Validar metodologia analítica para quantificação da ampicilina em amostras de urina preferencialmente com a realização de ensaio piloto *in vivo*.

Determinar a bioequivalência de especialidades farmacêuticas do mercado nacional nas formas de cápsula e suspensão oral, comparativamente a produtos disponíveis no mercado e de eficácia reconhecida no uso clínico. Para cumprir com esse objetivo deverão ser seguidos os itens abaixo discriminados:

- Selecionar, no mercado nacional, produtos contendo ampicilina, de eficácia reconhecida no uso clínico e que cumpram com os principais requisitos de qualidade especificados nos compêndios oficiais para serem adotados como referência;

- Estabelecer protocolo de testes *in vivo* de acordo com as normas oficiais e dentro dos princípios legais e éticos vigentes;

- Aplicar a metodologia previamente validada na determinação do antibiótico nas amostras de urina.

- Determinar os parâmetros farmacocinéticos adequados ao estudo de bioequivalência

- Estudar estatisticamente os resultados obtidos e concluir pela bioequivalência, ou não dos produtos estudados dentro dos limites de segurança estabelecidos.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

4 PARTE EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi executado em quatro etapas distintas, assim divididas:

ETAPA A: Avaliação da qualidade farmacêutica *in vitro* de cápsulas e suspensões contendo ampicilina

Esta etapa teve por objetivo caracterizar sob o ponto de vista físico-químico tanto os produtos em estudo, como aqueles selecionados como referência.

Foram executados ensaios tais como: peso médio, doseamento, pH, umidade, tempo de desagregação, cinética de dissolução, uniformidade de conteúdo.

As amostras provenientes de fabricantes nacionais e multinacionais foram submetidas a esses ensaios que permitiram avaliar previamente a qualidade dos produtos a serem estudados como daqueles considerados como referência.

ETAPA B: Validação da metodologia empregada nos ensaios *in vivo*

Os estudos de bioequivalência são controlados mediante a determinação de parâmetros farmacocinéticos derivados das curvas de nível plasmático do fármaco *versus* tempo ou da excreção urinária acumulada. Para tanto é fundamental o emprego de método analítico adequado à quantificação do fármaco em líquidos biológicos. Nesta etapa foi validado um método espectrofotométrico para a determinação da ampicilina em urina, método este que foi aplicado, preliminarmente em ensaio piloto *in vivo*.

O ensaio piloto *in vivo* teve a finalidade de selecionar as condições do experimento *in vivo*.

ETAPA C: Determinação da bioequivalência dos produtos

Nesta etapa foram executados os ensaios *in vivo* das diferentes formulações testadas, utilizando-se voluntários sadios, segundo as normas estabelecidas pelo FDA-USA. Esta fase foi realizada com o apoio do Hospital Universitário da USP, estando subdividida em:

C.1) Seleção dos voluntários

C.2) Ensaio de bioequivalência

A determinação da bioequivalência dos produtos foi executada em duas etapas distintas, tendo em vista o número de produtos envolvidos no estudo (suspensão oral e cápsulas, além dos produtos referência correspondentes) e o tipo de planejamento estatístico aplicado. Na

Etapa 1, foram ensaiadas as amostras na forma de cápsulas e na Etapa 2, as amostras de suspensão oral. Cada etapa do estudo foi constituída por duas fases, onde na Fase I (ou primeiro período) os voluntários foram divididos em dois grupos com igual número de indivíduos. A cada grupo foi administrado um dos produtos em estudo (A= referência ou B= amostra), em jejum, padronizando-se a quantidade de líquido e a alimentação. Este procedimento foi repetido na Fase II, invertendo a administração dos produtos, de modo que todos os indivíduos recebessem todos os produtos, com intervalos entre os períodos de administração suficientes para garantir a completa eliminação do fármaco. A ampicilina foi, então, determinada na urina dos indivíduos e os parâmetros farmacocinéticos apropriados foram calculados para serem comparados.

ETAPA D: Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos e avaliação estatística dos resultados

Foram construídas curvas de excreção urinária acumulada do fármaco em função do tempo, efetuando-se a comparação dos resultados, bem como a análise estatística que evidenciou a bioequivalência dos produtos.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 ETAPA A: Avaliação da qualidade farmacêutica *in vitro*

4.1.1.1 Amostras

Foram coletadas amostras, de um mesmo lote, do comércio local sob as formas de cápsulas de 500 mg de ampicilina, provenientes dos laboratórios A e B (lotes 1 e 2), e pó para suspensão oral contendo 250 mg/5mL de ampicilina após reconstituição, fabricados pelos laboratórios A, B e D.

4.1.1.2 Padrão

Como substância química de referência, utilizou-se ampicilina anidra, potência 993,71 µg/mg, QUIMIS código: 01.0058-6, lote 4901, de 04/12/93, fornecida pela EMS Indústria Farmacêutica Ltda. e empregada sem prévia purificação.

4.1.1.3 Reagentes

Ácido clorídrico 1 N ¹⁰⁸

Hidróxido de sódio 1 N ¹⁰⁸

Solução de iodo 0,01 N (SV) ¹⁰⁸

Solução de tiosulfato de sódio 0,01 N (SV) ¹⁰⁸

Pasta de amido (I) ¹⁰⁸

Solução tampão fosfato/sulfato de cobre de pH 5,2 ¹⁹

Todos os reagentes empregados na preparação das soluções foram de grau analítico de pureza.

4.1.1.4 Equipamentos

Balança analítica E.METTLER - Zürich, type H15.

pH-metro TECNAL DIGIMED, TE 901

Aparelho para determinação do tempo de desagregação de comprimidos ÉTICA.

Aparelho para determinação da dissolução de comprimidos HANSON Research Corporation, Modelo 48.158.162.

Espectrofotômetro ultravioleta/visível, INCIBRÁS, Modelo MF 200, série 029098.

Ultrassom THORNTON, modelo T-14

Aparelho para determinação de umidade do tipo Karl Fisher METHRON 665 12 MAT

4.1.1.5 Métodos

Foram realizados ensaios para as cápsulas, incluindo testes físicos e físico-químicos inscritos em compêndios oficiais, como peso médio, tempo de desagregação, doseamento (iodometria), dissolução, cujas especificações são da Farmacopéia Americana 22 e 23 ed.^{109, 110}, além da determinação da quantidade de ampicilina segundo o método espectrofotométrico adaptado da Farmacopéia Britânica, 1968¹⁹, empregado no ensaio de dissolução. Parâmetros como pH, peso médio, dissolução do pó e doseamento de ampicilina foram determinados no produto pó para suspensão oral.

4.1.1.5.1 Determinação de ampicilina pelo método iodométrico¹¹⁰.

Preparo das amostras:

Pesou-se uma quantidade de amostra (pó) equivalente a 125 mg de ampicilina anidra e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água destilada e agitou-se em banho de ultrassom por 30 minutos. Dessa solução, tomou-se uma alíquota de 2 mL, transferiu-se para frasco de iodo de 125 mL, e procedeu-se da seguinte maneira: adicionaram-se 2 mL de NaOH 1N, agitou-se e, em seguida, manteve-se em repouso por 15 minutos. Acrescentou-se, então, 3 mL de HCl 1N e 10 mL de solução de iodo 0,01N (SV), agitou-se e deixou-se em repouso por 15 minutos, ao abrigo da luz. Após o repouso, titulou-se com solução de tiossulfato de sódio 0,01N (SV), utilizando-se pasta de amido (I) como indicador, adicionado próximo ao ponto de viragem.

Foram preparadas três réplicas para cada amostra e três para o branco, preparado de maneira similar às amostras, sem, entretanto, incluir a hidrólise alcalina, sendo, então, os resultados calculados pelas médias dos valores determinados.

Preparo do padrão:

Pesaram-se exatamente 62,5 mg de ampicilina anidra (substância química de referência), dissolveram-se com água, em balão volumétrico, completando-se o volume final para 50 mL com água destilada. Agitou-se em banho de ultrassom por 15 minutos e pipetou-se uma alíquota de 2 mL dessa solução, transferindo-se para frasco de iodo. Procedeu-se da mesma forma como nas amostras.

Foram preparadas três réplicas para cada amostra e os resultados foram calculados pelas médias dos valores determinados.

4.1.1.5.2 Determinação espectrofotométrica da ampicilina a 320 nm ¹⁹.

Preparo das amostras:

Pesou-se uma quantidade de amostra (pó) equivalente a 250 mg de ampicilina anidra e transferiu-se para balão volumétrico de 250 mL com água destilada. Completou-se o volume com água destilada e agitou-se em banho de ultrassom por 30 minutos. Filtrou-se a solução em papel quantitativo faixa azul, desprezando-se os primeiros 10 mL de filtrado. Tomou-se uma alíquota de 2 mL do filtrado e diluiu-se em balão volumétrico para 100 mL com solução tampão fosfato/sulfato de cobre de pH 5,2. Dessa solução, transferiram-se 10 mL para tubo de ensaio, aqueceu-se em banho-maria a 75° C por 30 minutos, esfriando-se, em seguida, em banho de gelo. Após atingir a temperatura ambiente, as leituras foram feitas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 320 nm.

Foram preparadas três réplicas de cada amostra para análise e o resultado foi calculado em função da média dos valores determinados.

Preparo do padrão:

Pesaram-se exatamente cerca de 100 mg de ampicilina anidra (substância química de referência), dissolveram-se com água em balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água destilada. Agitou-se em banho de ultrassom por 30 minutos. Dessa solução, tomou-se uma alíquota de 2 mL e diluiu-se em balão volumétrico para 100 mL, com solução tampão fosfato/sulfato de cobre de pH 5,2. Em seguida, procedeu-se da mesma forma que para as amostras.

4.1.1.5.3 Peso médio: USP 23 ed. ¹⁰⁶, e Farm. Bras. 2 ed. ³⁵.

4.1.1.5.4 Tempo de desagregação: Farmacopéia Britânica 1993 ²⁰, e Farm. Bras. 2 ed. ³⁵.

4.1.1.5.5 Uniformidade de conteúdo: USP 23 ed. ¹¹⁰.

4.1.1.5.6 Determinação da quantidade de fármaco dissolvida e da cinética de dissolução: USP 22 ed. ¹⁰⁹ e Farmacopéia Britânica 1968 ¹⁹.

Condições de dissolução:

-Meio: 900 mL de água desaerada, a 37° C

-Aparelho 1 (cesta): 100 rpm

-Tempo total do ensaio: 45 minutos

Procedimento: alíquotas de 10 mL foram retiradas nos tempos: 1, 5, 10, 20, 30 e 45 minutos e o meio foi, a cada tomada de ensaio, repostado com água destilada a 37 ° C. Após a coleta, as amostras foram filtradas e 2,0 mL de cada filtrado foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se com solução tampão de sulfato de cobre pH 5,2 e prosseguiu-se conforme determinação espectrofotométrica da ampicilina a 320 nm, descrita em 4.1.1.5.2. Esse tratamento foi repetido para três cápsulas. No caso da suspensão oral, a amostra de pó para reconstituição, calculada para conter 500 mg, foi encapsulada e então colocada no interior da cesta (aparelho 1) e tratada conforme o procedimento dado às cápsulas. Cada determinação foi acompanhada da análise simultânea de solução padrão, preparada conforme 4.1.1.5.2, que sofreu o mesmo tratamento dado às amostras.

4.1.1.5.7 Outros ensaios

Para a suspensão oral foram realizados os ensaios de pH, após reconstituição e teor de umidade pelo método Karl Fischer. Para a forma de cápsulas, determinou-se o teor de umidade pelo mesmo método.

4.1.2 ETAPA B: Validação da metodologia analítica empregada nos ensaios *in vivo* e ensaio piloto *in vivo*

4.1.2.1 Amostras

No ensaio piloto, o produto administrado aos voluntários foi Binotal® 500mg (Bayer do Brasil), sob a forma comprimidos.

4.1.2.2 Padrão

Ampicilina anidra, substância química de referência, potência de 993,71 µg/mg, código 01.0058-6, lote 4901, de 04/12/93, fornecida por EMS Indústria Farmacêutica Ltda, conservada em dessecador, sob refrigeração, até o momento do uso.

4.1.2.3 Reagentes

Solução tampão fosfato/sulfato de cobre de pH 5,2 ^{19, 95}.

Todos os reagentes empregados na preparação das soluções foram de grau analítico de pureza.

4.1.2.4 Equipamentos

Balança analítica E.METTLER - Zürich, type H15.

pH-metro TECNAL DIGIMED, TE 901

Espectrofotômetro ultravioleta/visível, INCIBRÁS, Modelo MF 200, série 029098.

Ultrassom THORNTON, modelo T-14

4.1.2.5 Construção da reta de calibração

Soluções padrão foram preparadas com substância química de referência em solução tampão fosfato/sulfato de cobre, de pH 5,2, para conter as seguintes concentrações de ampicilina anidra: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0; 22,5 e 25,0 µg/mL. Triplicatas de cada solução foram submetidas à determinação espectrofotométrica da ampicilina a 320 nm, após aquecimento a 75° durante 30 minutos e posterior resfriamento, em banho de gelo, para temperatura ambiente. Uma determinação em branco, para cada concentração, foi realizada com a leitura das soluções a 320 nm sem aquecimento. O aparelho foi zerado com solução tampão fosfato/sulfato de cobre. A reta de calibração foi construída plotando as concentrações teóricas de ampicilina anidra contra as absorbâncias correspondentes. A equação da reta foi calculada.

4.1.2.6 Teste para verificar a presença de interferentes

Amostras de 1 a 4 mL de urina de três voluntários foram diluídas para 50 mL com solução tampão fosfato/sulfato de cobre de pH 5,2. Porções de 10 mL das soluções resultantes foram submetidas ao método espectrofotométrico em estudo. A absorbância foi determinada a frio e após aquecimento a 75° por trinta minutos e posterior resfriamento, em banho de gelo, à temperatura ambiente. Cada determinação foi repetida três vezes. Em paralelo, foram determinadas as absorbâncias de soluções de ampicilina em urina preparadas conforme o descrito em 4.1.2.7, para verificar a interferência da ampicilina na leitura do branco.

4.1.2.7 Teste de recuperação da ampicilina em urina e da estabilidade das soluções

Quantidades de 100 mg de ampicilina foram dissolvidas e diluídas para 100 mL em amostras de urina de três voluntários. A partir dessas soluções foram feitas diluições em solução tampão fosfato/sulfato de cobre pH 5,2 para conter concentrações teóricas finais de 5, 10, 15 e 20 µg/mL de ampicilina sendo lidas imediatamente a 320 nm (branco). Duas alíquotas de 10 mL de cada solução foram submetidas a aquecimento a 75° por trinta minutos e posterior resfriamento, em banho de gelo, à temperatura ambiente, com posterior leitura no mesmo comprimento de onda.

As leituras de absorbância a 320 nm das amostras de urina adicionadas de solução padrão de ampicilina mantidas à temperatura ambiente e após aquecimento a 75° por trinta minutos foram repetidas após uma e duas horas.

4.1.2.8 Ensaio piloto in vivo

A padronização do método espectrofotométrico foi executada através de um ensaio piloto do teste *in vivo*, em dois voluntários sadios (V_A e V_B), que permaneceram sem ingerir qualquer tipo de medicamento uma semana antes da realização do experimento. Ambos foram submetidos a um período de 12 horas de jejum. Após esse período e, imediatamente antes do ensaio, foi colhida a primeira amostra de urina, que foi considerada como branco para verificar a possível presença de interferentes na determinação de ampicilina na urina (primeira coleta: tempo zero).

Em seguida, foi administrada aos voluntários uma dose equivalente a 500 mg de ampicilina (um comprimido) com 200 mL de água filtrada. De hora em hora, foram colhidas as amostras de urina, durante o período de 4 horas. Sempre após a cada coleta de urina, o voluntário ingeria 200 mL de água filtrada para estimular a diurese. Se mais de uma coleta fosse realizada num período de 1 hora, ao final dessa hora, os volumes de urina eram

reunidos, sendo considerado o volume total. Para cada amostra foram determinados o volume e o pH correspondentes.

Após colhidas, todas as amostras de urina passaram pelo seguinte tratamento: duas porções de 2 mL foram diluídas em balão volumétrico para 50 mL ou 100 mL, com solução tampão fosfato/sulfato de cobre de pH 5,2. De cada solução resultante, tomaram-se 3 alíquotas de 10 mL: as duas primeiras foram aquecidas em banho-maria a 75° C por 30 min enquanto a terceira foi lida imediatamente. Em seguida, as amostras aquecidas foram resfriadas, em banho de gelo, à temperatura ambiente. As absorbâncias foram determinadas no comprimento de onda de 320 nm. As soluções do padrão sofreram o mesmo tratamento. Como padrão, foram utilizadas soluções contendo 10 ou 20 µg/mL de ampicilina anidra, preparadas como se segue:

Preparo das soluções do padrão contendo 10 e 20 µg/mL

Pesaram-se exatamente duas alíquotas de cerca de 50 mg de ampicilina anidra e diluíram-se em balão volumétrico para 50 e 100 mL com água destilada. Agitaram-se as soluções em ultrassom por 15 minutos. Uma alíquota de 2 mL de cada balão foi transferida para outro balão volumétrico de 100 mL e diluída ao volume com solução tampão fosfato/sulfato de cobre pH 5,2.

O experimento foi realizado no mesmo dia da coleta das amostras de urina, e as leituras efetuadas num período de até uma hora após aquecimento, uma vez que, em solução, a ampicilina sofre rápida degradação.

4.1.3 ETAPA C: Determinação da bioequivalência dos produtos

4.1.3.1 Amostras

Cápsulas contendo 500 mg de ampicilina, na forma triidratada, Laboratório A (referência) e Laboratório B, lote 2 (produto-teste);

Pó para suspensão oral extemporânea, contendo 250 mg/5 mL de ampicilina na forma triidratada, Laboratório A (referência), Laboratório B (produto-teste).

4.1.3.2 Planejamento estatístico

O estudo foi do tipo dose única, cruzado e aleatório, segundo as normas do FDA-USA, comparando cada forma farmacêutica com o produto-referência, contendo a mesma dosagem de ampicilina. O ensaio *in vivo* foi realizado com 16 e 15 voluntários sadios, para cápsulas e suspensão, respectivamente, de ambos os sexos (7 homens e 9 mulheres), com idades variando de 21 a 26 anos (média de 23 anos) e peso entre 48 e 105 Kg (média de 68,2 Kg).

Todos os produtos foram administrados a todos os voluntários, em duas etapas, sendo que cada etapa foi constituída por duas fases ou períodos. Em cada fase, 50% dos voluntários recebeu o produto teste e os restantes 50%, o produto-referência (grupos I e II), como indicado a seguir:

Etapa 1:

Fase I: Foram administrados, a 50% dos voluntários, cápsulas do Laboratório A (Grupo I) e, aos restantes 50% (Grupo II), cápsulas do Laboratório B.

Fase II: Aos voluntários que na primeira fase receberam cápsulas do Laboratório A, foram administradas cápsulas do Laboratório B, e vice-e-versa.

Etapa 2:

Fase I: Foi adotado o mesmo procedimento da Fase I na Etapa A, porém administrando a forma farmacêutica de suspensão oral.

Fase II: Foi adotado o mesmo procedimento que da Fase II na Etapa B, porém administrando a forma farmacêutica suspensão oral.

Entre uma fase e outra houve um intervalo de 48 horas, destinado à eliminação completa da ampicilina do organismo (período de *wash out*).

O planejamento estatístico da administração dos produtos, conforme as fases, está apresentado no **Quadro 3**.

Quadro 3. Planejamento estatístico empregado para administração dos produtos.

Fase	VOLUNTÁRIO															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
I	A	A	B	B	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	B	B
II	B	B	A	A	B	A	A	B	B	A	B	A	B	B	A	A
I	A	B	A	B	A	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	A
II	B	A	B	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	B	B

A = produtoreferência, B = produto teste

4.1.3.3 Seleção dos voluntários para o estudo de biodisponibilidade: critérios de inclusão e exclusão.

Considerando as recomendações do Food and Drug Administration, da Farmacopéia Americana 23. ed. ¹¹⁰ e, consultando outros estudos de biodisponibilidade e bioequivalência da literatura ^{2, 51, 52, 70, 117}, foram estabelecidos os critérios de inclusão e exclusão de voluntários, bem como os procedimentos gerais na realização dos ensaios.

Critérios de inclusão:

1. Apresentar bom estado de saúde, idade entre 18 e 35 anos e peso dentro do ideal $\pm$ 10%.
2. Não apresentar patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, hepáticas, pulmonares, neurológicas, psiquiátricas, hematológicas ou metabólicas.
3. Não apresentar antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos.
4. Não estar tomando medicamentos.
5. Não ingerir medicamentos uma semana antes do estudo ou durante sua realização.
6. Não ingerir bebidas alcoólicas 48 horas antes do ensaio e durante sua realização.
7. Não fumar e não ingerir café, chá ou outras bebidas xânticas durante o ensaio.
8. A participação de voluntários do sexo feminino deve estar condicionada a que não estejam em estado de gravidez ou em período de amamentação.
9. Estar disponível para participar de todas as fases do estudo.

Critérios de exclusão

1. Ter participado de outro estudo como voluntário nos últimos três meses.
2. Fumar 20 ou mais cigarros por dia.
3. Antecedentes de abuso de álcool ou drogas.
4. Consumo regular de álcool (dois copos de cerveja ou quatro cálices de vinho por dia).

A seleção dos voluntários foi efetuada segundo os critérios de inclusão e exclusão e, com base nos resultados de exames clínicos e laboratoriais, realizados pela Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário, os quais incluíam: exame hematológico, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), uréia, creatinina, urina tipo I e teste de gravidez (Pregnosticon) para os voluntários do sexo feminino.

Os indivíduos selecionados para o estudo foram informados de todas as condições do experimento, dando seu consentimento por escrito para participação.

4.1.3.4 Protocolo do teste de bioequivalência

No dia dos ensaios, os voluntários apresentaram-se na Divisão de Clínica Médica (DCM) do Hospital Universitário às 7:00 horas, estando em jejum nas últimas doze horas. Imediatamente antes da administração dos medicamentos, os voluntários esvaziaram a bexiga e um volume de 50 mL de urina foi separado para medida do pH e para ser utilizado como branco no ensaio analítico. Outra amostra de mesmo volume foi congelada para contra-prova.

A administração dos produtos foi efetuada às 7:30 horas, com a ingestão subsequente de 200 mL de água.

A coleta de urina foi realizada no período de 12 horas após administração, nos seguintes tempos: 0 (branco), 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas.

Foi coletada toda a urina de cada período, sem perdas, seguida de ingestão de 200 mL de água ou suco de laranja, após cada coleta.

Após 4 horas da administração (11:30), foi servido almoço padronizado.

Após o almoço, o voluntário pode optar entre suco de laranja ou água (200 mL).

Após 8:30 horas da administração (às 16:00 hs), foi servido lanche padronizado.

O Protocolo do Ensaio *In Vivo* foi previamente aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Universitário - USP.

4.1.3.5 Determinação quantitativa da ampicilina nas amostras de urina

4.1.3.5.1 Substância padrão de referência

Ampicilina anidra, potência 993,71 µg/mg, QUIMIS código 01.0058-6, lote 4901, de 04/12/93, fornecida pelo laboratório EMS Indústria Farmacêutica Ltda.

4.1.3.5.2 Reagentes

Solução tampão de sulfato de cobre de pH 5,2 ¹⁹.

Todos os reagentes empregados na preparação das soluções foram de grau analítico de pureza.

4.1.3.5.3 Método de análise

A técnica analítica empregada na determinação da ampicilina na urina foi baseada no método espectrofotométrico descrito por SMITH e col. ⁹⁵, através do qual a ampicilina inalterada é degradada a 75°C, em presença de cobre, em pH 5,2, resultando em um composto cuja absorbância é detectada a 320 nm. Este método foi correlacionado com o microbiológico por ALI e col. ⁷, tendo sido validado, para determinação da ampicilina em amostras de urina, através do ensaio piloto *in vivo*.

As diluições das amostras de urina foram ajustadas conforme as leituras obtidas, fixando-se a faixa ótima de absorbância entre 0,2 e 0,8. As soluções do padrão de leitura foram preparadas para conter entre 10 a 20µg/mL. Todas as diluições foram efetuadas com solução tampão de sulfato de cobre, pH 5,2.

4.1.3.5.4 Cálculo da quantidade de ampicilina

As quantidades de ampicilina excretadas na urina (X_u) foram determinadas para cada intervalo de amostragem, empregando-se a seguinte fórmula:

$$X_u = \frac{A_{(amostra)} \cdot m_{(padrão)} \cdot P_{(padrão)} \cdot V_{(urina)}}{A_{(padrão)} \cdot TE_{(amostra)} \cdot D_{(amostra)}}$$

onde:

A = absorbância lida

m = massa

P = potência

D = diluições

V = volume

4.1.4 ETAPA D: Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos e avaliação estatística dos resultados

4.1.4.1 Métodos empregados

A análise estatística realizada na comparação das médias dos parâmetros estudados constituiu-se da aplicação dos testes paramétrico (teste t) e não paramétrico (teste de Mann-Whitney), além da análise de variância (ANOVA) para comprovar, ou não, a bioequivalência das amostras em relação aos respectivos produtos de referência, de acordo com o critério estabelecido pelo *Food and Drug Administration, Division of Bioequivalence* - FDA-USA ²⁸.

Construiu-se também o intervalo de confiança para a razão das médias dos parâmetros farmacocinéticos derivados da administração dos produtos-teste e produtos-referência.

Foram determinados os seguintes parâmetro farmacocinéticos:

4.1.4.1.1 Quantidade de ampicilina excretada como inalterada na urina (X_u)

Construiu-se a curva de excreção urinária acumulada *versus* tempo, a partir dos valores médios obtidos após administração de cada produto.

4.1.4.1.2 Constantes de velocidade de eliminação total (K) e de excreção urinária (k_u)

Calculados a partir das curvas dos logaritmos das quantidades de ampicilina recuperadas na urina *versus* os tempos médios de eliminação, empregando cálculo de regressão linear.

4.1.4.1.3 Cálculo da meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$)

De acordo com o modelo farmacocinético de um compartimento com absorção de cinética de primeira ordem, foram calculados, conforme RITCHEL ⁸⁸ e MUSCARÁ & DE NUCCI ⁷⁸, os valores de meia-vida de eliminação, a partir dos dados de K , pela expressão, a seguir:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K}$$

4.1.4.1.4 Velocidade máxima de eliminação ($V_{máx.}$) e tempo no qual ocorreu a $V_{máx.}$

A velocidade máxima de eliminação foi obtida graficamente, a partir dos valores das quantidades de ampicilina eliminadas nos intervalos de tempo médio.

No presente estudo, considerou-se a relação entre a excreção urinária e a absorção da ampicilina, adotando-se o X_u acumulado como parâmetro fundamental, uma vez que reflete a quantidade efetivamente absorvida ^{25, 59, 60}.

5 RESULTADOS

5.1 ETAPA A: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FARMACÊUTICA *IN VITRO*

Os resultados de peso médio, pH e doseamento das amostras de pó para suspensão oral, podem ser observados na **Tabela 2**. A **Tabela 3** apresenta os dados obtidos na análise dos diversos lotes de cápsulas, referentes a peso médio, tempo de desintegração e doseamento de ampicilina. Todos os valores de quantidade de ampicilina encontrados estão expressos em miligramas de ampicilina anidra.

Na **Tabela 4**, estão resumidos os resultados obtidos nos ensaios de uniformidade dos produtos sob a forma de cápsulas. Na **Tabela 5** são apresentados os resultados do teste de umidade. A dissolução foi estudada em ambas as formas farmacêuticas, quantificando-se a porcentagem de ampicilina dissolvida em 45 minutos, no pó para suspensão oral e, para as cápsulas, determinou-se a cinética de dissolução nesse mesmo tempo, que é o especificado na Farmacopéia Americana ¹⁰⁷. As **Figuras 4 e 5** ilustram o perfil de dissolução das cápsulas e os resultados comparativos de dissolução a partir do pó das suspensões orais, respectivamente. Na **Tabela 6** está apresentado o resumo da análise estatística (ANOVA, método das Mínimas Diferenças Significativas) dos resultados da cinética e do teste de dissolução para cápsulas e suspensão.

Tabela 2. Resultados dos testes físicos e físico-químicos das amostras de suspensão oral.

Amostras	**pH	Peso médio (mg/frasco)	*Doseamento Iodométrico	
			(mg/5mL)	(%)
Laboratório A	5,60	51,94 ($\pm 0,65\%$)	244,13	97,65
Laboratório B	5,90	10,31 ($\pm 0,22\%$)	256,83	102,73
Laboratório D	4,60	7,08 ($\pm 0,07\%$)	246,35	98,54

*Média de 3 determinações. **Limite especificado após reconstituição, 5,0 a 7,5 (USP 23 ed. ¹⁰⁸). Os valores entre parênteses são os intervalos de confiança da média calculados a partir de 20 determinações ($\alpha=0,05$).

Tabela 3. Resultados dos testes físico-químicos das cápsulas de ampicilina

Amostras	Peso médio (mg/cáps)	Desintegração (min)	*Doseamento Iodométrico (mg/cáps)	(%)
Lab. A	610,00 ($\pm 0,73\%$)	9,50	547,76	109,55
Lab. B - lote 1	491,00 ($\pm 2,65\%$)	9,30	487,13	97,43
Lab. B - lote 2	568,80 ($\pm 0,01\%$)	7,50	529,83	105,97

*Média de três determinações. Os valores entre parênteses são os intervalos de confiança da média calculados a partir de 20 determinações ($\alpha=0,05$).

Tabela 4. Resultados dos testes de uniformidade de conteúdo das cápsulas

Amostra	Laboratório A		Laboratório B lote 1		Laboratório B lote 2	
	(mg/cáps)	(%)	(mg/cáps)	(%)	(mg/cáps)	(%)
Média	529,00	105,80	495,51	99,10	529,83	105,97
S _R (%)	5,20		4,10		2,10	

Média de 10 determinações. S_R, desvio padrão relativo.

Tabela 5: Resultados dos testes de determinação de umidade nas amostras estudadas. Método de Karl-Fischer.

Amostra	Laboratório	Umidade (%)
Cápsulas	A	1,03
	B (lote 1)	0,20
	B (lote 2)	0,34
Suspensão oral	A	0,16
	B	*5,50
	D	1,72

Média de 10 determinações. *Acima do especificado na USP 23 ed.¹⁰⁸ (máximo 5,0%)

Figura 4. Cinética de dissolução de três lotes de cápsulas de ampicilina de 500 mg provenientes dos Laboratórios A e B. As linhas verticais representam os desvios padrão (médias de 3 determinações).

Tabela 6. Análise estatística dos resultados da cinética de dissolução das amostras de cápsulas (área sob a curva) dos Laboratórios A e B (lotes 1 e 2) e do teste de dissolução das suspensões dos Laboratórios A, B e D. Teste LSD (Mínima Diferença Significativa).

Diferenças das médias			
^a Cápsulas		^b Suspensão	
A-B1	*3282	A-B	*5,45
A-B2	344	A-D	*5,52
B1-B2	*3626	B-D	0,07

*Valores significativos; ^a (N= 3; t= 1,94, LSD= 1830); ^b (N= 6, t= 1,75, LSD= 1,86); $\alpha=0,05$.

Figura 5. Resultados do teste de dissolução das amostras de pó para suspensão oral contendo ampicilina, dos Laboratórios A (CV= 4,78), B (CV= 4,01) e D (CV= 1,36). Médias de 6 determinações; CV=coeficiente de variação.

5.2 ETAPA B: VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA EMPREGADA NOS ENSAIOS *IN VIVO*

A reta de calibração apresentada na **Figura 6** foi construída com os resultados obtidos na análise das soluções padrão de ampicilina apresentados na **Tabela 7**. A análise de regressão correspondente está ilustrada na **Tabela 8**.

Tabela 7. Resultados das leituras de absorbância a 320 nm, de soluções padrão contendo ampicilina em tampão de fosfato/sulfato de cobre de pH 5,2, após reação a 75° por 30 minutos.

Concentração de ampicilina (µg/mL)	Absorbância a 320 nm
5,0	0,139
7,5	0,220
10,0	0,322
12,5	0,414
15,0	0,512
17,5	0,610
20,0	0,712
22,5	0,807
25,0	0,906

Tabela 8. Análise de regressão dos dados da Tabela 7.

a	b	Se_R	r
-0,07264	0,0391	0,483	0,9999

Equação da reta: $y = a + bx$, em que a = intercepto e b = coeficiente angular; Se_R = erro padrão da estimativa relativo; r = coeficiente de correlação.

Para verificar a presença de possíveis interferentes, foram obtidos os resultados da **Tabela 9**, que apresenta diferentes diluições de amostras de urina submetidas à determinação espectrofotométrica com e sem aquecimento a 75°C. Na **Tabela 10** podem ser observados os resultados referentes ao teste de recuperação da ampicilina nas amostras de urina acrescidas de quantidades de 5 a 20 µg/mL de ampicilina. Para estudar a estabilidade da ampicilina na

solução tampão de fosfato/sulfato de cobre de pH 5,2, são apresentados na **Tabela 11** os resultados das mesmas soluções do teste de recuperação, porém, com leituras realizadas uma hora após o seu preparo. Para verificar se havia decomposição significativa da ampicilina na urina no tempo decorrente entre a coleta das amostras e processamento analítico, separaram-se alíquotas da solução de urina contendo 20 µg/mL que foram mantidas à temperatura ambiente por uma e duas horas, após as quais foi realizada a determinação quantitativa. A **Tabela 12** apresenta os resultados dessa análise. As leituras de absorbância devidas à presença de ampicilina, nas concentrações de 5 a 20 µg/mL, nas amostras em branco, variaram de 0,002 a 0,004, tanto nas soluções preparadas somente com tampão como naquelas contendo urina.

Tabela 9. Resultados da pesquisa de interferentes em amostras de urina diluídas para 50 mL com solução tampão fosfato/sulfato de cobre e posterior leitura de absorbância a 320 nm com (A) e sem aquecimento a 75°C por 30 minutos (B).

Volume de urina (mL)	Voluntário 1		Voluntário 2		Voluntário 3	
	A	B	A	B	A	B
1	0,134	0,123	0,112	0,111	0,070	0,068
2	0,240	0,230	0,181	0,180	0,139	0,137
3	0,311	0,310	0,227	0,229	0,193	0,196
4	0,468	0,468	0,401	0,396	0,227	0,216

Tabela 10. Resultados do teste de recuperação em amostras de urina diluídas em solução tampão de fosfato/sulfato de cobre de pH 5,2 e adicionadas de quantidades crescentes de padrão. Leituras a 320 nm, após reação a 75°C por 30 minutos.

Amostra	Quantidade adicionada (µg/mL)	*Quantidade recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)
1	5	5,70	114,5
2	10	10,19	101,9
3	15	15,28	101,9
4	20	19,94	99,7

* Média de três determinações.

Tabela 11. Resultados do teste de estabilidade das soluções contendo ampicilina em solução tampão fosfato/sulfato de cobre. Leituras das absorbâncias logo após o preparo das soluções com (A) e sem aquecimento a 75°C (B) e depois de uma hora.

Concentração de ampicilina (µg/mL)	Absorbância logo após preparo		Absorbância após uma hora	
	A	B	A	B
5	0,241	0,075	0,238	0,073
10	0,415	0,080	0,421	0,082
15	0,604	0,079	0,615	0,077
20	0,775	0,078	0,771	0,072

Tabela 12. Resultados do teste de estabilidade da ampicilina na urina. Leituras das absorbâncias logo após a coleta das amostras (tempo = 0), e após uma e duas horas à temperatura ambiente. O branco representa as amostras sem aquecimento.

Tempo (h)	Branco	Absorbância após aquecimento a 75°	Concentração (%)
0	0,074	0,613	97,64
1	0,078	0,775	96,40
2	0,071	0,779	97,92

Figura 6. Reta de calibração da ampicilina pelo método espectrofotométrico após reação em solução tampão fosfato/sulfato de cobre e leituras a 320 nm.

Os resultados referentes ao ensaio piloto *in vivo*, com os parâmetros de análise já estabelecidos, encontram-se relacionados na **Tabela 13**. A quantidade de ampicilina eliminada na urina (Q) foi calculada em miligramas de ampicilina anidra e dada pela expressão:

$$Q = \frac{A_{(amostra)} \cdot m_{(padrão)} \cdot p_{(padrão)} \cdot D_{(padrão)} \cdot V_{(urina)}}{A_{(padrão)} \cdot TE_{(amostra)} \cdot D_{(amostra)}}$$

onde:

$A_{(amostra)}$ = absorbância da amostra

$m_{(padrão)}$ = massa de padrão

$p_{(padrão)}$ = potência do padrão

$D_{(padrão)}$ = diluição da solução do padrão

$V_{(urina)}$ = volume de urina coletado

$A_{(padrão)}$ = absorbância do padrão

$TE_{(amostra)}$ = volume de urina empregado no preparo da amostra

$D_{(amostra)}$ = diluição da amostra de urina

Na **Figura 7** estão representadas as curvas de quantidade de ampicilina anidra (Q) excretada na urina dos voluntários A e B em função do tempo de coleta das amostras, de acordo com os parâmetros estabelecidos nos ensaios anteriores de reta de calibração e teste de recuperação.

Na **Tabela 14** e na **Figura 8** está apresentada a curva da da quantidade acumulada de ampicilina anidra ($Q_{acumulado}$) excretada na urina dos voluntários A e B.

Tabela 13. Resultados dos testes de pH, volume de urina coletado e quantidades de ampicilina (Q) na urina, determinadas no ensaio piloto *in vivo*.

Voluntário	Tempo	pH	Volume (mL)	Concentração (mg /mL)	Q (mg)
A	0	5,0	185	0,002	0,370
	1	5,0	35	1,304	45,640
	2	5,1	27	2,489	67,203
	3	5,1	35	1,594	55,790
	4	5,4	145	0,201	29,145
B	0	6,2	19	0,007	0,133
	1	5,7	135	0,641	86,535
	2	6,6	370	0,181	66,970
	3	6,5	265	0,111	29,415
	4	6,1	72	0,721	51,912

Tabela 14. Quantidades de ampicilina anidra acumuladas ($Q_{acumulado}$) na urina dos voluntários A e B, determinadas no ensaio piloto *in vivo*.

Tempo (hs)	$Q_{acumulado}$ Vol.A	$Q_{acumulado}$ Vol.B
0	0,37	0,13
1	46,01	86,67
2	113,21	153,64
3	169,00	183,05
4	198,15	234,97

*Média de três determinações

Figura 7. Quantidades de ampicilina anidra (Q) excretadas na urina dos voluntários A e B em função do tempo, obtidas no ensaio piloto *in vivo*.

Figura 8. Quantidades acumuladas de ampicilina anidra ($Q_{acumulado}$), determinadas na urina dos voluntários A e B, no ensaio piloto *in vivo*.

5.3 ETAPA C: DETERMINAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA DOS PRODUTOS

Para cada voluntário foram determinadas as quantidades de ampicilina (X_u) excretadas nos intervalos de coleta de urina e a quantidade total recuperada do antibiótico ($X_{uacumul}$). A partir desses resultados, foram calculadas as velocidades de excreção urinária ($\Delta X_u / \Delta t$) e os correspondentes $\log \Delta X_u / \Delta t$ versus o tempo médio (t_m).

As velocidades máximas de excreção urinária ($V_{máx}$) e os respectivos tempos ($t_{máx}$) onde foram determinadas são apresentados nas **Tabelas de 15 e 16**.

Nas **Tabelas de 17 a 20**, podem ser observados os valores de $\log \Delta X_u / \Delta t$ versus o tempo médio (t_m), das Fases I e II (produtos dos Laboratórios A e B), obtidos a partir das cápsulas e suspensões. Nas **Tabelas 21 e 22**, esses resultados estão resumidos com as médias de $\log \Delta X_u / \Delta t$ versus o tempo médio (t_m); também são apresentadas as médias das velocidades de excreção de ampicilina nos mesmos intervalos de tempo.

Nas **Tabelas de 23 a 26**, estão resumidos os resultados das determinações de ampicilina na urina dos voluntários, expressos em quantidade acumulada de ampicilina ($X_{uacumul}$) no período de tempo do experimento. As curvas de excreção urinária das amostras de cápsulas e suspensões contendo ampicilina, representada pelos logaritmos das velocidades de excreção urinária da porção não metabolizada, em função do tempo médio de coleta das amostras estão apresentadas nas **Figuras 9 e 10**. Em cada figura estão representadas as curvas obtidas para cada forma farmacêutica, comparando os produtos teste e referência. Todos os resultados representam a média dos valores obtidos dos voluntários de cada experimento (16 para cápsulas e 15 para suspensão).

A **Tabela 27** apresenta o resumo dos parâmetros farmacocinéticos calculados, ou seja, a média e desvios padrão dos valores das quantidades acumuladas de ampicilina ($X_{uacumul}$), das velocidades máximas de excreção ($V_{máx}$) e respectivos tempos ($t_{máx}$), das constantes de velocidade de eliminação (K) e de excreção renal (ke) e da meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) calculada a partir dos resultados de K .

Nas **Figuras 11 e 12** podem ser comparadas as curvas correspondentes às quantidades acumuladas de ampicilina ($X_{uacumul}$) obtidas após administração das formas farmacêuticas cápsula e suspensão, do produto de referência (A) e do produto testado (B).

Tabela 15. Velocidades máximas de excreção urinária ($V_{m\acute{a}x}$) e tempos correspondentes ($t_{m\acute{a}x}$) determinados após administração dos produtos dos Laboratórios A e B, na forma de cápsulas, aos voluntários nas Fases I e II do estudo.

Voluntário	Laboratório A			Laboratório B		
	Fase	$V_{m\acute{a}x}$ (mg h ⁻¹)	$t_{m\acute{a}x}$ (h)	Fase	$V_{m\acute{a}x}$ (mg h ⁻¹)	$t_{m\acute{a}x}$ (h)
1	I	57,24	3,0	II	48,83	3,0
2	I	74,62	3,0	II	190,31	3,0
3	II	75,32	5,0	I	62,07	3,0
4	II	62,91	3,0	I	60,69	3,0
5	I	87,76	1,5	II	115,37	1,5
6	II	72,01	3,0	I	104,46	1,5
7	II	65,31	3,0	I	80,80	1,5
8	I	83,60	1,5	II	62,93	3,0
9	I	66,75	1,5	II	55,59	1,5
10	II	69,99	5,0	I	63,00	3,0
11	I	56,86	3,0	II	69,76	3,0
12	II	130,18	3,0	I	70,88	3,0
13	I	61,74	3,0	II	78,86	5,0
14	I	94,92	1,5	II	161,81	1,5
15	II	48,58	3,0	I	45,15	1,5
16	II	47,62	3,0	I	60,69	3,0
Médias		72,21	2,9		83,20	2,6
Desvios		20,27	1,1		40,96	1,0

Tabela 16. Velocidades máximas de excreção urinária ($V_{m\acute{a}x}$) e tempos correspondentes ($t_{m\acute{a}x}$) determinados após administração dos produtos dos Laboratórios A e B, na forma de suspensão, aos voluntários nas Fases I e II do estudo.

Voluntário	Laboratório A			Laboratório B		
	Fase	$V_{m\acute{a}x}$ (mg h ⁻¹)	$t_{m\acute{a}x}$ (h)	Fase	$V_{m\acute{a}x}$ (mg h ⁻¹)	$t_{m\acute{a}x}$ (h)
1	I	45,80	1,5	II	48,55	1,5
2	II	111,57	3,0	I	118,11	1,5
3	I	55,87	1,5	II	58,80	1,5
4	II	77,39	1,5	I	90,58	1,5
5	I	117,83	1,5	II	150,06	1,5
6	II	82,57	1,5	I	89,24	1,5
7	II	70,39	1,5	I	67,74	1,5
8	I	132,89	1,5	II	110,96	1,5
9	II	64,49	1,5	I	117,02	1,5
10	I	90,63	1,5	II	93,35	1,5
12	II	68,38	1,5	I	65,26	1,5
13	II	116,94	1,5	I	88,63	1,5
14	II	54,74	1,5	I	66,66	1,5
15	I	57,59	1,5	II	46,33	1,5
16	I	75,39	1,5	II	65,68	1,5
Médias		81,50	1,6		85,13	1,5
Desvios		26,81	0,4		29,36	0,0

Tabela 17. Valores de $\log \Delta Xu/\Delta t$ em função do tempo médio (tm) de coleta de urina dos voluntários (V), após administração do produto do Laboratório A, na forma de cápsulas, nas fases I e II do estudo.

Laboratório A																
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16
tm (h)	Fase I	Fase I	Fase II	Fase II	Fase I	Fase II	Fase II	Fase I	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase I	Fase II	Fase II
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	0,092694	0,143615	-0,25029	0,642405	1,256067	1,539443	1,103298	0,700358	0	0,329568	1,303775	0,828891	0,179843	1,909785	0,906847	0,702646
1,5	1,132369	1,49183	1,215815	1,533613	2,062103	2,018941	1,907387	1,790532	1,745034	1,441579	0	1,780243	1,208902	2,208993	1,65463	1,725613
3,0	1,688715	2,279469	1,792859	1,783133	1,927766	1,716485	1,64819	1,798845	1,643736	1,799346	1,843592	1,891443	1,724588	1,971977	1,54399	1,783133
5,0	1,341784	1,988377	1,508984	1,589323	1,172925	0,347567	1,237841	1,706017	1,319302	1,537667	1,101908	1,269502	1,896837	1,104302	0,962365	1,122584
7,0	0,888197	1,316225	1,126976	0,965125	1,060027	0,616953	0,792566	1,124239	0,643271	0,871349	-1,00581	-0,01915	0,95173	0,354217	0,608628	0,749709
9,0	0,689711	0,53402	0,75275	0,762004	0,68521	0,568541	0,595812	0,441836	0,877096	0,622415	0	0,610856	-0,03295	0	0,586683	0,493684
11,0	0,514216	0,359357	0,598771	0,571912	0,760577	0,570319	0,633256	0,467364	0,55379	0,557352	0,244703	0,679818	0,556322	0,459885	0,577052	0,468749

Tabela 18. Valores de $\log \Delta Xu/\Delta t$ em função do tempo médio (tm) de coleta de urina dos voluntários (V), após administração do produto do Laboratório B, na forma de cápsulas, nas Fases I e II do estudo.

Laboratório B																
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16
tm (h)	Fase II	Fase II	Fase II	Fase II	Fase II	Fase I	Fase I	Fase II	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase II	Fase I	Fase I
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	0,035813	-0,67862	-1,55819	0,271401	1,269396	0,216058	0,712673	0,892893	1,004884	1,748697	0,653459	0,383241	1,084489	1,05934	0,853866	1,022115
1,5	1,525772	1,459209	0,555781	1,151474	1,943285	1,156937	0	1,922202	1,824467	0	1,571117	1,651164	1,882579	1,97736	1,408626	1,643456
3,0	1,757688	1,872872	1,649796	1,79869	1,809743	1,857397	1,814953	1,859206	1,40617	1,526829	1,754844	2,114559	1,790542	1,630716	1,686482	1,677775
5,0	0,966642	1,66564	1,876924	1,652799	1,33938	1,687133	1,788402	-0,14524	1,310512	1,845028	1,281878	1,438397	1,234394	0,834744	1,145942	1,441262
7,0	0	1,154346	1,510625	1,133158	1,092998	1,083794	0,831482	0,82889	0,880825	1,198021	0,665451	0,893375	0,896623	0,298447	0,819104	0,751467
9,0	0,784922	0	1,011717	0,915403	1,045722	0,331669	0,657325	0,658629	0,872257	0	0,447503	0,500489	0,863511	-0,01538	0	0
11,0	0,602288	0,706422	0,697761	0,637999	0,776397	0,219986	0,580864	0,605736	0,671044	0,38898	0,274929	1,150649	0,877339	0,007258	0,061156	-0,06191

Tabela 19. Valores de $\log \Delta Xu/\Delta t$ em função do tempo médio (tm) de coleta de urina dos voluntários (V), após administração do produto do Laboratório A, na forma de suspensão, nas Fase I e II do estudo.

Laboratório A															
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V12	V13	V14	V15	V16
tm (h)	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase II	Fase II	Fase I	Fase I
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	1,294093	1,779271	1,376596	1,445013	1,655141	1,537581	1,480755	1,891864	1,484033	1,447019	1,470702	1,675566	1,055413	1,655399	1,657239
1,5	1,660874	1,946298	1,747224	1,88867	2,071233	1,916829	1,847541	2,123494	1,809513	1,957277	1,834883	2,06796	1,738326	1,760362	1,877332
3,0	1,548916	2,047556	1,615851	1,696314	1,65977	1,747508	1,732201	1,909826	1,589565	1,661649	1,813	1,732993	1,550918	1,541519	1,594151
5,0	1,118355	1,599898	0,327384	1,345764	1,09738	1,238598	1,224272	1,377511	1,112596	1,300496	1,079354	1,144056	0,808288	1,121231	0,97558
7,0	0	1,077928	0,884478	0,908867	1,124231	0,98036	0,957936	0,899223	0,633773	0,672876	1,097106	1,046806	0,600891	0,690136	1,152739
9,0	0,361185	0,29624	-0,02845	1,092329	1,068463	1,058264	1,20223	0,335124	0,536273	0,40134	-0,01474	1,013312	0,524291	0,395663	0,94071
11,0	0,488488	-0,02899	0,171902	0,911137	0,85304	0,926422	0,481223	0,541518	0,468175	-0,10494	0	0,6824	-0,06876	0,349905	0,643069

Tabela 20. Valores de $\log \Delta Xu/\Delta t$ em função do tempo médio (tm) de coleta de urina dos voluntários (V), após administração do produto do Laboratório B, na forma de suspensão, nas Fases I e II do estudo.

Laboratório B															
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V12	V13	V14	V15	V16
tm (h)	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase I	Fase I	Fase II	Fase II
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	1,382761	1,71022	1,349428	1,543647	1,676152	1,408278	1,164141	1,79616	1,532551	1,581676	0,779076	1,625065	1,367004	1,215292	1,579488
1,5	1,686211	2,072293	1,769349	1,957044	2,176265	1,950552	1,83082	2,045161	2,068274	1,97011	1,814672	1,947569	1,823883	1,665854	1,817456
3,0	1,580797	1,773474	1,543887	1,543958	1,566466	1,702884	1,643593	1,871246	1,705803	1,727588	1,680035	1,544724	1,53499	1,590639	1,580543
5,0	1,419516	1,401278	1,223261	1,173243	0	1,008694	1,245901	1,279446	1,202557	1,166038	1,042394	1,072998	0,824576	1,415548	0,920405
7,0	0,834487	0,737132	0,912527	0,874052	1,240032	0,67455	0,762986	0,711378	0,9146	0,522058	0,831123	0,795402	0,811075	1,14357	0,614468
9,0	1,357217	0	0,914262	1,004902	1,054249	-0,1102	0,816482	0,724343	0,322158	0,642188	-0,08914	0,798873	-0,03439	0,88692	0,524037
11,0	1,057138	-0,55574	0,869969	0,855206	0,90564	0,086946	0,428072	0,581542	0,137639	0,331797	0,61407	0,570482	0,185095	1,125794	0,331164

Tabela 21. Valores das velocidades de excreção urinária e de $\log \Delta Xu / \Delta t$ em função do tempo médio de coleta (tm), após a administração dos produtos dos laboratórios A (produto-referência) e B (produto-teste), na forma de cápsulas.

tm (h)	Laboratório A		Laboratório B	
	Velocidade (mg h ⁻¹)	$\log \Delta Xu / \Delta t$	Velocidade (mg h ⁻¹)	$\log \Delta Xu / \Delta t$
0,0	-	0	-	0
0,5	3,64	0,5607	5,15	0,7118
1,5	22,63	1,3546	36,08	1,5573
3,0	56,30	1,7505	63,43	1,8023
5,0	21,64	1,3352	21,16	1,3255
7,0	7,54	0,8774	4,90	0,6903
9,0	3,20	0,5046	3,25	0,5117
11,0	3,25	0,5123	3,43	0,5358

Média de 16 voluntários

Tabela 22. Valores das velocidades de excreção urinária e de $\log \Delta Xu / \Delta t$ em função do tempo médio de coleta (tm), após a administração dos produtos dos laboratórios A (produto-referência) e B (produto-teste), na forma de suspensão .

tm (h)	Laboratório A		Laboratório B	
	Velocidade (mg h ⁻¹)	$\log \Delta Xu / \Delta t$	Velocidade (mg h ⁻¹)	$\log \Delta Xu / \Delta t$
0,0	-	0	-	0
0,5	33,65	1,5270	28,02	1,4474
1,5	76,40	1,8831	80,61	1,9064
3,0	49,67	1,6961	43,58	1,6393
5,0	13,33	1,1247	12,38	1,0931
7,0	7,06	0,8484	6,69	0,8253
9,0	4,09	0,6121	3,87	0,5875
11,0	2,64	0,4209	3,17	0,5017

Média de 15 voluntários

Tabela 23. Quantidades acumuladas de ampicilina na urina ($X_{uacumul}$), em função dos tempos de coleta, após a administração do produto do Laboratório A, na forma de cápsulas, por fase de administração (valores em mg).

Fase	Amostra	Voluntário	TEMPO (h)							
			0	1	2	4	6	8	10	12
I	A	V1	0	1,09	34,64	149,12	167,64	183,93	196,12	204,12
I	A	V2	0	0,21	28,99	178,24	270,86	299,39	308,86	319,03
I	A	V5	0	18,59	106,35	235,41	279,10	303,88	326,09	338,05
I	A	V8	0	7,81	91,41	236,04	237,47	250,95	260,07	268,14
I	A	V9	0	10,11	76,87	127,82	168,71	183,91	198,81	208,19
I	A	V11	0	4,50	41,75	155,48	193,76	203,02	208,62	212,38
I	A	V13	0	12,15	88,46	211,93	246,24	262,00	276,61	291,69
I	A	V14	0	11,46	106,38	191,84	205,51	209,49	211,42	213,45
II	A	V3	0	0,03	3,62	92,92	243,56	308,37	328,92	338,89
II	A	V4	0	1,87	16,04	141,85	231,77	258,94	275,40	284,09
II	A	V6	0	1,64	15,99	160,02	257,33	281,59	285,88	289,19
II	A	V7	0	5,16	5,16	135,77	258,64	272,21	281,29	288,91
II	A	V10	0	56,07	56,07	123,34	263,32	294,87	294,87	299,77
II	A	V12	0	2,42	47,20	307,57	362,46	378,10	384,43	412,73
II	A	V15	0	7,14	32,77	129,93	157,92	171,11	171,12	173,41
II	A	V16	0	10,52	54,52	149,76	205,00	216,29	216,29	218,02
Médias				9,42	50,39	170,44	234,33	254,88	264,05	272,50

Tabela 24. Quantidades acumuladas de ampicilina na urina ($X_{Uacumul}$), em função dos tempos de coleta, após a administração do produto do Laboratório B, na forma de cápsulas, por fase de administração (valores em mg).

Fase	Amostra	Voluntário	TEMPO (h)							
			0	1	2	4	6	8	10	12
I	B	V3	0	0,56	16,99	141,13	205,69	232,49	243,81	251,75
I	B	V4	0	4,39	38,56	159,94	237,63	256,09	267,65	275,11
I	B	V6	0	34,63	139,09	243,20	247,66	255,93	263,34	270,77
I	B	V7	0	12,69	93,48	182,45	217,03	229,43	237,32	245,92
I	B	V10	0	2,14	29,78	155,78	224,76	239,63	248,01	255,23
I	B	V12	0	6,74	67,03	222,79	259,99	261,91	270,08	279,64
I	B	V15	0	8,07	53,22	123,20	141,54	149,67	157,39	164,94
I	B	V16	0	5,04	58,21	179,59	206,11	217,35	223,59	229,47
II	B	V1	0	1,24	14,80	112,47	156,40	171,86	181,65	188,19
II	B	V2	0	1,39	32,43	413,05	607,77	649,19	656,03	660,61
II	B	V5	0	18,03	133,41	302,76	332,54	355,51	365,19	376,72
II	B	V8	0	5,02	66,75	192,61	294,24	320,87	326,39	332,27
II	B	V9	0	0	55,59	143,65	185,37	194,17	209,24	216,39
II	B	V11	0	20,13	20,13	159,64	184,93	185,13	185,13	188,64
II	B	V13	0	1,51	17,69	123,77	281,48	299,38	301,23	308,43
II	B	V14	0	81,24	243,05	430,55	455,98	460,50	460,50	466,27
Médias				12,68	67,51	205,41	264,95	279,94	287,28	294,39

Tabela 25. Quantidades acumuladas de ampicilina na urina ($X_{Uacumul}$), em função dos tempos de coleta, após a administração do produto do Laboratório A, na forma de suspensão, por fase de administração (valores em mg).

Fase	Amostra	Voluntário	TEMPO (h)							
			0	1	2	4	6	8	10	12
I	A	V1	0	19,68	65,48	136,27	162,54	162,54	167,13	173,29
I	A	V3	0	23,80	79,68	162,26	166,51	181,84	183,71	186,68
I	A	V5	0	45,20	163,02	254,39	279,42	306,04	329,46	343,72
I	A	V8	0	77,96	210,84	373,35	421,05	436,91	441,24	448,19
I	A	V10	0	27,99	118,62	210,39	250,33	259,76	264,79	266,36
I	A	V15	0	45,23	102,82	172,41	198,85	208,65	213,62	218,09
I	A	V16	0	45,42	120,81	199,37	218,28	246,70	264,15	272,94
II	A	V2	0	60,15	148,52	371,67	451,27	475,20	479,16	481,03
II	A	V4	0	27,86	105,25	204,64	248,98	265,19	289,93	306,23
II	A	V6	0	34,48	117,05	228,88	263,52	282,64	305,51	322,39
II	A	V7	0	30,25	100,64	208,59	242,12	260,27	292,13	298,19
II	A	V9	0	30,48	94,97	172,71	198,62	207,23	214,12	219,98
II	A	V12	0	29,56	97,93	227,96	251,97	276,98	278,91	278,91
II	A	V13	0	47,38	164,31	272,47	300,33	322,61	343,23	352,86
II	A	V14	0	11,36	66,10	137,22	150,08	158,06	164,75	166,45
Médias			0	37,12	117,07	222,17	253,59	270,04	282,12	289,02

Tabela 26. Quantidades acumuladas de ampicilina na urina ($X_{Uacumul}$), em função dos tempos de coleta, após a administração do produto do Laboratório B, na forma de suspensão, por fase de administração (valores em mg).

Fase	Amostra	Voluntário	TEMPO (h)							
			0	1	2	4	6	8	10	12
I	B	V2	0	51,31	169,42	288,14	338,52	349,44	349,44	349,99
I	B	V4	0	34,97	125,55	195,53	225,33	240,29	260,53	274,86
I	B	V6	0	25,60	114,84	215,75	236,15	245,60	247,16	249,59
I	B	V7	0	14,59	82,33	170,36	205,59	217,18	230,28	235,64
I	B	V9	0	34,08	151,11	252,69	284,58	301,01	305,21	307,95
I	B	V12	0	6,01	71,28	167,01	189,06	202,62	204,25	212,47
I	B	V13	0	42,18	130,80	200,91	224,57	237,06	249,64	257,08
I	B	V14	0	23,28	89,94	158,49	171,85	184,79	186,64	189,71
II	B	V1	0	24,14	72,69	148,87	201,42	215,08	260,60	283,42
II	B	V3	0	22,36	81,15	151,12	184,57	200,92	217,33	232,16
II	B	V5	0	47,44	197,50	271,20	271,21	305,96	328,62	344,72
II	B	V8	0	62,54	173,49	322,19	360,28	370,54	381,14	388,77
II	B	V10	0	38,17	131,51	238,33	267,64	274,29	283,07	287,36
II	B	V15	0	16,42	62,75	140,67	192,74	220,57	235,99	262,71
II	B	V16	0	37,97	103,66	179,79	196,44	204,67	211,36	215,65
Médias			0	32,07	117,20	206,74	236,66	251,34	263,42	272,81

Tabela 27. Resumo dos resultados obtidos no cálculo dos parâmetros farmacocinéticos: quantidade acumulada de ampicilina na urina ($X_{uacumul}$), velocidades máximas de excreção ($V_{máx}$), tempos correspondentes às velocidades máximas de excreção ($t_{máx}$), constantes de velocidades de eliminação (K) e de excreção urinária (ku) e meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) dos produtos estudados (médias dos voluntários, desvios padrão entre parentesis).

Amostra	$X_{uacumul}$ (mg)	$V_{máx}$ (mg h ⁻¹)	$t_{máx}$ (h)	K (h ⁻¹)	ku (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
Cápsulas Lab. A	272,50 (63,80)	72,21 (20,27)	2,9 (1,1)	-0,4154 (0,118)	0,5703 (0,613)	1,67
Cápsulas Lab. B	294,40 (123,40)	83,20 (40,96)	2,6 (1,0)	-0,4061 (0,096)	0,5150 (0,686)	1,71
Suspensão Lab. A	289,02 (92,71)	81,50 (26,81)	1,6 (0,4)	-0,3812 (0,103)	0,3305 (0,370)	1,82
Suspensão Lab. B	272,81 (55,98)	85,13 (29,36)	1,5 (0,0)	-0,3672 (0,130)	0,2715 (0,185)	1,89

$$[t_{1/2} = 0,693/K]$$

Figura 9. Excreção urinária da ampicilina após a administração dos produtos na forma de cápsula: log da velocidade de excreção urinária da porção não biotransformada ($\log \Delta Xu/\Delta t$) em função do tempo médio (t_m) de coleta das amostras, valores médios de 16 voluntários.

Figura 10. Excreção urinária de ampicilina após a administração dos produtos na forma de suspensão: log da velocidade de excreção urinária da porção não biotransformada ($\log \Delta Xu/\Delta t$), em função do tempo médio (t_m) de coleta das amostras, valores médios de 15 voluntários.

Figura 11. Quantidades de ampicilina acumulada na urina dos voluntários (Xu_{acumul}), após administração de cápsulas provenientes dos Laboratórios A e B. Os resultados representam a média de 16 voluntários.

Figura 12. Quantidade de ampicilina acumulada na urina dos voluntários (Xu_{acumul}), após administração de suspensões provenientes dos Laboratórios A e B. Os resultados representam a média de 15 voluntários.

5.4 ETAPA D: CÁLCULO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS:

Nas **Tabelas** de 28 a 32 estão apresentados os resultados da análise estatística efetuada para cada forma farmacêutica estudada. O grupo I indica o grupo dos voluntários que ingeriu o produto A na primeira fase de cada etapa, enquanto que o grupo II representa os voluntários que nessa mesma fase ingeriram o produto B.

Nas **Figuras** de 13 a 20 estão respresentados, por forma farmacêutica e laboratório, os resultados das médias de $X_{Uacumul}$ em função do tempo e os desvios padrão, bem como os valores individuais onde se pode observar a dispersão dos resultados em cada fase do experimento. As **Figuras** 21 e 22 apresentam os gráficos das velocidades de excreção em função do tempo médio por laboratório.

Tabela 28. Resultados da análise estatística referente à forma farmacêutica cápsula. Teste para avaliação de significância quanto à sequência da administração dos produtos A e B (teste t pareado), empregando os valores das quantidades de ampicilina acumuladas na urina ($X_{Uacumul}$), constantes de velocidade de eliminação (K) e de excreção (k_u).

	Grupo	N	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação	Teste t pareado
$*DX_{Uacumul}$	I	8	135,83	1,59	0,413
	II	8	47,76	1,15	
$*DK$	I	8	0,11	0,87	0,714
	II	8	0,09	0,92	
$*DK_U$	I	8	0,69	1,75	0,771
	II	8	0,79	1,52	

*D = Diferença entre os valores obtidos de cada voluntário nos grupos I e II, nas duas fases de administração. Grupo I: grupo de voluntários que recebeu o produto do Laboratório A na primeira Fase e o do Laboratório B na segunda Fase. Grupo II: grupo de voluntários que recebeu o produto do Laboratório B na primeira Fase e o do Laboratório A na segunda Fase. Nível de significância $\alpha = 0,10$.

Tabela 29. Resultados da análise estatística referente à forma farmacêutica cápsula, para os parâmetros: quantidade de ampicilina acumulada na urina ($X_{Uacumul}$), constantes de velocidade de eliminação (K) e de excreção urinária (k_u), velocidade máxima de eliminação ($V_{máx}$) e tempo no qual a $V_{máx}$ foi atingida ($t_{máx}$). Análises paramétrica e não paramétrica.

	Produto	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação	Teste t	Teste de MANN-WHITNEY
$X_{Uacumul}$ (mg)	A	272,50	63,80	0,23	0,535	0,880
	B	294,40	123,40	0,42		
K (h ⁻¹)	A	0,4154	0,1180	0,28	0,808	0,940
	B	0,4061	0,096	0,24		
K_U (h ⁻¹)	A	0,5703	0,6130	1,0760	0,812	0,451
	B	0,5150	0,6860	1,3330		
$V_{máx}$ (mg h ⁻¹)	A	72,21	20,27	0,28	0,347	0,880
	B	83,20	40,96	0,49		
$t_{máx}$ (h)	A	2,9	1,1	0,4	0,380	0,387
	B	2,6	1,0	0,4		

Nível de significância $\alpha = 0,10$, N= 16.

Tabela 30. Resultados da análise estatística referente à forma farmacêutica suspensão. Teste para avaliação de significância quanto à sequência da administração dos produtos A e B (teste t pareado), empregando os valores das quantidades de ampicilina acumuladas na urina ($X_{Uacumul}$), constantes de velocidade de eliminação (K) e de excreção (ku).

	Grupo	N	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação	Teste t pareado
$DX_{Uacumul}$ (mg)	I	7	60,35	4,00	0,411
	II	8	69,72	1,60	
DK	I	7	0,1113	1,32	0,509
	II	8	0,0952	0,20	
DK_U	I	7	0,0819	2,295	0,545
	II	8	0,2944	3,705	

D = Diferença dos valores obtidos de cada voluntário entre os grupos I e II. Grupo I: grupo de voluntários que recebeu o produto do Laboratório A na primeira Fase e o do Laboratório B na segunda Fase. Grupo II: grupo de voluntários que recebeu o produto do Laboratório B na primeira Fase e o do Laboratório A na segunda Fase. Nível de significância $\alpha = 0,10$.

Tabela 31. Resultados da análise estatística referente à forma farmacêutica suspensão, para os parâmetros: quantidade de ampicilina acumulada na urina ($X_{Uacumul}$), constantes de velocidade de eliminação (K) e de excreção urinária (k_u), velocidade máxima de eliminação ($V_{máx}$) e tempo no qual a $V_{máx}$ foi atingida ($t_{máx}$). Análises paramétrica e não paramétrica.

	Produto	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação	Teste t	Teste de MANN-WHITNEY
$X_{Uacumul}$ (mg)	A	289,02	92,71	0,32	0,568	0,724
	B	272,81	55,98	0,21		
K (h ⁻¹)	A	0,3811	0,1035	0,270	0,748	0,787
	B	0,3672	0,1302	0,360		
K_U (h ⁻¹)	A	0,3305	0,3692	1,1170	0,586	0,633
	B	0,2714	0,1854	0,6830		
$V_{máx}$ (mg h ⁻¹)	A	81,50	26,810	0,329	0,726	0,755
	B	85,13	29,359	0,345		
$t_{máx}$ (h)	A	1,6	0,4	0,2	-	0,3173
	B	1,5	0	0		

Nível de significância $\alpha = 0,10$, $N = 15$.

Tabela 32. Cálculo dos intervalos de confiança da quantidade de ampicilina acumulada na urina ($X_{Uacumul}$) e da velocidade de excreção urinária máxima ($V_{máx}$), para as formas farmacêuticas submetidas ao ensaio de bioequivalência.

Forma Farmacêutica	Parâmetro	*Intervalo de confiança (%)
Cápsulas	$X_{Uacumul}$	93,0 - 117,0
	$V_{máx}$	92,9 - 127,8
Suspensão	$X_{Uacumul}$	87,0 - 108,4
	$V_{máx}$	94,1 - 114,6

* Nível de significância $\alpha = 0,10$.

Figura 13. Quantidades de ampicilina acumulada na urina (Xu_{acumul}) após a administração do produto do Laboratório A na forma de cápsulas (— fase I, — fase II, V1-16, voluntários).

Figura 14. Quantidades de ampicilina acumulada na urina (Xu_{acumul}) após a administração do produto do Laboratório A na forma de cápsulas (média de 16 voluntários, I desvio padrão).

Figura 15. Quantidades acumuladas de ampicilina na urina (Xu_{acumul}) após a administração do produto do Laboratório B na forma de cápsulas (— fase I,— fase II, V1-16, voluntários).

Figura 16. Quantidade acumulada de ampicilina na urina (Xu_{acumul}) após a administração do produto do Laboratório B na forma de cápsulas (média de 16 voluntários, I desvio padrão).

Figura 17. Quantidades de ampicilina acumulada na urina (Xu_{acumul}) após a administração do produto do Laboratório A na forma de suspensão (— fase I, — fase II, V1-16, voluntários).

Figura 18. Quantidades de ampicilina acumulada na urina (Xu_{acumul}) após a administração do produto do Laboratório A na forma de suspensão (média de 15 voluntários, I desvio padrão).

Figura 19. Quantidades de ampicilina acumulada na urina (Xu_{acum}) após a administração do produto do Laboratório B na forma de suspensão (— fase I, — fase II, V1-16, voluntários).

Figura 20. Quantidades de ampicilina acumulada na urina (Xu_{acum}) após a administração do produto do Laboratório B na forma de suspensão (média de 15 voluntários, I desvio padrão).

Figura 21. Velocidade de excreção urinária da ampicilina em função do tempo médio (t_m) após a administração de cápsulas.

Figura 22. Velocidade de excreção urinária da ampicilina em função do tempo médio (t_m) após a administração de suspensões.

DISCUSSÃO

Apesar da introdução dos antibióticos de última geração, em decorrência de sua segurança e do baixo custo, a ampicilina continua sendo um dos fármacos mais empregados na terapêutica tanto em países do primeiro mundo como naqueles em desenvolvimento. O surgimento de novos produtos, sobretudo os genéricos, motivou inúmeros estudos de bioequivalência de produtos contendo ampicilina os quais vem sendo amplamente desenvolvidos, visando, principalmente, a intercambialidade de produtos similares.

A ampicilina foi escolhida para o presente estudo uma vez que é um antibiótico de amplo espectro de grande utilização no Brasil, com muitos fabricantes nacionais e por apresentar absorção oral incompleta ^{59, 105, 119}. Além disso, foi incluída em uma lista de fármacos cujas especialidades farmacêuticas apresentam ou são suspeitas de apresentar, diferenças na biodisponibilidade ^{4, 6}. No mercado brasileiro não se tem conhecimento sobre estudos de bioequivalência desses produtos, entretanto, frequentemente são prescritos como sendo supostamente similares.

ETAPA A: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FARMACÊUTICA *IN VITRO*

Preliminarmente, foram realizados diversos ensaios para avaliar a qualidade farmacêutica *in vitro*, uma vez que, estudos anteriores demonstraram que é possível encontrar no mercado nacional produtos que carecem de atributos de qualidade como dissolução, por exemplo ⁹². Considerando que o fármaco deve estar dissolvido para que possa ser absorvido, produtos que apresentam dissolução inadequada, muito provavelmente, exibem problemas quanto à biodisponibilidade. Entretanto, para produtos com características de dissolução dentro de padrões estabelecidos, não está garantida a biodisponibilidade, a menos que seja comprovada correlação entre o ensaio de dissolução com o teste *in vivo*, mesmo assim, há vários níveis de correlação ¹¹⁰ que podem ser estabelecidos.

Nos países que reconhecem as patentes, os ensaios de bioequivalência são realizados comparando a biodisponibilidade de novos produtos com a dos produtos inovadores. Na ausência do produto inovador empregam-se produtos cujas eficácia e segurança são comprovadas e reconhecidas pelo uso clínico. Assim sendo, para realização do estudo *in vivo* foram selecionados produtos sob as formas de suspensão e cápsulas para serem considerados como referência. Para tanto, foram realizados os estudos *in vitro*, avaliando as características de qualidade de medicamentos originários de laboratórios considerados éticos e de eficácia clínica reconhecida. Como os estudos de bioequivalência tem custo elevado, apesar de muito inferior ao dos ensaios clínicos e sub-clínicos, o trabalho *in vivo* foi realizado comparando apenas dois produtos de cada forma farmacêutica, onde designamos os produtos de referência por produtos do Laboratório A e de produtos do Laboratório B aqueles em estudo. Como

referências foram empregados produtos sob as formas de suspensão e cápsulas do mesmo fabricante. O Laboratório B é um fabricante nacional cujos produtos ora em estudo são considerados "genéricos".

Como pode ser observado nas **Tabelas de 2 a 5**, os testes físico-químicos foram realizados em três produtos na forma de suspensão oral e três de cápsulas. As cápsulas do Laboratório B (lote 1), apresentaram peso médio de $491,00 \pm 2,65$ mg, abaixo da quantidade declarada de ampicilina (500 mg), indicando problemas na produção do lote, uma vez que, considerando a presença de adjuvantes, deveriam conter peso acima de 500 mg, como ocorreu com os outros lotes analisados. Mesmo estando dentro das especificações sugeriu-se a otimização do processo e da formulação visando melhor uniformidade pois, na produção, é necessário trabalhar com limites bem mais estreitos para garantir, ao lote todo, o cumprimento das especificações oficiais ¹⁸. Os resultados da cinética de dissolução, discutidos mais adiante, também foram considerados para otimização da formulação do lote 1 do Laboratório B, originando o lote 2.

A uniformidade de conteúdo é um problema muito frequente nas formas sólidas, por esse motivo, na monografia de cápsulas de ampicilina da Farmacopéia Americana ¹¹⁰, está incluído como teste obrigatório. As cápsulas do Laboratório A apresentaram a maior variação no teste de uniformidade de conteúdo, com desvio padrão relativo (S_R) de 5,2%, enquanto que, para ambos os produtos sob a forma de cápsulas do Laboratório B (lotes 1 e 2), encontraram-se S_R s de 4,1 e 2,1 %, respectivamente. O S_R máximo permitido na especificação é de 6,0%.

O teste de desintegração, substituído na Farmacopéia Americana pelo de dissolução, continua sendo adotado pela Farmacopéia Britânica para a forma de comprimidos. No caso de cápsulas gelatinosas, preconiza tempo máximo de 30 minutos em água para a desintegração do envólucro de gelatina. Os tempos de desintegração observados nas cápsulas variaram de 7,5 a 9,5 minutos (**Tabela 3**).

Para a forma de cápsulas, a quantidade total dissolvida do fármaco após 45 minutos foi de 514,13, 429,87 e 476,29 mg/cápsula para os produtos A, B (lote 1) e B (lote 2), respectivamente, isto é todos os produtos da forma farmacêutica cápsulas estudados apresentaram resultados dentro dos limites especificados pela Farmacopéia Americana 23 ed. ¹⁰⁸, ou seja, mais de 80% da quantidade declarada de ampicilina foi dissolvida em 45 minutos. Entretanto, observando os perfis de dissolução das cápsulas apresentados na **Figura 4**, fica evidente o melhor desempenho das cápsulas dos Laboratórios A e B (lote 2). O lote 1 do Laboratório B foi o que liberou menor quantidade de fármaco dentro do período

especificado e em velocidade menor, apresentando comportamento significativamente diferente dos demais produtos frente a este teste. Tais diferenças não podem ser notadas se aplicado o teste de dissolução determinando a quantidade total dissolvida apenas no tempo final do teste, por esse motivo, torna-se valiosa a determinação da cinética de dissolução, uma vez que diferenças na liberação do fármaco podem traduzir-se em diferentes desempenhos *in vivo*. O lote 2 do Laboratório B apresentou melhora significativa em todos os atributos estudados, incluindo a cinética de dissolução, refletindo as melhorias trazidas pela otimização da formulação.

A umidade determinada nas cápsulas variou de 0,20% (Laboratório B, lote 1) a 1,03% (Laboratório A). Para os pós das suspensões orais, os valores de umidade foram de 0,16% (Laboratório A), 5,50% (Laboratório B) e 1,72% (Laboratório D), sendo que apenas o pó para suspensão oral do Laboratório B não satisfaz às especificações oficiais da Farmacopéia Americana 23 ed.¹¹⁰ cujo limite máximo para pós que contenham ampicilina na forma trihidratada é de 5,0%. Embora o resultado esteja bem próximo da especificação, a estabilidade quanto às características físico-químicas, sobretudo dissolução podem ser comprometidas com o tempo⁴⁴.

As suspensões orais tiveram o pH determinado após reconstituição conforme o rótulo, cujos resultados dos Laboratórios A e B foram de 5,6 e 5,9 respectivamente, e dentro dos intervalos estabelecidos nas farmacopéias Americana (de 5,0 a 7,5) e Britânica (de 4,0 a 7,0). O produto do Laboratório D foi satisfatório apenas quanto à especificação da Farmacopéia Britânica, com o valor de 4,6. A velocidade de decomposição da ampicilina aumenta com o aumento da temperatura e em condições extremas de pH, sendo que a faixa de pH de maior estabilidade é de 5,5 a 7,5⁷³. Embora a suspensão seja extemporânea, após reconstituição deve manter-se estável por sete dias, conforme informação dos fabricantes de ambos os laboratórios; assim sendo, o pH assume relevante importância na manutenção da estabilidade da suspensão reconstituída durante o tratamento.

Outros ensaios realizados nos produtos sob a forma farmacêutica de pó para suspensão oral, foram as determinações de peso médio, doseamento de ampicilina, e, além dos ensaios preconizados nas farmacopéias, foi realizado o ensaio de dissolução do pó para suspensão extemporânea para verificar a porcentagem dissolvida de fármaco no período de 45 minutos que é o tempo especificado na Farmacopéia Americana para as cápsulas. Para tanto, cápsulas gelatinosas foram preenchidas com o pó para suspensão oral. Verificou-se que os produtos dos Laboratórios A e D apresentaram médias de 97,9% e o do Laboratório A, 92,4% de

ampicilina dissolvida ao fim do período estabelecido, sendo, este último, significativamente diferente dos demais.

A prévia avaliação físico-química dos medicamentos em estudo comprovou o não cumprimento dos atributos de pH e umidade, bem como as diferenças entre os perfis de dissolução obtidos a partir dos três produtos sob a forma de cápsulas. Essas constatações reforçam que é necessário o desenvolvimento de estudos que permitam avaliar a qualidade biofarmacêutica dos produtos farmacêuticos nacionais para que possam ser prescritos como intercambiáveis.

ETAPA B: VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA EMPREGADA NOS ENSAIOS *IN VIVO*

O método analítico aplicado na determinação da ampicilina nas amostras de urina foi a espectrofotometria a 320 nm ^{20, 95} após conversão a ácido penicilênico catalizada pelo Cu (II), que é seletivo para a ampicilina inalterada e tem como principal vantagem a simplicidade operacional, uma vez que, a cada fase, seriam analisadas no mínimo 128 amostras de urina. O método microbiológico, seletivo e sensível, apresenta como desvantagens a baixa precisão e a grande complexidade de procedimentos e no preparo de materiais, impossibilitando que um número elevado de amostras possa ser analisado simultaneamente. No caso da ampicilina, é fundamental a análise das amostras de urina no mesmo dia em virtude de sua rápida decomposição em solução. A degradação da ampicilina ocorre mesmo em amostras congeladas ^{2, 117}.

Adicionalmente, o método espectrofotométrico foi aplicado na análise de fluidos biológicos como plasma, bile e urina ¹⁰, em estudos de biodisponibilidade da ampicilina sob diversas formas farmacêuticas ^{50, 70, 78, 113} e validado comparativamente ao método microbiológico ^{7, 10}. Diversos autores empregaram esse método em estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, relatando que o mesmo apresentou boa sensibilidade e exatidão ²⁻⁶.

Na construção da reta de calibração verificou-se que, apesar da excelente correlação linear obtida ($r=0,9999$), a equação da reta definida por $y=-0,07264 + 0,0391x$, em que y representa os valores de absorbância em função da concentração x de ampicilina, apresentou a significativo, não passando pela origem. O teste de recuperação comprovou que, quanto menores as concentrações de ampicilina menor é a exatidão do método; para determinações menores que 10 µg/mL a porcentagem recuperada foi 14,5% maior que a esperada. Nas concentrações entre 10 e 20 µg/mL, foram obtidas recuperações entre 99,7 a 101,9%,

indicando boa exatidão do método. Por esse motivo e, considerando que, no experimento *in vivo*, as concentrações de fármaco na urina variam muito em decorrência da variação do volume excretado, como verificado no ensaio piloto, foram preparadas, em paralelo, soluções do padrão de concentrações entre 10 e 20 µg/mL para serem analisadas comparativamente às amostras. Além disso, as diluições de cada amostra foram ajustadas para que fornecessem leituras de absorbância próximas daquelas das soluções padrão.

Na pesquisa de interferentes nas amostras de urina, em diferentes diluições em solução tampão de pH 5,2, verificou-se a presença de absorção a 320 nm mesmo sem a adição de ampicilina, que aumentou proporcionalmente à quantidade de urina adicionada para mesmas diluições. Deve-se considerar que essa interferência é facilmente eliminada quando se desconta a absorbância da solução sem aquecimento (**Tabela 11**). Para verificar a interferência devida à própria ampicilina presente nas soluções do branco, foram feitos em paralelo, brancos do tampão e da urina sem ampicilina e, contendo concentrações que variaram de 5 a 20 µg/mL de ampicilina. As diferenças encontradas nas leituras de absorbância variaram de 0,002 a 0,004, o que comprova que as soluções contendo ampicilina podem ser empregadas sem induzir a erros significativos.

No estudo da estabilidade das soluções de ampicilina em solução tampão fosfato/sulfato de cobre de pH 5,2 (**Tabela 11**) e em urina (**Tabela 12**), verificou-se que não houve degradação do antibiótico dentro dos intervalos de uma e duas horas, respectivamente, tempos suficientes para coleta, diluição e processamento das amostras. Também não foi observada alteração nas absorbâncias das soluções submetidas ao aquecimento, dentro do período de 1 hora, indicando que o composto resultante é estável por pelo menos uma hora após a reação, o que está de acordo com o relato de SMITH e col ⁹⁵.

O ensaio piloto *in vivo* com dois voluntários foi realizado para acertar as condições do experimento. No ensaio piloto foram estabelecidos os principais procedimentos com relação à coleta das amostras, materiais para acondicionamento, medida de volume e pH, diluição das amostras e padrão para leitura adequada das concentrações do antibiótico na urina. As amostras de urina foram coletadas dentro do intervalo de quatro horas uma vez que a ampicilina é eliminada nas primeiras horas após administração.

As condições escolhidas para o ensaio piloto foram adequadas para a determinação do fármaco na urina de ambos os voluntários que tomaram parte do estudo, como pode ser observado na **Tabela 13**. Nessa mesma tabela foi possível verificar que a eliminação máxima da ampicilina acontece logo nas primeiras horas após a administração (**Figura 7**).

Apesar da padronização do volume de líquido administrado aos voluntários, o volume de urina nos intervalos de coleta variou bastante, o que trouxe grande variação nas concentrações de ampicilina. Devido a essa variação de concentração foram necessários ajustes de diluição antes da reação. Esse acerto não pode ser simplesmente efetuado no momento da leitura pois a absorbância resulta da formação do complexo cobre-ácido penicilênico, reação esta, dependente da temperatura, do pH e principalmente, da concentração de cobre ⁹⁵. Além disso, observou-se que as leituras permanecessem dentro da faixa de 0,20 a 0,70 de absorbância, para obter maiores precisão e exatidão nas determinações uma vez que fora desse intervalo, há aumento no erro experimental ⁸¹. A determinação do volume urinário foi fundamental para o cálculo da quantidade de ampicilina eliminada por cada voluntário enquanto o pH foi empregado como parâmetro auxiliar no monitoramento das amostras coletadas.

Como ilustrado na **Figura 8**, observa-se grande similaridade entre os perfis da quantidade acumulada de antibiótico determinada na urina de ambos os voluntários que fizeram parte de estudo.

ETAPA C: DETERMINAÇÃO DA BIOEQUIVALÊNCIA DOS PRODUTOS

Seleção dos parâmetros farmacocinéticos estudados

A avaliação da biodisponibilidade conforme a especificação do FDA, implica na determinação da quantidade de fármaco absorvida e da velocidade com que ocorre esse processo ^{88, 110}. Como a bioequivalência é o estudo comparativo da biodisponibilidade de duas formas farmacêuticas ou de produtos contendo mesmo fármaco em mesma dose ⁵⁶, devem ser escolhidos parâmetros adequados que descrevam o processo de absorção.

Nos estudos de bioequivalência, o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos é comumente obtido a partir de curvas de concentração sanguínea do fármaco *versus* tempo após administração das preparações em estudo. Nesse caso, determinam-se a área sob a curva (*AUC*), a máxima concentração sanguínea (*C_{máx}*) e o tempo em que a *C_{máx}* é atingida. Uma outra maneira para obtenção de parâmetros farmacocinéticos é a determinação da quantidade acumulada do fármaco excretado na urina. Para tanto, é necessário que pelo menos 10% do fármaco seja excretado de forma não biotransformada e que a urina seja coletada, sem perdas, durante todo o período de eliminação. Considera-se que o fármaco foi totalmente eliminado após decorridas pelo menos sete a dez meias-vidas, tempo em que 99,2% da dose é eliminada ^{25, 103}.

A ampicilina tem meia-vida plasmática curta (de 1 a 2 horas), é eliminada em mais de 90% na urina ^{50, 60}, sendo que cerca de 70-75% como inalterada ³¹, apresentando, dessa forma, características apropriadas para que, a partir de sua recuperação urinária, seja possível obter parâmetros farmacocinéticos que permitam avaliar sua biodisponibilidade. De fato, JUSKO & LEWIS ⁵⁹ demonstraram que, em decorrência de sua cinética de eliminação de primeira ordem, existe uma correlação, em humanos, entre os níveis de ampicilina no sangue e a taxa de excreção urinária, portanto, a quantidade total recuperada como inalterada na urina é uma indicação da quantidade e velocidade de absorção ^{2, 50}. Outros estudos comprovaram boa correlação entre a quantidade de ampicilina encontrada na urina e sua concentração plasmática ³⁴.

Assim sendo, a quantidade acumulada de ampicilina excretada na urina ($X_{uacumul}$) foi empregada como parâmetro para descrever a quantidade de fármaco absorvida enquanto que as velocidades máximas de excreção ($V_{m\acute{a}x}$) e o tempo em que essa velocidade é atingida ($t_{m\acute{a}x}$) foram calculados para estudar a velocidade de absorção ^{88, 100}. As constantes de velocidades de excreção total (K) e urinária (ku) também foram determinadas. Outros autores, como HASSANZADEH ⁵⁰, LÓPES ⁷⁰ e VILA-JATO ¹¹³ empregaram os mesmos parâmetros em estudos da biodisponibilidade da ampicilina em vários produtos farmacêuticos.

Além disso, a determinação de ampicilina no sangue implicaria no uso de técnica ainda mais sensível e seletiva, que permitisse a separação e quantificação da ampicilina inalterada dos demais constituintes plasmáticos. A cromatografia líquida de alta eficiência reúne a maioria desses atributos, entretanto, a detecção baseada na absorção ultravioleta não oferece suficiente sensibilidade, como relatam HAGINAKA & WATAI ^{46, 47} e HURWITZ & CARNEY ⁵⁵, uma vez que a absorção ultravioleta da ampicilina é deficiente. Desta forma, para que a CLAE possa ser eficientemente aplicada, é necessária a adoção de outros recursos de detecção como tratamentos pré ou pós-coluna ou reações intermediárias, o que requer equipamento mais sofisticado e solventes e reagentes específicos, elevando sobremaneira o custo das análises.

Seleção dos voluntários e estabelecimento dos parâmetros de inclusão e exclusão

Segundo o FDA, por motivos éticos, os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência devem ser conduzidos empregando, preferencialmente, modelo animal que possa ser correlacionado com aqueles obtidos em humanos. O emprego de modelo animal se faz necessário no desenvolvimento de produtos novos para avaliação da farmacocinética, denominada sistema LADME (liberação, absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Na ausência desse modelo, os testes devem incluir seres humanos ^{12, 55, 105}.

O grupo de indivíduos escolhidos para os ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência, teoricamente, deveria incluir apenas aqueles que necessitam fazer uso do fármaco para uma ou mais indicações, entretanto, isto dificilmente é possível ¹¹⁹. Raramente, a população-alvo da terapêutica de um medicamento apresenta as mesmas condições de saúde. Como os estudos farmacocinéticos visam fornecer subsídios sobre a eficácia e segurança de um fármaco administrado sob determinada forma farmacêutica, o maior objetivo desses estudos é a identificação e quantificação das potenciais fontes de variação na resposta. A quantificação, portanto, deve ser conseguida com parâmetros fixos. Por esse motivo, a população escolhida deve ser a mais homogênea possível em parâmetros como idade, relação peso-altura, condições clínicas, hábitos como ingestão de álcool ou tabagismo e outros. Considerando que a variabilidade nos estudos farmacocinéticos advém de diferenças da formulação como daquelas inter e intra-indivíduos, a adequada seleção deve minimizar os efeitos desses últimos, aumentando a oportunidade de avaliação da própria formulação. Dificilmente há homogeneidade em um grupo de pacientes, entretanto, há certas classes de fármacos que não permitem, por motivos éticos, que se empreguem voluntários sadios, como os mutagênicos, que devem ser testados exclusivamente em animais ou os citotóxicos ^{56, 105}.

Os parâmetros de inclusão e exclusão foram fixados com o objetivo de minimizar a variabilidade individual, selecionando as seguintes condições: idade, entre 18 e 35 anos, relação peso-altura dentro de 10% do ideal, não fumantes, não dependentes de álcool, que não estivessem fazendo uso crônico de medicamentos, sem histórico de alergia a medicamentos, principalmente do grupo das penicilinas, com funções renal e hepática dentro de parâmetros clínicos normais, comprovados após exames laboratoriais e aprovados após exame clínico. Por questões éticas e para facilitar sua colaboração, os participantes do estudo foram informados de todos os detalhes do experimento e seus objetivos, dando seu consentimento por escrito. Durante o experimento não foram observadas nos voluntários quaisquer manifestações de efeitos decorrentes da administração dos produtos.

Observou-se na literatura que a maioria dos estudos de bioequivalência empregava reduzido número de voluntários (de 5 a 10) ^{1-6, 9, 32, 35, 48, 76, 80, 89, 104, 105, 113, 116}. Até a 22 edição da Farmacopéia Americana ¹⁰⁹, não havia recomendação a respeito do número de voluntários. O Code of Federal Regulations ³⁰, editado em 1992, preconiza que, na inexistência de modelo animal cujos resultados possam ser, comprovadamente, correlacionados com aqueles em humanos, os ensaios de bioequivalência devem ser realizados em indivíduos humanos adultos normais, sob condições padronizadas, mas é omissa quanto ao número e gênero dos voluntários. Na última revisão da Farmacopéia Americana ¹¹⁰, são apresentados exemplos de protocolos para estudo da bioequivalência e

teste de dissolução de cinco produtos, nos quais indica-se que os testes *in vivo* devam ser conduzidos com 24 voluntários do sexo masculino, entretanto, não há uma especificação mais precisa quanto a esses parâmetros.

O trabalho desenvolvido por HASSANZADEH ⁵⁰, sobre a biodisponibilidade da ampicilina, comparando o gênero dos indivíduos, indicou que não há diferenças significativas entre homens e mulheres. Provavelmente, a recomendação oficial do emprego de indivíduos do sexo masculino fundamenta-se na preocupação da possibilidade de gravidez no decorrer dos ensaios, principalmente nos estudos constituídos por várias etapas ou com períodos de *wash out* relativamente grandes. No presente estudo foram envolvidos indivíduos de ambos os sexos, efetuando, como precaução, o exame laboratorial para diagnóstico de gravidez naqueles do sexo feminino.

Estabelecimento do delineamento experimental

No estudo da bioequivalência dos produtos foi empregado o delineamento experimental cruzado *DEC* (**Quadro 3**), que é um tipo de quadrado latino. Com esse método, cada indivíduo funciona como seu próprio controle, diminuindo os efeitos da grande variação interindividual existente nos ensaios em paralelo. Dessa forma há uma melhoria significativa na precisão como também reduz-se o número de voluntários para obter o mesmo número de observações. Essa é uma vantagem considerável pois envolve redução significativa no custo das pesquisas. Como desvantagens podemos apontar maior consumo de tempo na conclusão dos estudos uma vez que os diferentes tratamentos são aplicados em diferentes períodos. Além disso, a perda de um dos resultados pode acarretar em maior dificuldade na interpretação ou até na invalidação de conclusões uma vez que, como são necessários no mínimo dois períodos, a possibilidade de ocorrer essa perda é grande ¹⁸. Frente a essas considerações, em nosso estudo, optou-se por comparar a biodisponibilidade entre as formas farmacêuticas, ou seja, cápsulas do Laboratório B com as do Laboratório A e suspensão do Laboratório B com a mesma forma do Laboratório A. Nesse delineamento foram necessários dois períodos para cada forma farmacêutica, onde, em cada período os indivíduos foram divididos em dois grupos: aqueles a quem foi administrado o produto do Laboratório A e no outro grupo, os indivíduos que receberam o produto B. Se quiséssemos comparar todos os produtos entre si, seria necessário dividir os voluntários em quatro grupos para cada período e a perda de um resultado em qualquer período causaria a exclusão de quatro resultados por produto, motivo este que nos levou a abandonar esse delineamento. Como o objetivo principal foi estudar a bioequivalência de produtos considerados similares, assumir tal risco seria desnecessário.

Uma outra desvantagem do *DEC* está relacionada ao efeito de *carry over* ou efeito residual. Em outras palavras, há efeito residual quando o tratamento aplicado no primeiro período interfere nos resultados do segundo período. O tempo insuficiente de *wash out* pode causar esse efeito o que invalida o experimento. Também é considerado efeito residual qualquer alteração ocorrida nos voluntários entre as duas fases de administração 18, 74, 82. Recomenda-se, na literatura, tempo mínimo de intervalo entre uma fase e outra de 7 a 10 meias vidas. Como a meia-vida da ampicilina é de 1 a 2 horas, seriam necessárias cerca de 20 horas para permitir total eliminação do fármaco. No presente estudo, o período de *wash out* foi de 48 horas, intervalo suficiente para garantir inexistência de efeito residual e, ao mesmo tempo curto demais para permitir alterações nos voluntários que pudessem se traduzir em respostas diferentes nos dois tratamentos.

A resposta a um tratamento pode ser influenciada pelo período no qual o tratamento está sendo testado (efeito do período). O *DEC* é planejado de forma que cada tratamento é aplicado em igual número de vezes para cada período, o que reduz o efeito do período, pois, se estiver presente, afetará igualmente ambos os tratamentos. O FDA recomenda o emprego da análise de variância (ANOVA) para os ensaios de bioequivalência, desaconselhando a aplicação do teste t simples pois este último ignora a presença do efeito residual e do período. A vantagem do método ANOVA é a decomposição da soma total dos quadrados em quatro partes: indivíduos, períodos, tratamentos e erro experimental. A soma dos quadrados correspondentes aos indivíduos (variação interindividual) e dos períodos são separados do erro total, o qual, então representa a variação intraindividual. A ANOVA subtrai a soma dos quadrados correspondente ao período do erro total, que é usado para testar as diferenças devidas ao tratamento. O efeito do período, quando presente, resulta em análise menos sensível, pois a inclusão da sua variância dificulta a detecção das variações relativas às diferenças nas formulações ^{1, 110}.

Cada coleta de urina sempre foi seguida da administração de 200 mL de líquido, água nas primeiras 6 horas e opção de suco de laranja após esse período. Esse procedimento teve como objetivo manter o volume de líquido urinário para coleta das amostras. TSUJI e col. ¹⁰⁸ sugerem que suficiente quantidade de água deva ser administrada juntamente com fármacos da classe das aminopenicilinas para que sua dissolução no TGI não seja etapa limitante da absorção.

A alimentação foi suspensa 12 horas antes do ensaio e nas quatro primeiras horas após a administração dos produtos para evitar qualquer interferência na absorção de ampicilina. ALI e col. ^{5, 6}, advertem que a absorção da ampicilina é reduzida quando administrada com

alimentos, provavelmente por ter alta hidrossolubilidade, necessita ficar mais tempo em contato com a mucosa do TGI, uma vez que o mecanismo predominante de absorção parece ser a difusão. Dessa forma, a presença de alimentos aumentaria o peristaltismo e a motilidade gastrointestinal, diminuindo o tempo de permanência e, portanto, a absorção. A padronização do volume de líquido oferecido aos voluntários bem como das refeições realizadas após 4 horas da administração (almoço e lanche) tiveram como objetivo diminuir variações nos resultados.

Parâmetros farmacocinéticos calculados

Quantidade de ampicilina acumulada na urina ($X_{uacumul}$)

As quantidades de ampicilina acumuladas na urina foram obtidas a partir das determinações analíticas na urina de cada voluntário nos intervalos de coleta (**Tabelas 23 a 26**). A recuperação média da ampicilina na urina dos voluntários foi de 272,50 mg ou 54,5% da dose (Produto A) e 294,40 mg ou 58,9% da dose (Produto B) para a forma cápsulas e de 289,02 mg ou 57,8% da dose (Produto A) e 272,81 mg ou 54,6% da dose (Produto B) para suspensão, demonstrando que a principal via de eliminação do fármaco é a excreção renal da ampicilina inalterada, o que está em conformidade com os relatos de JUSKO & LEWIS⁵⁹ e de EHRNEBO e col.³⁴. Estes últimos, encontraram valores em torno de 35 a 65% da dose administrada na urina após administração oral, enquanto DOLLERY³¹, relata que este valor situa-se entre 30 a 40%. Em nosso experimento, os valores encontrados indicam que de 54 a 59 % da dose administrada foi absorvida.

Os coeficientes de variação (CV) observados nas **Tabelas 29 e 31** para $X_{uacumul}$ total são de 23,41 e de 41,91 % para os produtos A e B na forma de cápsulas, respectivamente, e de 32,08 e 20,52 % para os produtos A e B na forma de suspensão, respectivamente. Estas variações relativamente amplas explicam-se pela irregularidade na absorção da ampicilina, característica própria do fármaco e pelas variações individuais.

TAYLOR e col.¹⁰⁵ afirmam que a ampicilina é um fármaco de absorção incompleta e variável quando administrada por via oral, originando variações nos níveis plasmáticos entre os indivíduos. Isto acarreta em intervalos de confiança relativamente amplos, comprometendo a precisão das determinações e consequentemente dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência. Mesmo frente à grande variabilidade entre os valores de $X_{uacumul}$ dos indivíduos nas diferentes fases do experimento, os intervalos de confiança calculados na análise estatística para as razões das médias (diferenças dos logs) encontram-se dentro do intervalo estabelecido pelo FDA (de 80 a 125%) (**Tabela 32**). Nas **Figuras 11 e 12** pode-se

observar a grande similaridade entre as curvas das quantidades acumuladas de ampicilina recuperadas na urina dos produtos testados (Laboratório B) com relação aos de referência (Laboratório A), sendo que para a forma de suspensão há sobreposição quase total dos gráficos. Tais fatos indicam que a bioequivalência entre os produtos testados e os de referência, nas mesmas formas farmacêuticas, não pode ser rejeitada.

Velocidade de excreção máxima ($V_{m\acute{a}x}$)

A velocidade máxima de excreção foi alcançada em tempos muito próximos para ambos os produtos nas mesmas formas farmacêuticas, não sendo observadas diferenças significativas ($\alpha=0,10$) entre as médias. Para cápsulas, a $V_{m\acute{a}x}$ foi de 72,21 mg/h (Produto A), e 83,20 mg/h (Produto B) com CVs de 28,1 e 49,2 %, respectivamente, nos tempos de 2,88 horas (CV = 36,8 %) e de 2,56 horas (CV = 38,3 %) na mesma ordem. Para a suspensão, a $V_{m\acute{a}x}$ foi de 81,50 mg/h (CV = 32,9 %) no tempo de 1,6 horas (CV = 24,4 %) para o produto A e de 85,13 mg/h (CV = 34,5 %) no tempo de 1,5 horas. (CV = 0). Os intervalos de confiança calculados para as razões das médias das velocidades máximas foram de 92,9 a 127,8 para cápsulas e de 94,1 a 114,6 para as suspensões (**Tabela 32**).

No trabalho de LÓPEZ e col.⁷⁰, a velocidade máxima de excreção do antibiótico, a partir de cápsulas gelatinosas duras e moles e de comprimidos oblongos contendo ampicilina foi atingida entre a terceira e quarta horas após administração e entre a quarta e quinta horas para comprimidos convencionais. Segundo esses autores, a velocidade máxima de excreção reflete a concentração máxima de ampicilina absorvida.

Teoricamente, a velocidade de liberação do fármaco a partir de formas sólidas, em geral, é maior para suspensões que para cápsulas, enquanto que comprimidos teriam menor velocidade de liberação. Embora, o delineamento experimental não tenha sido planejado para a comparação entre as formas de cápsulas e suspensões, verificou-se que os produtos administrados sob a forma de suspensão foram mais rápida e uniformemente absorvidos, fato esse evidenciado pelos tempos necessários para atingir a $V_{m\acute{a}x}$ e correspondentes CVs. Na **Tabela 16** apenas um voluntário apresentou $t_{m\acute{a}x}$ diferente dos demais. Esse comportamento indica que a dissolução pode ser etapa limitante do processo de absorção pois as cápsulas passam pelas fases de desintegração, desagregação e dissolução enquanto que nas suspensões o fármaco já se encontra parcialmente dissolvido e homogeneamente distribuído na fase líquida.

Constantes de velocidade K e k_u e meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$)

Como pode ser observado na curva de excreção urinária do logaritmo das velocidades de eliminação em determinado período de tempo ($\log \Delta A / \Delta t$) versus o tempo médio (tm),

apresentada na **Figura 2**, k_u pode ser calculado com a extrapolação da reta obtida no eixo das ordenadas cujo intercepto corresponde a $\log k_u.D^{100}$. A inclinação da reta, ou coeficiente angular, representa $-K/2,303$. Dessa forma, a partir da determinação das quantidades de ampicilina em cada intervalo de tempo, por voluntário, foram obtidas as **Tabelas de 17 a 20**. Nas **Tabelas 21 e 22**, estão representadas as médias dos voluntários que, por sua vez, foram empregadas na construção dos gráficos de $\log \Delta Xu/\Delta t$ versus tm ilustrados pelas **Figuras 9 e 10**. A porção retilínea das curvas individuais de cada voluntário foi estimada através do cálculo de regressão linear, obtendo-se os correspondentes coeficientes angulares e interceptos no eixo das ordenadas. MENDES e col.⁷² também adotaram esse método para o cálculo de K no estudo da biodisponibilidade de produtos contendo diclofenaco.

Uma vez que a constante de velocidade de eliminação total da ampicilina (K) é representada pela somatória das constantes de velocidade de eliminação ($K = k_u + k_m$)²⁵, em que k_u é a constante de velocidade de excreção urinária do fármaco não biotransformado e k_m , a constante de velocidade de eliminação da ampicilina biotransformada, a proximidade encontrada entre os valores de K e k_u (**Tabela 27**), constitui em uma evidência de que a eliminação da ampicilina se dá em maior parte, como inalterada, conforme o que já era esperado.

Como $t_{1/2}$ é uma constante biológica própria do fármaco que o caracteriza do ponto de vista cinético, esses resultados podem ser comparados com aqueles obtidos na literatura. Os valores obtidos de meia-vida foram de 1,67 e 1,71 horas para os produtos A e B, na forma de cápsulas e de 1,82 e 1,89 horas para os produtos A e B, na forma de suspensão, respectivamente. Tendo em vista que se apresentam dentro do intervalo de 1 a 2 horas, estão, portanto, em concordância com os resultados de HASSANZADEH⁵⁰, HAMID & BEG⁴⁸, JUSKO & LEWIS^{59, 60}.

Avaliação estatística dos resultados

Nas **Figuras 13, 15, 17 e 19**, são apresentadas as quantidades de ampicilina acumuladas recuperadas na urina de cada voluntário. A dispersão observada nas cápsulas do Laboratório B na Fase II do teste (**Figura 15**) aponta efeito do período, que foi comprovado na aplicação da ANOVA. Como já exposto, a presença do efeito de período pode acarretar na perda da sensibilidade da análise estatística. Em função disto, foi aplicado, complementarmente, o teste t pareado, para comparação das médias, método mais sensível, que revelou inexistência de diferenças significativas (nível de significância $\alpha = 0,10$) entre o produto-teste e o de referência, em todos os parâmetros estudados (**Tabelas 29 e 31**).

Em nosso planejamento experimental cada linha representa uma fase ou período sendo que os indivíduos, em cada coluna, receberam as formulações em diferentes sequências (A-B ou B-A) conforme a fase, sequência essa que foi estabelecida de forma aleatória. A análise para testar o efeito da sequência foi realizada, ou seja, verificou-se se houve diferença significativa entre administrar a formulação A primeiro e B depois (Grupo I) e administrar B na primeira fase e A na segunda (Grupo II). Para tanto calcularam-se as médias das diferenças entre os indivíduos de cada grupo que foram, então, comparadas entre os grupos. Na ausência do efeito de sequência essas diferenças devem ocorrer ao acaso, e o teste de significância (teste t pareado) deve ser aplicado para essa comparação. A conclusão dessa análise ilustrada pelas **Tabelas 28 e 30** comprova que não houve diferença significativa relativa à sequência de administração.

Numa análise que visa a comprovação da bioequivalência é necessário demonstrar que não haja diferença estatisticamente significativa entre as fontes de variação. Segundo AIACHE e col. ¹, para precisar essas interpretações, aplica-se o cálculo dos intervalos de confiança entre os dois produtos, sobre os parâmetros farmacocinéticos de interesse. A tomada de decisão sobre a bioequivalência de dois produtos é uma tarefa difícil que deve considerar vários fatores. As novas determinações do FDA (1995), estabelecendo uma "faixa de bioequivalência", facilitaram esse trabalho, com a adoção de intervalos de confiança aceitáveis. Nas recomendações oficiais, os parâmetros farmacocinéticos são calculados pelas razões das médias e não das diferenças. Uma alternativa para essa análise é a transformação dos dados em logaritmos. A diferença dos logaritmos é equivalente ao log das razões, isto é $\log B - \log A = \log (B/A)$, portanto, o antilog da diferença média dos logs é uma estimativa da razão dos parâmetros estudados.

Embora o intervalo de confiança (IC) calculado para a razão das médias das velocidades máximas na forma de cápsulas tenha se apresentado fora do limite preconizado pelo FDA ($IC = 92,9 < \mu_B/\mu_A < 127,8$), não se pode rejeitar a hipótese da bioequivalência entre os dois produtos uma vez que os outros testes estatísticos aplicados sobre todos os parâmetros estudados apontam para a bioequivalência (testes t-pareado, Mann-Whitney das **Tabelas 29 e 31**).

Quando não se consegue obter uma distribuição normal dos resultados mesmo após tratamento prévio (transformação logarítmica), devem-se adotar métodos que possam ser empregados independentemente do tipo de distribuição (métodos não paramétricos). Para complementar ou confirmar a tomada de decisão sobre a biodisponibilidade dos produtos,

além do teste t-pareado (teste paramétrico) empregou-se também o de Mann-Whitney (não paramétrico). Esse último considera o "posto médio" dos resultados, estabelecendo *ranks* para os dados obtidos, excluindo aqueles responsáveis pela assimetria da distribuição. Deve-se salientar que a sensibilidade nessa metodologia é menor que nos métodos paramétricos. A aplicação desse teste, confirmou a ausência de diferenças significativas entre os produtos A e B das cápsulas e suspensões, para todos os parâmetros farmacocinéticos estudados.

7 CONCLUSÕES

A excreção renal da ampicilina inalterada demonstrou ser a principal via de eliminação desse fármaco, conforme relatos da literatura.

As meias vidas de eliminação $t_{1/2}$ encontradas para a ampicilina variaram de 1,67 a 1,89 horas.

A proximidade encontrada entre os valores das constantes da velocidade de eliminação total K e da velocidade de eliminação renal k_u , constitui uma evidência de que a eliminação da ampicilina se dá em maior parte, como inalterada, conforme o que já era esperado.

A análise estatística aplicada nos grupos I e II de indivíduos comprovou que não houve variação devida aos grupos ou sequência na administração dos produtos ($p=0,10$).

A análise estatística empregando métodos paramétrico (teste t) e não paramétrico (teste de Mann-Whitney) para comparação das médias das quantidades de ampicilina acumulada (X_{acumul}) indicou que não existe diferença significativa ($p=0,10$) entre os produtos teste e referência quando comparadas as mesmas formas farmacêuticas.

Os intervalos de confiança para a razão das médias μ_B/μ_A das quantidades acumuladas de ampicilina para a forma de cápsulas e suspensão foram de $93,0 < \mu_B/\mu_A < 117,0$ e de $87,0 < \mu_B/\mu_A < 108,0$, respectivamente. Esses intervalos de confiança, para ambas as formas farmacêuticas, estudadas estão contidos no intervalo estabelecido pelo FDA ($80,0 < \mu_B/\mu_A < 125\%$), portanto, a hipótese de que sejam bioequivalentes aos produtos referência testados, nas mesmas formas, não pode ser rejeitada.

Os intervalos de confiança para a razão das médias μ_B/μ_A das velocidades máximas de excreção de ampicilina para a forma de cápsulas e suspensão foram de $92,9 < \mu_B/\mu_A < 127,8$ para cápsulas e de $94,1 < \mu_B/\mu_A < 114,6$, para a forma de suspensão. No caso das cápsulas, esse intervalo de confiança encontra-se fora daquele especificado na Farmacopéia Americana 23 ed., entretanto, os demais testes aplicados constituem evidências que apontam pela bioequivalência dos produtos A e B.

A recuperação de ampicilina inalterada na urina dos voluntários variou de 54, 5% a 58,9 % da dose administrada, sendo de 272, 50 mg (Laboratório A) e 294,40 mg (Laboratório B) para a forma cápsulas e de 289,02 mg (Laboratório A) e 272,81 mg (Laboratório B) para suspensão, concluindo-se que pelo menos 50% da dose administrada foi absorvida.

A metodologia empregada comprovou boa exatidão e seletividade. Apresentou grande simplicidade operacional, rapidez e custo reduzido, sendo adequada à análise de grande número de amostras, características estas, vantajosas em relação às outros métodos analíticos como por exemplo a cromatografia líquida de alta eficiência e o método microbiológico, que,

embora altamente seletivos, envolvem equipamentos muito sofisticados ou grande dificuldade operacional.

Os dados de excreção urinária obtidos após administração de doses orais de ampicilina comprovaram que é possível estudar a bioequivalência entre produtos eliminados preferencialmente por essa via, constituindo metodologia simples, não invasiva.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

*De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1994.

1. AIACHE, J. M., AIACHE, S. - Biodisponibilité comparative de deux formes galéniques orales d'ampicilline: gélule et suspension. *J. Pharm. Belg.*, Bruxelles, v. 36, n. 5, p. 325-331, 1981.1.
2. ALI, A. A., FAROUK, A. - Comparative studies on the bioavailability of ampicillin anhydrate and trihydrate. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 239-243, 1981.6.
3. ALI, H. M. - Bioequivalence studies on two brands of bacampicillin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 91-95, 1981.2.
4. ALI, H. M. - Comparative bioavailability of eight brands of ampicillin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 301-306, 1981.4.
5. ALI, H. M. - The effect of sudanese food and chloroquine on the bioavailability of ampicillin from bacampicillin tablets. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 185-190, 1981.3.
6. ALI, H. M., FAROUK, A. M. - The effect of sudanese diet on the bioavailability of ampicillin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 6, n. 3-4, p. 301-306, 1980.5.
7. ALI, H. M., FAROUK, A., KHALIL, S. A. H., EL-NAKEEB, M. A. - Correlation between microbiological and chemical assay of ampicillin in bioequivalence studies in man. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 233-238, 1981.
8. ANDERSON, S., HAUCK, W. W. - Consideration of individual bioequivalence. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, New York, v. 18, n. 3, p. 259-273, 1990.
9. ANDRADE, L. ORTIZ, S., FIRMANI, F., CID, E. - Biodisponibilité de trois produits commerciaux d'ampicilline. *Annales Pharm. Franç.*, Paris, v. 36, n. 11-12, p. 639-644, 1978.
10. ANGELUCCI, L., BALDIERI, M. - The spectrophotometric determination of ampicillin in body fluids. *J. Pharm. Pharmacol.*(Letters to the editor), London, v. 23, Letters to the editor, p. 471-472, 1971.
11. ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. - Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, 6 ed. Malvern: Williams & Wilkins, 1995. p. 61-98.
12. ARANCÍBIA, A. - Calidad Biofarmacéutica. Estudios "in vitro" e "in vivo". *Acta Farm. Bonarense*, Buenos Aires, v. 10, n. 2, p. 123-133, 1991.

13. BAKER, B. A., REYNOLDS, J. R., GLECKEL, L., A'ZARY, E., BODENHEIMER, M. M. - Comparative bioavailability of two oral sustained-release procainamide products. *Clin. Pharm.*, Bethesda, v. 7, n. 2, p. 135-138, 1988.
14. BARR, W. H., GERBRACHT, K. M., LETCHEN, K., PLAUT, M., STRAHL, N. - Assessment of the biologic availability of tetracycline products in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 13, p. 97-108, 1972.
15. BLANCHARD, J. - Gastrointestinal absorption II. Formulations factors affecting drug bioavailability. *Amer. J. Pharm.*, Philadelphia, v. 150, n. 5, p. 132-151, 1978.
16. BLOUIN, R. A., CLIFTON, G. D., ADAMS, M. A., FOSTER, T. S., FLUECK, J. - Biopharmaceutical comparison of two levothyroxine sodium products. *Clin. Pharm.*, Bethesda, v. 8, n. 8, p. 588-592, 1989.
17. BOIS, F. Y., TOZER, T. N., HAUCK, W. W., CHEN, M., PATNAIK, R., WILLIAMS, R. L. - Bioequivalence: performance of several measures of extend of absorption. *Pharm. Res.*, New York, v. 11, n. 5, p. 715-722, 1994.
18. BOLTON, S. - *Pharmaceutical statistics*. New York: Marcel Dekker, 1984. 526 p.
19. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationary Office, 1968. p. 46-47.
20. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationary Office, 1993. p. 40-42, 625-626, 721-760.
21. BUNDGAARD, H. - Spectrophotometric determination of ampicillin sodium in the presence of its degradation and polymerization products. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 26, n. 10, p. 385-392, 1974.
22. CELLETTI, P., MORETTI, G.P., PETRANGELI, B. - Nuovi metodi per la determinazione chimica dell'ampicillina e della cloxacillina in singolo ed in associazione. Applicazione in circuiti automatici. *Il Farmaco*, Pavia, v. 27, n. 12, p. 688-698, 1972.
23. CHIOU, W. L. - Determination of physiological availability of commercial phenylbutazone preparations. *J. Clin. Pharmacol.*, Stamford, v. 12, n. 7, p. 296-299, 1972.

24. CID CARCAMO, E. *Cinética de dissolução de medicamentos*. Washington: OEA, 1981. 102 p.
25. CID CARCAMO, E. *Introducción a la farmacocinética*. Washington: OEA, 1982. 114 p.
26. CID, E. - Absorption rectale de médicaments. Influence de la taille des cristaux d'acide acétylsalicylique. *Annales Pharm. Franç.*, Paris, v. 32, n. 5, p. 273-281, 1974.
27. CLARKE'S isolation and identification of drugs. 2 ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p. 965-966.
28. CODE of Federal Regulations. Title 21. Washington: US Government Printing Office, 1992. p. 140-159.
29. DAS, S., GUPTA, B. K. - Simulation of physiological pH-time profile in "in vitro" dissolution study: relationship between dissolution rate and bioavailability of controlled release dosage form. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, Hamilton, v. 14, n. 4, p. 537-544, 1988.
30. De VITO, J. M., KOZLOSKI, G. D., TONELLI, A. P., JOHNSON, J. B. - Bioequivalence of oral and injectable levoleucovorin and leucovorin. *Clin. Pharm.*, Bethesda, v. 12, n. 4, p. 293-299, 1993.
31. DOLLERY, C. *Therapeutic drugs.*, v. 1. Edinburg: Churchill Livingstone, 1991. p. A117-A121.
32. DUGAL, R., BRODEUR, J., CAILLÉ, G. - Ampicillin systemic bioavailability: the influence of dosage forms. *J. Clin. Pharmacol.*, Stamford, v. 14, n. 10, p. 513-519, 1974.
33. EDICON CID C. - Conceptos básicos sobre biodisponibilidad en medicamentos. *SAFYBI*, Buenos Aires, v. 27, n. 72, p. 2361-2366, 1987.
34. EHRNEBO, M. NILSSON, S., BOREUS, L. O. - Pharmacokinetics of ampicillin and its prodrugs bacampicillin and pivampicillin in man. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, New York, v. 7, n. 5, p. 429-451, 1979.
35. FARMACOPÉIA brasileira, 2. ed., São Paulo: Gráfica Siqueira, 1959, p. 323-324.

36. FERRAZ, H. G. - Fatores determinantes da dissolução de formas farmacêuticas sólidas - parte I: formulação e tecnologia de fabricação. *Infarma*, Brasília, v. 3, n. 1/6, p. 17-19, 1994.
37. FLOREY, K. - *Analytical profiles of drug substances*. v. 2. New York: Accademic Press, 1973. p.34-61.
38. FLORNOY, D. J. - Ampicillin/Sulbactam. *Medicamentos del actualidad*, Barcelona, v. 1, n. 3, p.169-174, 1988.
39. GAI, M. N., PEZOA, R., CORBEAUX, J., ARANCÍBIA, A. - Design and evaluation of a controlled-release theophylline tablet. Preliminary communication. *Farmaco*, Pavia, v. 44, n. 11, p. 1119-1126, 1989.
40. GALLARDO, V., RUIZ, M. A., PARERA, A., DELGADO, A. - Estudio farmacotécnico de granulados: factores que influyen en el proceso de liberación. *Rev. O.F.I.L.*, Madrid, v. 1, n. 4, 1991.
41. GIBALDI, M. - *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics*, 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 352 p.
42. GLAZKO, A. J., KINKEL, A. W., ALEGNANI, W. C., HOLMES, E. L. - An evaluation of the absorption characteristics of different chloranphenicol preparations in normal human subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 9, n. 4, p. 472-483, 1968.
43. GONZALES, M. S., RETACO, P., PIZZORNO, M. T., VOLONTÉ, M. G. - Estudio comparativo de dissolução de comprimidos de clorhidrato de propranolol. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 79-83, 1995.
44. GORDON, M. S., RUDARAJU, V. S., RHIE, J. K., CHOWHAN, Z. T. - The effect of aging on the dissolution of wet granulated tablets containing super disintegrants. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 97, n. 11, p. 119-131, 1993.
45. GOYANES, L., STEEMAN, G., BREGNI, C., QUIROGA, G. - Diseño y evaluación de un comprimido de liberación diferencial de amoxicilina-piroxicam. *Rev. O.F.I.L.*, Madrid, v. 1, n. 4, p. 223-226, 1991.
46. HAGINAKA, J., WAKAI, J. - High-performance liquid chromatographic assay of ampicillin, amoxicillin and ciclacillin in serum and urine using a pre-column reaction

- with 1,2,4-triazole and mercury (II) chloride. *Analyst*, London, v. 110, n. 11, p. 1277-1281, 1985.
47. HAGINAKA, J., WAKAI, J. - Liquid chromatographic determination of ampicillin and its metabolites in human urine by postcolumn alkaline degradation. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 39, n. 1, p. 5-8, 1987.
48. HAMID, S., BEG, A. E. - Influence of ethnic diets on ampicillin bioavailability and pharmacokinetics in healthy pakistani subjects. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, Warsaw, v. 39, n. 4, p. 337-342, 1987.
49. HASHIM, F., EL-DIN, E. Z. - Effect of some excipients on the dissolution of phenytoin and acetazolamide from capsule formulations. *Acta Pharm. Fenn.*, Helsinki, v. 98, p. 197-204, 1989.
50. HASSANZADEH, M. K. - Quantitative evaluation of different dosage forms of ampicillin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, Hamilton, v. 17, n. 3, p. 1795-1810, 1991.
51. HILL, S. A., JONES, K. H., SEAGER, H., TASKIS, C. B. - Dissolution and bioavailability of the anhydrate and trihydrate forms of ampicillin. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 27, n. 8, p. 594-598, 1975.
52. HITZENBERGER, G., WITTEICH, P. E., JASCHEK, I., KORN, A., BONELLI, J., MAGOMETSCHNIGG, D. - Comparative bioavailability of oral ampicillin suspension, pivampicillin hydrochloride salt (capsule), pivampicillin pamoate salt (suspension) and pivampicillin probenecid salt (tablet) in man. In: WILLIAMS, J. D., Geddes, A. M., eds. *Chemotherapy*. New York: Plenum Press, 1975. v. 4, p. 205-211. [Congresso Internacional de Quimioterapia 9., 1975].
53. HORVITZ, R. A. - More on bioavailability and generics. *Drug Ther.*, New York, v. 5, n. 9, p. 125-130, 1975.
54. HOU, J. P., POOLE, J. W. - β -lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 60, n. 4, p. 503-532, 1971.
55. HURWITZ, A. R., CARNEY, C. F. - Enhancement of ampicillin partition behavior. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 67, n. 1, p. 138-140, 1978.
56. JACKSON, A. J. - *Generics and bioequivalence*. Rockville: CRC, 1994. 203 p.

57. JIMENEZ, F. A., SANCHES-MORCILLO, J., SELLES, E. - Influencia de los coadjuvantes en la biodisponibilidad de la ampicilina oral: Urea.I. *Farm. Clín.*, Barcelona, v. 1., n. 8, p. 639-652, 1984.
58. JIMENEZ, F. A., SANCHES-MORCILLO, J., SELLES, E. - Influencia de los coadjuvantes en la biodisponibilidad de la ampicilina oral: I. Celulosa microcristalina. *Farm. Clín.*, Barcelona, v. 1., n. 7, p. 565-569, 1984.
59. JUSKO, W. J., LEWIS, G. P. - Comparison of ampicillin and hetacillin pharmacokinetics in man. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 62, n. 1, p. 69-76, 1973.
60. JUSKO, W. J., LEWIS, G. P., SCMITT, G. W. - Ampicillin and hetacillin pharmacokinetics in normal and anephric subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 14, n. 1., p. 90-99, 1972.
61. KAMPMANN, J. P., KLEIN, H., LUMHOLTZ, B., HANSEN, J. E. M. - Apicillin and propylthiouracil pharmacokinetics in intestinal bypass patients followed up to a year after operation. *Clin. Pharmacokin.*, Bethesda, v. 9, n. 2, p. 168-173, 1984.
62. KNOBEN, J. E., SCOTT, G. R., TONELLI, R. J. - An overview of the FDA publication approved drug products with therapeutic equivalence evaluations. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Washington, v. 47, n. 12, p. 2696-2700, 1990.
63. LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. A. , KANIG, J. L. - *The theory and practice of industrial pharmacy*. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 171-192.
64. LANBECK-VALLEN, K., CARLQVIST, J., NORDGREN, T. - Determination of ampicillin in biological fluids by coupled-column liquid chromatography and post-column derivatization. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 567, n. 1, p. 121-128, 1991.
65. Le HIRR, A. - *Farmácia Galenica*. Barcelona: Masson, 1995. p. 281-296.
66. LEES, K. A. - Fine particles in pharmaceutical practice: clinical and pharmacological aspects. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 15, Suppl., p. 43T-55T, 1963.
67. LEVY, G. - Effect of particle size on dissolution and gastrointestinal absorption rates of pharmaceuticals. *Amer. J. Pharm.*, Philadelphia, v. 135, n. 3, p. 78-93, 1963.
68. LEWIS, G. P., JUSKO, W. J. Pharmacokinetics of ampicillin in cirrosis. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 18, n. 4, p. 475-484, 1975.

69. LIN, S., KAO, Y., CHANG, H. - Preliminary evaluation of the correlation between in vitro release and in vivo bioavailability of two aminophylline slow release tablets. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 79, n. 4, p. 326-330, 1990.
70. LOPEZ, H. G., ZARATE, J. V. O., TELLES, C. A. - Biodisponibilidad relativa de cuatro formas de presentación de ampicillina trihidrato de 500 mg. *Rev. Col. Cien. Quím. Farm.*, Bogotá, v. 19, n. 19, p. 15-19, 1991.
71. MARTINDALE, W. H. - *The extra pharmacopeia*. 29. ed. London: Pharmaceutical Press, 1989. p. 116-122.
72. MENDES, G. B. B., FRANCO, L. M., MORENO, R. A., FERNANDES, A. G., MUSCARÁ, M. N. DE NUCCI, G. - Comparative bioavailability of two suspension formulations of potassium diclofenac in healthy male volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* v. 32, n. 3, p. 131-135, 1994.
73. MERCK index - 11. ed. Rahway, 1989. p. 622.
74. METZLER, C. M. - Bioavailability/bioequivalence: study design and statistical issues. *J. Clin. Pharmacol.*, Stamford, v. 29, n. 4, p. 289-292, 1989.
75. MONTELEONE, P. M., VASILJEV, M. K., BOMSTEIN, J. - Spectrophotometric determination of ampicillin in presence of hetacillin. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 62, n. 11, p. 1830-1833, 1973.
76. MURAI, Y., NAKAGAWA, T., YAMAOKA, K., UNO, T. - Comparative pharmacokinetics of dicloxacillin and ampicillin between individual and combined doses. *J. Pharm. Dyn.*, Tokio, v. 7, n. 1, p. 33-42, 1984.
77. MURTHY, K., S., GHEBRE-SELLASSIE, I. - Current perspectives on the dissolution stability of solid oral. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 82, n. 2, p. 113-126, 1993.
78. MUSCARÁ, M. N., DE NUCCI, G. - Bioavailability of four pharmaceutical formulations of metronidazole tested on normal healthy volunteers. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 24, n. 2., p. 1251-1260, 1991.
79. NEEDHAM, T. E., JAVID, P., BROWN, W. - Bioavailability and dissolution parameters of seven lithium carbonate products. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 68, n. 8, p. 952-954, 1979.

80. OGUNBONA, F. A., AKANNI, A. O. - Comparative bioavailability studies on some brands of ampicillin capsules. *Pharmazie*, Berlin, v. 40, H. 7, p. 479, 1985.
81. OHLWEILER, O. A. Química analítica quantitativa. 2 ed. v.2 Rio de Janeiro: Livros Técnicos, 1976, p. 717-718.
82. PABST, G., JAEGERE, H. - Review of methods and criteria for evaluation of bioequivalence studies. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 38, n. 1, p. 5-10, 1990.
83. PENG, G. W., CHIOU, W. L. - Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 531, p. 3-50, 1990.
84. PRISTA, L. N., PINHO, A. A., MORGADO, R. R. - Sobre a velocidade de absorção de sais de ácidos fracos administrados por via oral. *Rev. Port. Farm.*, Lisboa, v. 32, n. 1, p. 1-6, 1982.
85. PUCK, J., SOEP, H., FRAUX, J. L. - In vivo comparison of two galenic forms of ampicillin-trihydrate. *Chemotherapy*, Basel, v. 21, n. 1, p. 11-18, 1975.
86. REFI Repertório farmacéutico italiano. 4. ed. Milano: Associazione Nazionale dell'Industria Farmacéutica, 1990. p. A59-A61, A150-A151, A800-A802, A1280 - A1281, A1453-1454.
87. REMINGTON'S pharmaceutical sciences, 18. ed. Easton: Mack, 1990. p. 1186-1187.
88. RITSCHER, W. A. - Handbook of basic pharmacokinetics, 4. ed. Hamilton: Drug Intelligence, 1992. 588 p.
89. ROSENCWEIG, M. STAQUET, M., KLASTERSKY, J. - Antibacterial activity and pharmacokinetics of bacampicillin and ampicillin. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 19, n. 5 (Part I), p. 592-597, 1975.
90. ROWLAND, M., TOZER, T. N. - *Clinical Pharmacokinetics: concepts and applications*, 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1995. 601 p.
91. SANCHEZ-MORCILLO, J., CEREZO, A., SUÑE, J. M. - Estudios de dissolución "in vitro" en comprimidos de dexametasona. *Boll. Chim. Farm.*, Milano, v. 114, n. 8, p.457-467, 1975.

92. SANTORO, M. I. R. M., HACKMANN, E. R. M., VELASCO, M. V. R., CONSIGLIERI, V. O., MARTINS, J. L. S., GALLO, M. E., STORPIRTIS, S., SAKUDA, T. M., YAMAMOTO, R. N. - Dissolução de medicamentos no Brasil: urgência na padronização. *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v. 72, n. 1, p. 11-12, 1991.
93. SANTOS, S. R. C. J. & STORPIRTIS, S. *Cromatografia líquida de alta eficiência aplicada à terapêutica*. Apostila. Curso promovido pelo Centro Avançado de Estudos em Farmacologia Clínica, Fundação Hemocentro, HC-FMUSP. 106 p., 1990.
94. SJÖVALL, J. SJÖVIST, R., HUITFELDT, B., NYQVIST, H. - Correlation between the bioavailability of microencapsulated bacampicillin hydrochloride in suspension and "in vitro" microcapsule dissolution. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 73, n. 2, p. 141-145, 1984.
95. SMITH, J. W. G., DE GREY, G. E., PATEL, V. T. - The spectrophotometric determination of ampicillin. *Analyst*, London, v. 92, n. 1093, p. 247-252. 1967.68.
96. SMITH, M. C. - The pharmacist and generic drugs - a study of ampicillin. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, New York, v. NS 12, n. 10, p. 511-515, 1972.
97. SNEDECOR, G. W., COCHRAN, W. G. - Statistical methods, 8 ed. Iowa: University Press, 1989. 503 p.
98. STAVCHANSKY, S., PEARMAN, R. S., HARKEN, D. R. V., SMYTH, R., HOTTENDORF, G. H., MARTIN, A., NEWBURGER, J., SCHNEIDER, L. W. - Evaluation of the bioavailability of sarpicillin, the methoxymethylester of hetacillin in humans. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 73, n. 2, p. 169-173, 1984.
99. STOCK, F. G. - The spectrophotometric estimation of total penicillins by conversion to penicillenic acid and the importance of copperin controlling the reaction. *Analyst*, London, v. 79, n. 11, p. 662-671, 1954.
100. STORPIRTIS, S. - *Alterações na depuração plasmática e na excreção renal de antipirina e seus produtos de biotransformação em pacientes portadores de hepatopatias*. São Paulo, 1992. 146 p. [Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
101. STORPIRTIS, S. - Fundamentos científicos e conceitos utilizados em farmacocinética, biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. 7p. [Trabalho apresentado no

Simpósio: Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos. São Paulo, USP e SINDUSFAR, 1994].

102. STORPIRTIS, S. - Biofarmácia e farmacocinética: ensino e pesquisa. *Infarma*, São Paulo, Julho-Agosto, p. 19-20, 1993.
103. STORPIRTIS, S., CONSIGLIERI, V. O. - Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 63-70, 1995.
104. TANIGANARA, Y. YAMAOKA, K., NAKAGAWA, T., UNO, T. - Moment analysis for the separation of mean "in vivo" disintegration, dissolution, absorption, and disposition time of ampicillin products. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 71, n. 10, p. 1129-1133, 1982.
105. TAYLOR, T., O'KELLY, D. A., DARRAGH, A., CHASSEAUD, L.F. - Bioavailability of ampicillin measured after repeated oral doses. *Pharm. Ind.*, Shanghai, v. 40, n. 2, p. 155-156, 1978.
106. TESSLER, J. - Biodisponibilidad. *S.A.F.Y.B.I.*, Buenos Aires, v. 20, n. 54, p. 1490-1495, 1980.
107. TOON, S. - Relevance of pharmacokinetics studies in volunteers. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v. 25, n. 4, p. 259-262, 1993.
108. TSUJI, A. NAKASHIMA, E., HAMANO, S., YAMANA, T. - Physicochemical properties of amphoteric β -lactam antibiotics I: stability, solubility, and dissolution behavior of aminopenicillins as a function of pH. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 67, n. 8, p. 1059-1066, 1978.
109. UNITED States pharmacopeia. 22. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990. p. 87-95.
110. UNITED States pharmacopeia. 23. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p. 107-113, 1924-1938.
111. VENTURA, P. PRIA, R., SCURI, R. - Determinazione quantitativa di sobrerolo ed ampicillina in materiali biologici umani. I. Metodiche analitiche. *Boll. Chim. Farm.*, Milano, v. 121, n. 12, p. 648-657, 1982.

112. VERNENGO, M. - *Elementos técnicos de una política de medicamentos genéricos*. Geneve: Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud, 1993. 47 p.
113. VILA-JATO, J. L., CARRO, R. C., PEREZ-LANZAC, J. C. L. - Estudio en el hombre de la excreción urinaria de ampicilina en cuatro formas de dosificación. *Il Farmaco*, Pavia, v. 28, n. 1, p. 49-63, 1972.
114. VOIGT, R. - *Tratado de tecnologia farmaceutica*. Zaragoza: Acribia, 1982. p. 662-701.
115. WAGNER, J. G. - Pharmacokinetic data: pharmacokinetic parameters estimated from intravenous data by uniform methods and some of their uses. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, New York, v. 5, n. 1, p. 161-182, 1977.
116. WELLING, P. G., HUANG, H., KOCH, P. A., CRAIG, W. A., MADSEN, P. O. - Bioavailability of ampicillin and amoxicillin in fasted and nonfasted subjects. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 66, n. 4, p. 549-552, 1977.
117. WHYATT, P. L., SLYWKA, G. W. A., MELIKIAN, A. P., MEYER, M. C. - Bioavailability of 17 ampicillin products. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 65, n. 5, p. 652-656, 1976.
118. WOODWARD, R. B., NEUBERGER, A., TRENNER, N. R. In: CLARKE, H. T., JOHNSON, J. R., ROBINSON, R. *The chemistry of penicillins*. New Jersey: Princeton University, 1949, p. 422-436.
119. WOOLEN, R. L., RUBIN, A., RODDA, B. E., RIDOLFO, A. S., GRUBER, C. M. - Problems associated with bioavailability and dosage regimen studies in man. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, New York, v. 2, n. 4, p. 365-377, 1974.

9 RESUMO

A avaliação biofarmacêutica de formas farmacêuticas contendo ampicilina foi realizada em dois lotes de cápsulas e dois de suspensão oral. O estudo da bioequivalência seguiu delineamento experimental cruzado, com dois períodos, empregando 16 voluntários de ambos os sexos (7 homens e 9 mulheres), com idades entre 21 e 26 anos (média de 23 anos) e peso entre 48 e 105 Kg (média de 68,2 Kg), dentro do intervalo de 10 % do peso ideal. Exames clínicos e laboratoriais foram realizados para selecionar os voluntários, sendo excluídos aqueles que apresentaram alguma alteração nos parâmetros clínicos normais ou com histórico de reação alérgica às penicilinas e, ainda, os indivíduos que estivessem fazendo uso de medicamentos a menos de uma semana da realização do estudo. O protocolo experimental foi aprovado previamente pela Comissão de Ética do Hospital Universitário (HUUSP).

Os ensaios de bioequivalência foram efetuados em períodos distintos para cada forma farmacêutica, com uma semana de intervalo. No dia dos testes e após jejum de 12 horas, os voluntários foram divididos em dois grupos com igual número de indivíduos, sendo que, a cada grupo foi administrada dose única de 500 mg de ampicilina de lotes diferentes. Após período de *wash out* de 48 horas, a administração dos produtos aos grupos foi invertida para que todos os indivíduos recebessem ambos os produtos.

A determinação quantitativa da ampicilina foi realizada em amostras de urina coletadas num período de doze horas, aplicando o método espectrofotométrico, com leituras a 320 nm, após reação a 70° C em solução tampão fosfato/sulfato de cobre por 30 minutos.

Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram: quantidade acumulada de ampicilina na urina ($X_{uacumul}$), velocidade máxima de excreção urinária ($V_{máx}$), tempo no qual essa velocidade foi atingida ($t_{máx}$), constantes de velocidade de eliminação (K) e de excreção urinária (k_u) e a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$).

A recuperação de ampicilina inalterada na urina variou de 54,5 a 58,9 % e de 54,6 a 57,8 % das doses administradas para cápsulas e suspensão, respectivamente; a meia-vida média calculada foi de 1,9 h para cápsulas e de 1,7 h para suspensão. Os intervalos de confiança ($\alpha = 0,10$) calculados para a razão das médias das quantidades acumuladas de ampicilina estão contidos no limite de 80 a 120 %.

A análise estatística dos resultados aplicando métodos paramétrico (ANOVA) e não paramétrico (Mann-Whitney), conforme as normas preconizadas pelo FDA, comprovou que não há diferenças significativas (nível de significância de 90 %) entre os produtos A e B quanto aos parâmetros estudados.

10 SUMMARY

A biopharmaceutic quality evaluation of two brands of ampicillin capsule and suspension dosage forms is presented. The bioequivalence study was based on an open randomized two-period crossover design with 7 male and 9 female healthy volunteers, aged 21 to 26 years (mean 23 yr) with body weights ranging from 48 to 105 Kg (mean 68,2 Kg) and within 10 % of the ideal body weight. All subjects passed by routine clinical and laboratory examinations. The volunteers had no histories of allergic reaction to penicillins and no other drugs were taken for at least 1 week before starting the study. The clinical protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital (HUUSP).

Studies were conducted separately for each dosage form after 1 week interval. On the day of the study, following an overnight fast, subjects were divided into two groups, each receiving 500 mg single dose of one of the two ampicillin dosage form. After a 2-day washout period, the same products were given in inversed order.

Ampicillin data were obtained from urine samples collected over a 12 hour period. A spectrophotometric measurement at 320 nm after reaction in copper-phosphate/sulfate buffer solution at 70°C for 30 minutes was used.

Total cummulative urinary excretion ($X_{uacumul}$), urinary excretion rates (V_{max}), time to peak (t_{max}), urinary excretion rate constants (k_u), elimination rate constants (K), and elimination half lives ($t_{1/2}$) were calculated.

Mean urine unchanged ampicillin recoveries of administered doses ranged from 54,5 to 58,9 % for capsules and from 54,6 to 57,8% for suspensions; $t_{1/2}$ ranged from 1,7 to 1,9 h. Confidence intervals ($\alpha=0,10$) for average rates were within 80-120 %.

Statistic parametric (ANOVA) analysis and non-parametric analysis (Mann-Whitney) showed non-significance differences on the studied parameters of the two products at 90% significance level, according to FDA regulations.