

*ANDRÉ TASSO DANTAS SANFELICE*

**BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE  
DUAS FORMULAÇÕES DE RAMIPRIL EM  
VOLUNTÁRIOS HUMANOS SADIOS APÓS  
ADMINISTRAÇÃO DE DOSE ÚNICA**

*CAMPINAS*

*2005*

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
Sa57b

V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 70794  
PROC. 16.123.06  
C \_\_\_\_\_ D X  
PREÇO 4,00  
DATA 05/12/06  
BIB-ID 393060

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**  
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa57b	<p>Sanfelice, André Tasso Dantas Biodisponibilidade comparativa de duas formulações de ramipril em voluntários sadios após administração de dose única / André Tasso Dantas Sanfelice. Campinas, SP : [s.n.], 2005.</p> <p>Orientador : Gilberto De Nucci Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Ramipril. 2. Bioequivalência. 3. Cromatografia Líquida. 4. Espectrometria de Massa. 5. Cromatografia líquida de alta pressão. I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(Slp/fcm)</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Título em inglês: *Comparative bioavailability of two ramipril formulations in health human volunteers after a single dose administration***

- Keywords:**
- Ramipril
  - Bioequivalence
  - Chromatography, liquid
  - Tandem Mass Spectrometry
  - Chromatography, high pressure performance

**Área de concentração: Clínica médica**

**Titulação: Mestrado**

**Banca Examinadora: Prof. Dr. Gilberto De Nucci  
Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad  
Prof. Dr. Dárcio Gomes Pereira**

**Data de Defesa: 20/12/2005**

*ANDRÉ TASSO DANTAS SANFELICE*

**BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE  
DUAS FORMULAÇÕES DE RAMIPRIL EM  
VOLUNTÁRIOS SADIOS APÓS  
ADMINISTRAÇÃO DE DOSE ÚNICA**

*Dissertação apresentada à Pós-graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de  
Mestre em Clínica Médica, área de concentração  
Ciências Básicas*

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

**CAMPINAS**

**2005**

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a): Prof. Dr. Gilberto de Nucci**

---

---

**Membros:**

---

1. Prof(a). Dr(a).Dárcio Gomes Pereira



2. Prof(a). Dr(a). Mário José Abdalla Saad



3. Prof(a). Dr(a). Gilberto De Nucci



---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 20/12/2005**

---



*Dedico essa dissertação a Deus, aos meus pais e familiares que me apoiaram,  
e a todos que contribuíram para o meu aprendizado.*



## **AGRADECIMENTOS**

---

**Minha Família**, pelo carinho e pelo constante apoio durante o período da pós-graduação.

**Dr. Gilberto De Nucci**, meu orientador, por ter me aceitado como aluno de pós-graduação.

**Dr. José Luis Donato**, pela recepção no laboratório de farmacologia da Unicamp.

Aos Doutores **Dárcio Gomes Pereira** e **Mário José Abdalla Saad** por aceitarem participar da Banca Examinadora.

Aos meus amigos, pela amizade, pela força e pelo apoio que me deram durante o curso.

A aluna de Doutorado **Lurdes**, pela gentileza em ter colaborado com a transmissão dos conhecimentos.

Ao amigo **Gustavo Mendes** por ter colaborado com a realização do trabalho.

Aos amigos **Luis**, **Giovanni** e **Juan**, pela amizade, companheirismo e pelo apoio nesta importante etapa acadêmica.

Em especial ao amigo **Demétrius**, pela amizade, pela colaboração, pelos ensinamentos e pelo apoio constante em todas as horas.



	<i>Pág.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxvii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xxxi</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	35
<b>1.1- Bioequivalência</b> .....	37
1.1.1- Parâmetros para Avaliação da Bioequivalência.....	39
<b>1.2- Ramipril</b> .....	41
1.2.1- Farmacologia Clínica.....	42
1.2.2- Farmacocinética.....	43
1.2.2.1- Absorção e Distribuição.....	43
1.2.2.2- Metabolismo e Eliminação.....	43
1.2.3- Relação Concentração Efeito.....	44
1.2.4- Uso Terapêutico.....	45
1.2.5- Mecanismo de Ação.....	45
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	49
<b>2.1- Objetivo Geral</b> .....	51
<b>2.2- Objetivo Específico</b> .....	51
<b>3- MATERIAIS</b> .....	53
<b>3.1- Desenvolvimento e Validação da Metodologia Bioanalítica</b> .....	55
3.1.1- Produtos Químicos e Reagentes.....	55



<b>4- METODOLOGIA.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1- Desenvolvimento e Validação da Metodologia Bioanalítica.....</b>	<b>61</b>
4.1.1- Preparo das Soluções Padrão.....	61
4.1.2- Soluções Padrões de Ramipril e Ramiprilato.....	61
4.1.3- Solução Padrões Internos Enalapril e Enalaprilato.....	61
4.1.4- Soluções de Trabalho.....	61
4.1.4.1- Solução de Fase Móvel – metanol/água (50/50) + ácido trifluoracético 13 mM + acetato de amônio 2.5mM.....	62
4.1.4.2- Solução de lavagem: solução aquosa de ácido clorídrico (10mM).....	62
4.1.5- Preparo dos padrões da curva de calibração.....	62
4.1.6- Preparo dos controles de qualidade.....	64
<b>4.2- Preparo da Corrida Analítica.....</b>	<b>65</b>
4.2.1- Extração das amostras.....	65
4.2.2- Condições Cromatográficas.....	66
4.2.3- Condições do Espectrômetro de Massas.....	66
<b>4.3- Validação do Método de Quantificação.....</b>	<b>67</b>
4.3.1- Especificidade.....	67
4.3.2- Validação da Curva de Calibração/Linearidade.....	68
4.3.2.1- Determinação do Limite de Quantificação.....	68
4.3.2.2- Linearidade.....	69
<b>4.4- Precisão e Exatidão.....</b>	<b>69</b>
4.4.1- Determinação das Concentrações dos Controles de Qualidade.....	70
4.4.2- Precisão e Exatidão Intralote.....	70
4.4.3- Precisão e Exatidão Interlote.....	71



<b>4.5- Recuperação.....</b>	<b>71</b>
<b>4.6- Testes de Estabilidade.....</b>	<b>72</b>
4.6.1- Estabilidade Pós-Processamento.....	73
4.6.2- Estabilidade com Ciclos de Congelamento Degelo.....	73
4.6.3- Estabilidade de Curta Duração à Temperatura Ambiente.....	74
4.6.4- Estabilidade de Longa Duração.....	74
4.6.5- Estabilidade da Solução Padrão (Estoque).....	75
<b>4.7- Etapa Clínica.....</b>	<b>75</b>
4.7.1- Aspectos Gerais do Estudo.....	75
4.7.2- Critérios de inclusão dos voluntários.....	76
4.7.3- Critérios de Exclusão.....	77
4.7.4- Entrada do Voluntário no Estudo.....	78
4.7.5- Restrição dos Voluntários.....	78
4.7.6- Critérios de Retirada do Estudo.....	79
4.7.7- Efeitos Adversos.....	79
<b>4.8- Protocolo Experimental.....</b>	<b>79</b>
4.8.1- Coleta de Amostras.....	79
4.8.2- Aspectos Éticos.....	80
4.8.2.1- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	80
4.8.2.2- Confidencialidade.....	80
<b>4.9- Análise Farmacocinética e Estatística.....</b>	<b>81</b>
<b>5- RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
<b>5.1- Especificidade.....</b>	<b>85</b>
5.1.1- Determinação do Limite de Quantificação.....	88



<b>5.2- Linearidade.....</b>	<b>89</b>
<b>5.3- Precisão e Exatidão.....</b>	<b>91</b>
5.3.1- Precisão e Exatidão Intralote.....	91
5.3.2- Precisão e Exatidão Interlote.....	92
<b>5.4- Recuperação.....</b>	<b>93</b>
<b>5.5- Estabilidade.....</b>	<b>94</b>
5.5.1- Estabilidade com Ciclos de Congelamento e Degelo.....	94
5.5.2- Estabilidade de Curta Duração.....	95
5.5.3- Estabilidade de Longa Duração.....	96
5.5.4- Estabilidade da Solução Padrão (Estoque).....	97
<b>5.6- Análise Farmacocinética e Estatística.....</b>	<b>98</b>
<b>6- DISCUSSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>7- CONCLUSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>
<b>9- ANEXOS.....</b>	<b>119</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>121</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>123</b>
<b>Anexo III.....</b>	<b>131</b>
<b>Anexo IV.....</b>	<b>133</b>
<b>Anexo V.....</b>	<b>181</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>ASC</b>	Área sob a curva de concentração
<b>ASC<sub>0-t</sub></b>	Área sob a curva de concentração de 0 a t (h)
<b>ASC<sub>0-∞</sub></b>	Área sob a curva de concentração de 0 a infinito (h)
<b>C<sub>max</sub></b>	Concentração máxima
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Tempo de meia vida
<b>T<sub>max</sub></b>	Tempo de concentração máxima
<b>ECA</b>	Enzima conversora de angiotensina
<b>n°</b>	Número
<b>g/mol</b>	Gramas por mol
<b>mg</b>	miligrama
<b>µg.l<sup>-1</sup></b>	Micrograma por litro
<b>%</b>	Porcentagem
<b>±</b>	Mais ou menos
<b>µg/L</b>	Micrograma por litro
<b>mg/L</b>	Miligrama por litro
<b>L</b>	Litro
<b>&gt;</b>	Maior
<b>&lt;</b>	Menor



<b>mm</b>	Milímetro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>µg/mL</b>	Micrograma por mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>g</b>	Gramas
<b>CQA</b>	Controle de qualidade A
<b>CQB</b>	Controle de qualidade B
<b>CQC</b>	Controle de qualidade C
<b>CQ</b>	Controle de qualidade
<b>LOQ</b>	Limite de quantificação
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>mL/min</b>	Mililitro por minuto
<b>bar</b>	Bar
<b>min</b>	Minuto
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>ng/mL</b>	Nanograma por mililitro
<b>kg</b>	Kilograma
<b>h</b>	Hora
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>g</b>	Gravidade



## LISTA DE TABELAS

---

	<i>Pág.</i>
<b>Tabela 1</b> Materiais utilizados.....	55
<b>Tabela 2</b> Componentes do LC-MS-MS.....	56
<b>Tabela 3</b> Reagentes.....	56
<b>Tabela 4</b> Padrões.....	57
<b>Tabela 5</b> Amostras biológicas.....	57
<b>Tabela 6</b> Preparo dos padrões da curva de calibração.....	63
<b>Tabela 7</b> Preparo dos controles de qualidade.....	64
<b>Tabela 8</b> Amostras do fluido biológico (plasma).....	68
<b>Tabela 9</b> Concentrações do LOQ e CQs para ramipril e ramiprilato.....	70
<b>Tabela 10</b> Validação do LOQ para ramipril.....	88
<b>Tabela 11</b> Validação do LOQ para ramiprilato.....	89
<b>Tabela 12</b> Dados da análise intralote para o ramipril.....	91
<b>Tabela 13</b> Dados da análise intralote para o ramiprilato.....	92
<b>Tabela 14</b> Dados da análise interlote para o ramipril.....	92
<b>Tabela 15</b> Dados da análise interlote para o ramiprilato.....	93
<b>Tabela 16</b> Resultados da recuperação média para ramipril, ramiprilato, enalapril e enalaprilato.....	94
<b>Tabela 17</b> Estudo de estabilidade do ramipril e ramiprilato após o quarto ciclo para os controles CQA, CQB e CQC.....	95
<b>Tabela 18</b> Estabilidade de curta duração para ramipril e ramiprilato.....	96
<b>Tabela 19</b> Estabilidade de longa duração para ramipril e ramiprilato.....	97
<b>Tabela 20</b> Estabilidade das soluções padrão.....	98
<b>Tabela 21</b> Parâmetros farmacocinéticos do ramipril e ramiprilato.....	99
<b>Tabela 22</b> Média geométrica individual da $ASC_{last}$ , $ASC_{0-\infty}$ e $C_{max}$ .....	100



	<b><i>Pág.</i></b>
<b>Figura 1</b> Estrutura química do ramipril.....	41
<b>Figura 2</b> Estrutura química do ramiprilato.....	41
<b>Figura 3</b> Esquema representativo do mecanismo de ação do ramipril.....	47
<b>Figura 4</b> Plasma branco lipêmico, hemolizado e normal.....	86
<b>Figura 5</b> Picos representativos para branco + padrão interno (IS), LOQ, CQA, CQB e CQC (Analitos e Padrões Internos).....	87
<b>Figura 6</b> Linearidade do ramipril.....	90
<b>Figura 7</b> Linearidade do ramiprilato.....	90
<b>Figura 8</b> Perfil da concentração plasmática <i>versus</i> o tempo para ramipril e ramiprilato, obtido após administração oral de formulação ramipril 5mg.....	98



*RESUMO*





**Objetivo:** Avaliar a bioequivalência de uma formulação de ramipril 5 mg (formulação teste de ramipril dos laboratórios Biossintética Ltda. e a formulação de referência padrão Triatec<sup>®</sup> da Aventis Pharma) em vinte e seis voluntários de ambos os sexos.

**Método:** O estudo foi conduzido usando um estudo aberto, randomizado, cruzado de duas fases com um intervalo de washout de 2 semanas. As amostras de plasma foram obtidas sobre um período de 36 horas. As concentrações plasmáticas de ramipril e ramiprilato foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS-MS), com modo de ionização electrospray positivo usando o monitoramento de múltiplas reações (MRM). Das curvas de concentração plasmática versus o tempo para ramipril e ramiprilato, os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram obtidos:  $ASC_{0-36h}$ ,  $ASC_{last}$ ,  $ASC_{0-inf}$  e  $C_{max}$ .

**Resultados:** O limite de quantificação foi  $0.2 \text{ ng.mL}^{-1}$  e  $1.0 \text{ ng.mL}^{-1}$  para ramipril e ramiprilato, respectivamente. A média geométrica e a respectivo intervalo de confiança de 90% para Ramipril/Triatec<sup>®</sup> e Ramiprilato/ Triatec<sup>®</sup> foram respectivamente: 104.69% (90% IC= 93.21%-117.59%) para  $C_{max}$ , 102.49% (90% IC= 92.76%-113.24%) para  $ASC_{last}$ , 102.97% (90% IC= 93.21%-113.74%) para  $ASC_{0-36h}$ , 103.60% (90% IC= 93.56%-114.73%) para  $ASC_{inf}$ , 108.48% (90% IC= 98.86%-119.03%) para  $C_{max}$ , 105.88% (90% IC= 101.55%-110.39%) para  $ASC_{last}$ , 105.81% (90% IC= 101.53%-110.27%) para  $ASC_{0-36h}$ , 97.30% (90% IC= 90.17%-104.99%) para  $ASC_{inf}$ .

**Conclusão:** Desde que o IC de 90% para  $ASC_{last}$ ,  $ASC_{0-36h}$ ,  $ASC_{0-inf}$  e  $C_{max}$  apresentou-se dentro do intervalo de 80–125% proposto pelo FDA (US), foi concluído que a formulação ramipril elaborada pelo laboratório Biossintética Ltda é bioequivalente para a formulação Triatec<sup>®</sup> para taxa e velocidade de absorção.

**Palavras-Chave:** Ramipril, Bioequivalência, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Espectrometria de Massa.



***ABSTRACT***





**Objective:** To assess the bioequivalence of one ramipril 5 mg tablet formulation (ramipril test formulation from Laboratórios Biosintética Ltda and Triatec<sup>®</sup> from Aventis Pharma standard reference formulation) in 26 healthy volunteers of both sexes.

**Methods:** The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with a 2-week washout interval. Plasma samples were obtained over a 36 h period. Plasma ramipril and ramiprilat concentrations were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with positive ion electrospray ionization using multiple reaction monitoring (MRM). From the ramipril and ramiprilat plasma concentration vs time curves, the following pharmacokinetic parameters were obtained:  $ASC_{0-36h}$ ,  $ASC_{last}$ ,  $ASC_{0-inf}$  and  $C_{max}$ .

**Results:** The limit of quantification was  $0.2 \text{ ng.mL}^{-1}$  and  $1.0 \text{ ng.mL}^{-1}$  for ramipril and ramiprilat, respectively. The geometric mean and respective 90% confidence interval (CI) Ramipril/Triatec<sup>®</sup> and Ramiprilat/ Triatec<sup>®</sup> percent ratios were respectively: 104.69% (90% CI= 93.21%-117.59%) for  $C_{max}$ , 102.49% (90% CI= 92.76%-113.24%) for  $ASC_{last}$ , 102.97% (90% CI= 93.21%-113.74%) for  $ASC_{0-36h}$ , 103.60% (90% CI= 93.56%-114.73%) for  $ASC_{inf}$ , 108.48% (90% CI= 98.86%-119.03%) for  $C_{max}$ , 105.88% (90% CI= 101.55%-110.39%) for  $ASC_{last}$ , 105.81% (90% CI= 101.53%-110.27%) for  $ASC_{0-36h}$ , 97.30% (90% CI= 90.17%-104.99%) for  $ASC_{inf}$ .

**Conclusion:** Since the 90% CI for  $ASC_{last}$ ,  $ASC_{0-36h}$ ,  $ASC_{0-inf}$  and  $C_{max}$  ratios were within the 80–125% interval proposed by the US FDA, it was concluded that ramipril formulation elaborated by Laboratórios Biosintética Ltda is bioequivalent to Triatec<sup>®</sup> formulation for both the rate and the extent of absorption.

**Key Words:** Ramipril, Bioequivalence, High-Performance Liquid Chromatography, Tandem Mass Spectrometry.



## *1- INTRODUÇÃO*



Durante muito tempo a indústria farmacêutica não percebeu a importância da disponibilidade biológica das substâncias, a partir das formas farmacêuticas. Os formuladores ficavam satisfeitos quando se cumpriam as especificações pré-determinadas nos testes físicos e químicos tradicionais.

Um fármaco administrado como comprimido, ou outra forma farmacêutica, deve ser liberado e atingir o sítio de ação no seu estado ativo para que possa exercer uma resposta farmacológica. As propriedades físico-químicas da substância ativa, a tecnologia de preparação, as características da forma farmacêutica na qual é administrada e os fatores fisiológicos que controlam a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos fármacos devem ser considerados, objetivando formular agentes terapêuticos efetivos e seguros (AIACHE *et al*, 1983).

A noção de disponibilidade da substância ativa a partir de um medicamento nasceu da observação da não equivalência terapêutica entre especialidades farmacêuticas, até o momento considerados como substituíveis, devido a presença do mesmo fármaco, na mesma dose unitária, na mesma forma farmacêutica. A dificuldade e, às vezes, a impossibilidade de realizar comparações rigorosas dos resultados terapêuticos dos medicamentos considerados equivalentes, conduziu a necessidade de determinar sua biodisponibilidade antes de admitir que são equivalentes e substituíveis entre si (AIACHE *et al*, 1983).

## **1.1- Bioequivalência**

A bioequivalência ou biodisponibilidade relativa conquistou atenção crescente nos últimos 30 anos após evidências de que produtos comerciais contendo a mesma dosagem do fármaco, ou parte ativa, podem exibir diferenças pronunciadas na resposta terapêutica.

A introdução de medicamentos genéricos foi um fator importante que trouxe à tona preocupações sobre a biodisponibilidade desses produtos, uma vez que o seu desempenho *in vivo* era totalmente desconhecido (HORVITZ, 1975; SMITH, 1972).

Os ensaios de bioequivalência se justificam para apenas dois tipos de situações: alterações de uma formulação já existente no mercado ou versões genéricas de um produto inovador. Desta forma, o único objetivo desse estudo é obter evidência de que não há diferença significativa entre a formulação teste e a de referência (ARANCIBIA, 1991; JACKSON, 1994; VERNENGO, 1993).

De acordo com a resolução RDC nº 135 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003b), dois medicamentos são ditos bioequivalentes quando são administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais e não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação a biodisponibilidade.

Um medicamento bioequivalente deve ser considerado equivalente farmacêutico, ou seja, conter o mesmo fármaco, isto é, sal ou éster da mesma molécula ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos (BRASIL, 2003b).

Assumia-se que equivalentes farmacêuticos eram necessariamente equivalentes terapêuticos. Um produto farmacêutico é terapêuticamente equivalente a outro se este contiver a mesma substância ativa e, clinicamente, comprovar que possui a mesma eficácia e segurança estabelecidas através de ensaios clínicos.

Porém, foi demonstrado que a hipótese de que equivalentes farmacêuticos eram terapêuticamente semelhantes estava equivocada. Assim, tornou-se cada vez maior o interesse em estudos clínicos que garantissem a eficácia e segurança clínica dos medicamentos. Diante disso, o estudo de biodisponibilidade comparativa foi instituído na prática médica como uma forma de assegurar a eficácia, segurança e qualidade do medicamento genérico comparado ao inovador (METZLER, 1974).

No Brasil, os estudos de bioequivalência devem ser realizados para aqueles medicamentos cujos testes “*in vitro*” comprovaram a equivalência farmacêutica entre as formulações, e deve-se utilizar os mesmos lotes testados na equivalência farmacêutica (SOARES, 2002).

De acordo com o “Food and Drug Administration” (FDA), produtos farmacêuticos são considerados equivalentes terapêuticos somente se eles são equivalentes farmacêuticos e se deles pode-se esperar obter o mesmo efeito clínico e perfil de segurança quando administrado para pacientes sob condições específicas (FDA, 1998).

Os estudos de bioequivalência podem ser estudos abertos e cruzados ou em algumas situações especiais podem ser feitos em paralelo. Durante a realização do estudo os voluntários tomam as formulações teste e referência aleatoriamente em períodos distintos, e são realizados geralmente em uma população pequena de voluntários adultos e saudáveis comparando 24 a 36 voluntários de ambos os sexos (BENETT, 1999).

A utilização de voluntários saudáveis é baseada no fato que diversas patologias podem alterar a biodisponibilidade dos fármacos (GIBALDI, 1991) e podem fornecer dados errôneos de suas biodisponibilidades. Para evitar essas variáveis, os voluntários são submetidos a avaliações clínicas e laboratoriais para que possa corroborar o seu estado de hígidez.

Doses únicas dos medicamentos teste e referência são administradas em períodos diferentes, com o segundo produto somente administrado depois de um intervalo adequado para garantir que não haja um efeito residual do primeiro fármaco administrado, que aumentaria artificialmente os resultados (ANSEL *et al.*, 2000). As amostras sanguíneas são coletadas para posterior quantificação antes e após a administração de cada formulação e em intervalos pré-estabelecidos para obtenção dos perfis farmacocinéticos necessários para se determinar a bioequivalência.

#### 1.1.1- Parâmetros para Avaliação da Bioequivalência

Para a avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de dois medicamentos são determinados os parâmetros farmacocinéticos que melhor se correlacionam com os efeitos terapêuticos no organismo (ARANCIBIA, 1991; STORPIRTIS, 1994). Estes parâmetros relacionam-se com a quantidade de fármaco absorvida e à velocidade do processo de absorção (BOIS *et al.*, 1994; STORPIRTIS, CONSIGLIERI, 1995).

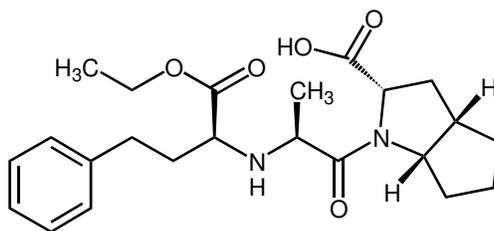
Os parâmetros farmacocinéticos são obtidos das curvas de concentração sanguínea do fármaco versus tempo, e analisados estatisticamente para determinação da bioequivalência.

Os seguintes parâmetros farmacocinéticos devem ser determinados:

- a) **Área sob a Curva da Concentração Plasmática versus Tempo (ASC)**- relaciona-se com a quantidade ou a extensão de absorção do fármaco. Pode ser calculado pelo método trapezoidal e expresso em unidades de concentração vezes tempo.
- b) **Área sob a Curva do Tempo Zero ao Tempo T ( $ASC_{0-t}$ )**- relaciona-se com a quantidade do fármaco absorvida do tempo zero ao tempo t, onde t é a última coleta determinada experimentalmente.
- c) **Área sob a Curva da Concentração Plasmática versus Tempo, de Zero ao Infinito ( $ASC_{0-\infty}$ )**- relaciona-se com a quantidade ou a extensão de absorção do fármaco. A quantidade da absorção sistêmica do fármaco é diretamente relacionada com ASC que é geralmente calculado pelo método trapezoidal e expresso em unidades de concentração vezes tempo.
- d) **Concentração Máxima Atingida no Plasma ( $C_{max}$ )**- concentração mais elevada do fármaco atingido na circulação sanguínea após administração de um fármaco. Relaciona-se a intensidade da resposta farmacológica. O  $C_{max}$  ideal deve estar dentro da janela terapêutica.
- e) **Meia Vida de Eliminação do Fármaco ( $t_{1/2}$ )** - representa o tempo em que a concentração do fármaco no plasma é reduzida à metade. Calcula-se através do logaritmo neperiano (ln) de 2 ( $\ln 2 = 0,693$ ) dividido pela constante de eliminação  $t_{1/2} = \ln 2 / K$ .
- f) **Tempo correspondente à Concentração Máxima Atingida no Plasma ( $T_{max}$ )** - tempo correspondente para que o fármaco atinja a concentração máxima ( $C_{max}$ ).

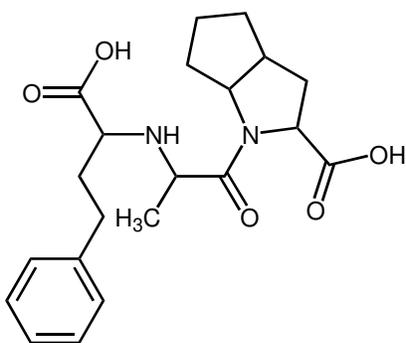
## 1.2- Ramipril

O Ramipril, é um ácido carboxílico-3-octano 2-[N-[(S)-1-(etoxicarbonil)-3-(fenilpropil)]-L-alanil]-(1S,3S,5S) 2-azabiciclo(3-3-0) (figura 1), cuja fórmula molecular é  $C_{23}H_{32}N_2O_5$ . É uma substância branca, cristalina e solúvel em solventes orgânicos polares e preparado por síntese química. O seu peso molecular é 416,5. (PHYSICIANS' DESK REFERENCE, 2000).



**Figura 1-** Estrutura química do ramipril

Este composto é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), e tem importante função na regulação da hipertensão e tratamento da insuficiência cardíaca (NUSSBERGER *et al*, 1985; CAMPBELL *et al*, 1993; UNGER *et al*, 1986). O metabólito diácido ativo ramiprilato (figura 2), é formado pela hidrólise do grupo etil éster através do metabolismo hepático. Este metabólito compete com a ECA bloqueando a conversão da angiotensina I para angiotensina II, inibindo sua potente ação vasoconstritora, resultando em uma queda na pressão arterial. (ZHU *et al*, 2002).



**Figura 2-** Estrutura química do ramiprilato

### 1.2.1- Farmacologia Clínica

O Ramipril administrado por via oral, é rapidamente absorvido e convertido, no fígado, a seu diácido ativo, ramiprilato. Este se liga, competitivamente, com a enzima conversora de angiotensina, formando, inicialmente, um complexo inibidor-enzima, o qual então sofre isomerização para um complexo com uma lenta taxa de dissociação (BUNNING, 1984; BUNNING, 1987). Este fármaco tem sido efetivo no controle da hipertensão, com apenas uma dose diária de 5mg, quando prescrito para tratamentos crônicos. (WALTER *et al*, 1987; VILLAMIL *et al*, 1987; KARLBERG *et al*, 1987; HEBER *et al*, 1988).

O fluxo sanguíneo coronariano e cerebral permanece estável, enquanto que o fluxo sanguíneo renal se apresenta elevado, quando na presença de um inibidor de ECA (iECA), como por exemplo o ramipril. Já o débito cardíaco e a força de contração, praticamente não se alteram, embora uma pequena queda possa ser vista. O ramipril pode também reduzir os níveis de aldosterona, que é então liberada a partir da estimulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Em pacientes portadores de insuficiência cardíaca, a sobrecarga do músculo cardíaco é reduzida, na presença do ramipril, devida à inibição vasoconstritora provocada pela ECA, o que faz com que haja uma prevalência da vasodilatação arteriolar sistêmica. Com o aumento do índice e rendimento cardíacos, este fármaco, assim como outros iECA, parecem ser adequados ao tratamento de pacientes com diagnóstico de insuficiência cardíaca

O Ramipril reduz a sobrecarga em pacientes com insuficiência cardíaca, devido à dilatação arteriolar sistêmica. Como um resultado do índice cardíaco e rendimento cardíaco aumentado e o fármaco, como outros inibidores da ECA, é proveitoso para o tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca (DE GRAEFF *et al*, 1987; DE GRAEFF *et al*, 1989).

A avaliação dos componentes do sistema renina angiotensina na circulação, em homens, mostra que uma única dose oral de 5mg de ramipril, cuja produção metabólica de ramiprilato na concentração de  $2\mu\text{g/l}^{-1}$ , plasmático, pode suprimir a atividade da ECA

para menos do que 20% da atividade basal, bem como a concentração de angiotensina II por um período de até 24 horas (TODD & BENFIELD, 1990; A SYMPOSIUM, 1987).

A excreção do ramiprilato ocorre basicamente via renal, sendo desaconselhável sua prescrição para pacientes portadores de insuficiência renal, ou pelo menos em doses bem reduzidas (DOLLERY, 1999).

## 1.2.2- Farmacocinética

### 1.2.2.1- Absorção e Distribuição

O Ramipril é uma pró-droga monoetil éster lentamente absorvida. A administração por via oral permite uma absorção de aproximadamente 56% (TODD & BENFIELD, 1990). A ingestão de alimentos, antes do seu uso, reduz a taxa de absorção do ramipril, entretanto, sua extensão de absorção não é significativamente afetada (MONARCH PHARMACEUTICALS (2001), VAN GRIENSVEN *et al* (1995)).

Tanto o ramipril quanto o ramiprilato possuem uma ligação protéica de 73% e 56%, respectivamente. (TODD & BENFIELD, 1990). O volume médio de distribuição do ramipril é de aproximadamente 90L (FRAMPTON & PETERS, 1995).

### 1.2.2.2- Metabolismo e Eliminação

O ramipril é metabolizado a ramiprilato, quase na sua totalidade, sendo este que o ramiprilato apresenta atividade inibitória da ECA 6 vezes maior do que a do ramipril.

A concentração plasmática de ramiprilato declina em três fases (queda inicial rápida, fase de eliminação aparente e fase de eliminação terminal). A primeira fase representa uma distribuição da droga dentro de um amplo compartimento periférico e subsequente ligação ao plasma e ao tecido da ECA, tendo uma meia vida de 2 a 4 horas. Pelo fato de sua potente ligação a ECA e lenta dissociação da enzima, o ramiprilato mostra mais duas fases de eliminação.

A fase de eliminação aparente corresponde ao clearance do ramiprilato livre e tem uma meia vida de 9 a 18 horas. A fase de eliminação terminal tem uma meia vida prolongada (>50 horas) e provavelmente representa a cinética de ligação/dissociação do complexo ramiprilato/ECA. Após múltipla administração de dose única diária de ramipril 5 mg a 10 mg, a meia vida efetiva do ramiprilato dentro de uma faixa terapêutica é de 13 a 17 horas.

Após dosagens únicas diárias, as concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio do ramiprilato como doses usuais de ramipril são alcançadas na quarta dose (quarto dia) de tratamento (PHYSICIANS' DESK REFERENCE, 2000).

O ramipril e seus metabólitos são excretados, predominantemente, via renal (60%) e os outros 40% são excretados nas fezes (FRAMPTON & PETERS, 1995; MONARCH PHARMACEUTICALS, 2001).

A fração excretada fecalmente pode incluir fármacos não absorvidos e/ou metabólitos de excreção biliar. Somente uma pequena fração (<2%) do ramipril é excretada inalterada na urina (MONARCH PHARMACEUTICALS, 2001).

A excreção urinária de ramipril, ramiprilato e seus metabólitos é reduzida em pacientes com insuficiência renal (PHYSICIANS' DESK REFERENCE, 2000).

### 1.2.3- Relação Concentração Efeito

Concentrações circulantes de ramipril de  $2\mu\text{g.l}^{-1}$  ou mais, causam aproximadamente 80% de inibição da atividade da ECA, no plasma. Concentrações circulantes de renina e angiotensina I aumentam e da angiotensina II cai rapidamente. Uma dose de 10mg/kg alcançará a concentração circulante do ramiprilato de  $2\mu\text{g.l}^{-1}$  ou mais entre 1 e 2 horas. Já uma dose de 5mg ou mais reduz a atividade da ECA circulante em menos de 20% de sua atividade basal, e níveis de angiotensina II por até 24 horas (DOLLERY, 1999).

#### 1.2.4- Uso Terapêutico

O tratamento com ramipril reduz a taxa de infarto do miocárdio, a insuficiência cardíaca, a revascularização coronária e reduz, também, a incidência de complicações relatadas para pacientes diabéticos de alto risco. A terapia com ramipril é indicada, também em casos de hipertensão renovascular e doença isquêmica do coração. O efeito antihipertensivo do ramipril é mantido em pacientes com diabetes *mellitus*, cujos dados preliminares mostram que este fármaco atua de forma benéfica ao diminuir a excreção de albumina, em pacientes diabéticos com nefropatia. Dados clínicos confirmam que o ramipril pode ser utilizado, como um excelente inibidor da ECA, para o tratamento de pacientes com hipertensão leve a moderada e indicam um efeito benéfico, em pacientes com evidências clínicas de insuficiência cardíaca após infarto agudo do miocárdio (FRAMPTON & PETERS, 1995; TODD & BENFIELD, 1990; DOLLERY, 1999; YUSUF *et al*, 2000).

#### 1.2.5- Mecanismo de Ação

Há mecanismos fisiológicos de regulação da pressão arterial, sendo que estes mecanismos tem por função manter a pressão arterial dentro dos valores, considerados normais, e com isso manter as funções orgânicas dentro da homeostasia (equilíbrio fisiológico das funções orgânicas). (GUYTON & HALL, 1997). Dentre esses mecanismos, há o sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Neste sistema, o hormônio produzido pelos rins, conhecido como renina, ativa uma enzima chamada angiotensina II. Esta provoca a constrição dos vasos sanguíneos. A angiotensina também estimula a liberação de um hormônio chamado aldosterona das glândulas adrenais. Este hormônio causa a retenção de sal e água pelos rins e pode elevar ainda mais a pressão arterial. Os medicamentos que bloqueiam a angiotensina, chamados de inibidores de enzima conversora de angiotensina (ECA), tais como Ramipril, podem ajudar a diminuir a hipertensão (RANG *et al*, 2004).

O Ramipril, inibidor da ECA, e uma pró-droga que é rapidamente hidrolisada após absorção, para o metabólito ativo Ramiprilato. Este fármaco atua diretamente no sistema Renina-Angiotensina. Este sistema exerce importante papel na homeostase

cardiovascular e relaciona-se com um grande número de desordens cardiovasculares (GREGORY *et al*, 2002).

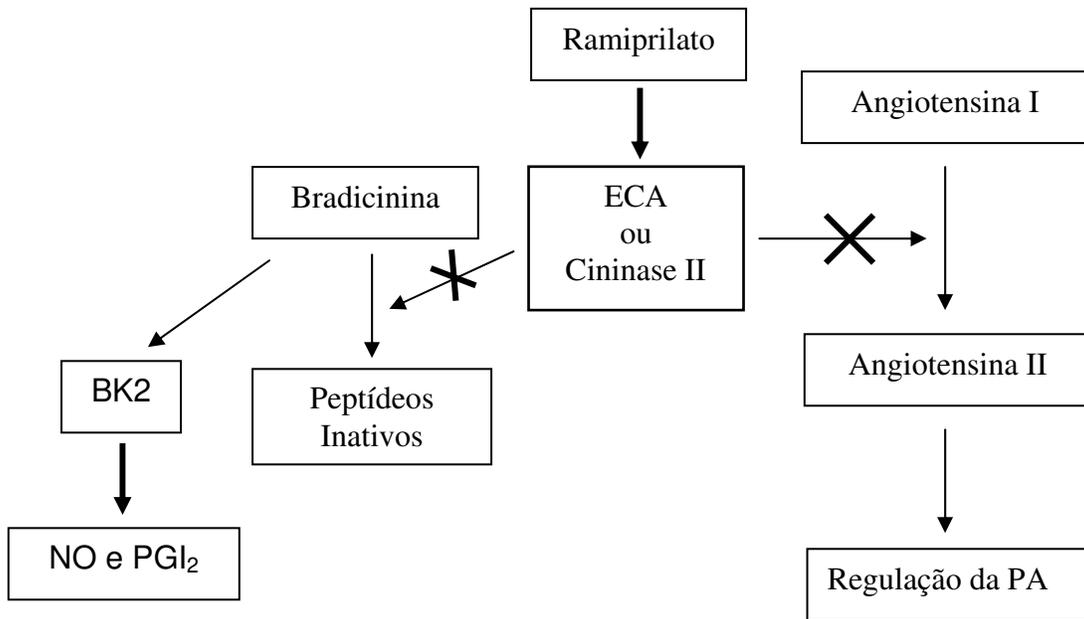
A renina é uma enzima proteolítica que é secretada e armazenada sob uma forma inativa, denominada pró-renina, nas células justaglomerulares (células JG) dos rins. As células JG se localizam nas paredes das arteríolas aferentes próximo aos glomérulos. Quando a pressão arterial cai, reações intrínsecas nos próprios rins fazem com que muitas das moléculas de pró-renina sejam clivadas, liberando renina. Grande parte da renina passa para o sangue e sai dos rins para circular por toda a corrente sanguínea, sendo rapidamente depurada do plasma (GUYTON & HALL, 1997).

A renina atua enzimaticamente sobre outra proteína plasmática, uma globulina denominada substrato da renina (ou angiotensinogênio), separando um decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I), da extremidade N-terminal da proteína (angiotensinogênio). A Ang I não tem atividade apreciável em si, e dentro de poucos segundos após sua formação é convertida pela ECA no endotélio dos vasos pulmonares em angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo, que é um potente vasoconstritor (RANG *et al*, 2004).

A Ang II exerce dois efeitos principais que podem elevar a pressão arterial. O primeiro deles, a vasoconstrição nas arteríolas levando a um aumento da resistência periférica, com conseqüente elevação da pressão arterial. O segundo mecanismo consiste em sua ação sobre os rins. A Ang II estimula a liberação de aldosterona, que por sua vez, aumenta a reabsorção de sódio e água. Este processo aumenta o volume de líquido extracelular, o que eleva a pressão arterial (GUYTON & HALL, 1997).

Na regulação da pressão arterial (figura3), o Ramiprilato compete diretamente com a Angiotensina I pelo sitio ativo da ECA, inibindo a conversão de Ang I para Ang II. A inibição da ECA resulta na diminuição da Ang II no plasma, o qual conduz para a diminuição da atividade vasoconstritora e diminuição da secreção de aldosterona, reduzindo a reabsorção de sódio e água, diminuindo a resistência vascular periférica (RANG *et al*, 2004).

As principais enzimas que inativam a bradicinina são denominadas cininases. Uma delas, a cininase II, é idêntica a ECA. Os inibidores da ECA podem elevar os níveis de bradicinina, um potente vasodilatador e estimulante da liberação de prostaglandinas e óxido nítrico (RANG *et al*, 2004).



**Figura 3-** Esquema representativo do mecanismo de ação do ramipril



## ***2- OBJETIVOS***



## **2.1- Objetivo Geral**

Desenvolver e validar um método sensível, rápido e específico para quantificação de Ramipril e Ramiprilato em plasma humano.

## **2.2- Objetivo Específico**

Comparar o perfil farmacocinético em voluntários sadios e avaliar a bioequivalência de duas formulações de Ramipril 5 mg.



### ***3- MATERIAIS***



### 3.1- Desenvolvimento e Validação da Metodologia Bioanalítica

Para o desenvolvimento e validação da metodologia, foram utilizados os seguintes aparelhos, padrões, reagentes e amostras biológicas, descritos nas tabelas 1, 2, 3, 4 e 5.

#### 3.1.1- Produtos Químicos e Reagentes

Ramipril foi fornecido **por Dr. Reddy's Lab., Índia**, lote número EDMG14C01. Ramiprilato foi sintetizado **pela Unidade Analítica Cartesius no Brasil**, lote número 001/03. Enalaprilato dihidratado foi obtido pelo **United States Pharmacopeia, USA**, lote número 1. Maleato de Enalapril foi obtido por Impex Química S.A, lote número 511101071B. Ácido Trifluoracético, acetonitrila, metanol e acetato de amônia foram adquiridos de J.T. Baker, USA. Água deionizada (análise graduada) foi comprada de Mallinckrodt (Paris, ST, USA). Água ultrapura foi obtida de um sistema Elga UHQ (Elga, UK). Foram coletadas amostras de sangue de voluntários sadios, antes da administração das formulações. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue tratado com o anticoagulante heparina sódica.

**Tabela 1-** Materiais utilizados na etapa analítica

Descrição	Fabricante/País
Pipetas ajustáveis (100 µL, 200 µL e 1000 µL)	Gilson, França
Ponteiras descartáveis (5-200 µL) e (200 –1000 µL)	Gilson, França
Tubos de vidro 120 x 11 mm	Laborglass, Brasil
Multipipetador Eppendorf	Eppendorf, USA
Tubos de plástico de 15 e 50 mL	Corning, Brasil
Misturador Fisher Vortex Genie 2	Fisher, USA
Balança analítica	Ohaus, USA
Placas de 96 poços – capacidade 200 µL	Axygen, USA
Capa de Silicone	Axygen, USA

**Tabela 2-** Componentes do LC-MS-MS

<b>Componentes</b>	<b>Fabricante/País</b>	<b>Modelo</b>
Cromatógrafo líquido	Shimadzu, Japan	LC10ADVP
Auto-injetor	CTC Analytics, Switzerland	HTS Pal
Coluna analítica	Alltech, USA	Prevail C8 5 um (150 x 4.6 mm i.d.) - Internal code: C8-26
Pré-coluna	Alltech, Usa	Prevail C8 5 um (75 x 4.6 mm i.d.)
Espectrômetro de massas	Micromass, UK	Quattro Micro with electrospray source
Sistema de dados-Masslynx	Micromass, UK	Version 3.5 running on a IBM PC under Windows XP

**Tabela 3-** Reagentes

<b>Descrição</b>	<b>Fabricante/País</b>
Ácido Trifluoracético- Grau Analítico	J.T. Baker, USA
Acetonitrila	J.T. Baker, USA
Metanol- Grau HPLC	J.T. Baker, USA
Água Deionizada	Elga UHQ, USA
Acetato de Amônio- Grau Analítico	J.T. Baker, USA
Ácido clorídrico- Grau Analítico	Merck, Brazil

**Tabela 4-** Padrões

<b>Descrição</b>	<b>Propósito</b>
Ramipril	Analito
Ramiprilato	Analito
Maleato de Enalapril	Padrão Interno
Dihidrato de Enalapril	Padrão Interno

**Tabela 5-** Amostras Biológicas

<b>Condições</b>
Plasma Humano Normal
Plasma Humano Lipêmico
Plasma Humano Hemolizado



## ***4- METODOLOGIA***



## **4.1- Desenvolvimento e Validação da Metodologia Bioanalítica**

### 4.1.1- Preparo das Soluções Padrão

Todas as soluções preparadas foram transferidas para tubos de polipropileno rotulados adequadamente para serem armazenados a + 4°C na geladeira e substituídas após sete dias do preparo.

### 4.1.2- Soluções Padrões de Ramipril e Ramiprilato

Foram pesados cuidadosamente quantidades de ramipril e ramiprilato dentro tubos de polipropileno separados, e diluídos em uma solução de metanol/água (50/50), para a obtenção das soluções de concentração 1000 µg/mL para ramipril e ramiprilato respectivamente.

### 4.1.3- Solução Padrões Internos Enalapril e Enalaprilato

Foram pesados cuidadosamente quantidades de maleato de enalapril e dihidrato de enalaprilato dentro tubos de polipropileno separados, e diluídos em uma solução de metanol/água (50/50), para a obtenção das soluções de concentração 1000 µg/mL para enalapril e enalaprilato respectivamente.

### 4.1.4- Soluções de Trabalho

As soluções de trabalho foram obtidas por diluição das soluções de ramipril, ramiprilato, enalapril e enalaprilato em metanol/água (50/50), para a construção dos pontos da curva de calibração.

#### 4.1.4.1- Solução de Fase Móvel - metanol/água (50/50) + ácido trifluoracético 13 mM + acetato de amônio 2.5 mM.

A solução de fase móvel foi preparada pela adição de 500 mL de água e 500 mL de metanol em um erlenmeyer com capacidade para 1000 mL, e adicionado 0.19 g de acetato de amônio e 1 mL de ácido trifluoracético. A solução foi gentilmente misturada, permitindo a eliminação de vapores em uma “capela”.

#### 4.1.4.2- Solução de lavagem: solução aquosa de ácido clorídrico (10 mM)

A solução foi preparada pela adição de 1 mL de ácido clorídrico (aproximadamente 10 M) dentro de um cilindro de medição (com capacidade para 1000 mL) contendo 1000 mL de água. A solução foi gentilmente misturada, permitindo a eliminação de vapores em uma “capela”.

#### 4.1.5- Preparo dos padrões da curva de calibração

A curva de calibração consistiu de uma amostra “branco” (matriz processada sem o padrão interno), uma amostra zero (matriz processada com o padrão interno) e padrões em plasma a serem quantificados.

Os padrões de calibração foram preparados pela contaminação do plasma humano com as soluções padrões contendo o analito a ser quantificado. As análises foram executadas em duplicata para cada uma das concentrações.

**Tabela 6-** Preparo dos padrões da curva de calibração

Padrão	Mistura Analitos	Conc. Plasma (ng/mL)	Solução de Trabalho		Volume plasma adicionado (mL)	Volume total (mL)	Fator diluição
			Volume adicionado (mL)	Conc. (ng/mL)			
8	Ramipril	50.0	0.10	1000	1.80	2	20
	Ramiprilato	20.0	0.10	400			
7	Ramipril	20.0	0.10	400	1.80	2	20
	Ramiprilato	15.0	0.10	300			
6	Ramipril	10.0	0.10	200	1.80	2	20
	Ramiprilato	12.5	0.10	250			
5	Ramipril	5.00	0.10	100	1.80	2	20
	Ramiprilato	10.0	0.10	200			
4	Ramipril	2.00	0.10	40	1.80	2	20
	Ramiprilato	7.50	0.10	150			
3	Ramipril	1.00	0.10	20	1.80	2	20
	Ramiprilato	5.00	0.10	100			
2	Ramipril	0.500	0.10	10	1.80	2	20
	Ramiprilato	2.50	0.10	50			
1	Ramipril	0.200	0.10	4	1.80	2	20
	Ramiprilato	1.00	0.10	20			
Z	Padrão Zero	-	-	-	-	-	-
B	Padrão Branco	-	-	-	-	-	-

#### 4.1.6- Preparo dos controles de qualidade

As amostras dos controles de qualidade foram preparados com os seguintes objetivos:

- 1) Monitorar a precisão e exatidão do método de quantificação;
- 2) Monitorar a precisão e exatidão da metodologia do processo de diluição (somente para o controle de maior concentração).

As amostras do controle de qualidade e do limite de quantificação mais baixo foram preparadas adicionando as soluções trabalho do analito a ser quantificado ao plasma humano.

Os controles de qualidade (CQA, CQB e CQC) foram preparados diariamente em quantidades requeridas para a análise (Tabela 7).

**Tabela 7-** Preparo dos controles de qualidade

CQ	Analito	Conc. Plasma (ng/mL)	Solução de Trabalho		Volume Plasma Adicionado (mL)	Volume Total (mL)	Fator de diluição
			Volume adicionado (mL)	Conc. (ng/mL)			
D	Ramipril	80.0	0.25	1600	4.50	5	20
	Ramiprilato	32.0	0.25	640			
C	Ramipril	40.0	0.25	800	4.50	5	20
	Ramiprilato	16.0	0.25	320			
B	Ramipril	4.00	0.25	80.0	4.50	5	20
	Ramiprilato	9.00	0.25	180			
A	Ramipril	0,600	0.25	12	4.50	5	20
	Ramiprilato	3.00	0.25	60.0			
LOQ	Ramipril	0.200	0.25	4	4.50	5	20
	Ramiprilato	1.00	0.25	20.0			

## 4.2- Preparo da Corrida Analítica

### 4.2.1- Extração das amostras

O protocolo experimental para a extração das amostras foi seguido na ordem:

- 1) Tudo de vidro de 12 x 120 mm foram numerados e colocados em ordem em um suporte;
- 2) 500  $\mu$ L de amostra de plasma humano foram introduzidos dentro de tubos de vidro apropriados;
- 3) Para cada tubo foi dispensado 50  $\mu$ L da solução do padrão interno (0,10  $\mu$ g/ML de Enalapril/Enalaprilato em solução metanol-água 50/50 v/v). Os tubos foram agitados por aproximadamente 10 segundos;
- 4) Foi adicionado 0,4 mL de solução ácido clorídrico aquosa (10 mM) nos tubos com as amostras e estes agitados por aproximadamente 10 segundos;
- 5) Os cartuchos HLB Oásis SPE foram pré-condicionados por uma primeira lavagem com 1 mL de metanol e em seguida com 1 mL de água deionizada. Cada solução de lavagem foi atraída através da coluna sob baixa intensidade de vácuo;
- 6) As amostras foram aplicadas para cartuchos HLB Oásis SPE individuais. Usando baixa intensidade de vácuo, as amostras foram lentamente atraídas através dos cartuchos;
- 7) Em seguida, os cartuchos foram lavados (5 vezes) com 1 ML de uma solução ácido clorídrico aquosa (10 Mm). A lavagem foi atraída através da coluna sob baixa intensidade de vácuo;
- 8) Os cartuchos foram transferidos para dentro de tubos de vidro numerados. Os cartuchos foram eluídos com 0,5 ML de metanol, o qual foi atraído lentamente através do cartucho e coletado dentro dos tubos de vidro, pela aplicação de uma pressão positiva usando um fluxo de nitrogênio;
- 9) O Solvente foi evaporado usando um fluxo de nitrogênio a 40°C. Este processo foi conduzido dentro de uma capela;

- 10) Os resíduos foram dissolvidos com 0,2 mL de água deionizada pura e agitados por 15 segundos para reconstituí-los;
- 11) As soluções foram transferidas para placas de 96 poços usando pipetas automáticas com ponteiras plásticas descartáveis;
- 12) As placas de 96 poços foram fechadas com uma tampa de silicone e colocadas dentro das gavetas do auto-injetor.

#### 4.2.2- Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna analítica Prevail C<sub>8</sub> 5 µm (150 x 4.6 mm i.d.) e uma pré-coluna Previai C<sub>8</sub> 5 µm (75 x 4.6 mm i.d.), operando na temperatura ambiente. Os compostos foram eluídos por bombeamento da fase móvel (metanol/água (50/50); V/V) + ácido trifluoracético 13 mM + acetato de amônia 2.5 mM) em uma velocidade de fluxo de 1,5 mL/min. Os valores da pressão observados foram de aproximadamente 85 bar.

A temperatura do auto-injetor de amostras foi mantida na temperatura de 12°C. O volume de injeção foi de 25 µL e o tempo total de corrida foi ajustado para 2,5 min.

Sob essas condições, os tempos de retenção observados para os analitos ramipril e ramiprilato foram de 2,1 e 1,6 min., e para os padrões internos enalapril e enalaprilato, 1,7 e 1,3 min.

#### 4.2.3- Condições do Espectrômetro de Massas

O espectrômetro de massas utilizado foi o Quattro Micro (Micromass, UK), equipado com uma fonte electrospray usando um fluxo cruzado, operando em modo de ionização positivo (ES+). O equipamento foi programado para monitorar múltiplas reações (modo MRM), monitorando as transições 417,0 > 234,0; 389,0 > 206,0; 377,0 > 234,0 e 349,0 > 206,0 para ramipril, ramiprilato, enalapril e enalaprilato, respectivamente.

Para otimizar os parâmetros do espectrômetro de massas, uma solução padrão dos analitos e padrão internos foi infundida no equipamento, para avaliar a integridade dos cromatogramas, íons moleculares e a performance do espectrômetro.

### **4.3- Validação do Método de Quantificação**

Os estudos foram conduzidos em concordância com o protocolo do estudo e o guia para validação de métodos analíticos do Food and Drug Administration (FDA).

Os testes foram realizados para demonstrar que o método analítico proposto é adequado e confiável.

A validação do método consistiu de um pré estudo que avaliou os parâmetros como sensibilidade, especificidade, linearidade, exatidão, precisão e reprodutibilidade; definição dos parâmetros do estudo tais como limite de quantificação, concentração dos padrões da curva e dos controles de qualidade; determinação da estabilidade do analito.

#### **4.3.1- Especificidade**

A matriz biológica na qual os analitos a serem testados estão presentes, deve ser avaliada quanto a uma possível presença de outros componentes como impurezas, descartando qualquer interferência no método proposto.

Para testar a especificidade, amostras “branco” de plasma humano foram obtidas de 4 fontes sobre as condições descritas na tabela 8.

Cada amostra “branco” foi testada utilizando os procedimentos de extração e condições cromatográficas propostas e comparada com aquela obtida com uma solução do analito na concentração próxima do limite de quantificação.

**Tabela 8-** Amostras do fluido biológico (plasma)

Descrição	Origem	Lote
Plasma Humano Normal	Hemocentro de São Paulo	Pool 1
		Pool 2
		Pool 3
		Pool 4
Plasma Humano Hiperlipêmico	Unidade Analítica Cartesius	Pool Cartesius
Plasma Humano Hemolizado	Unidade Analítica Cartesius	Pool Cartesius

#### 4.3.2- Validação da Curva de Calibração/Linearidade

Para determinar a curva de calibração, oito padrões não zero foram preparados. As concentrações dos padrões foram definidas em testes preliminares, incluindo a primeira quantificação de amostras, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas.

Os parâmetros envolvidos assim como os critérios para determinar a validação da curva de calibração estão mencionados a seguir:

##### 4.3.2.1- Determinação do Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi definido levando em conta o método de sensibilidade, precisão e exatidão. Três valores na menor concentração em torno do LOQ foram testados em duplicata incluindo a curva. Para avaliar a precisão e exatidão, amostras dos CQ foram incluídas no procedimento de validação.

Os seguintes critérios foram estabelecidos para a determinação do LOQ:

- a) Não apresentar interferência na amostra branco no tempo retenção do analito, ou a resposta para o LOQ deve ser 7 vezes maior que qualquer interferência na amostra branco no mesmo tempo de retenção.
- b) Resposta do pico do analito identificável e reproduzível, com precisão de 20% calculada quando ambos os padrões em duplicata forem aprovados, e exatidão entre 80% - 120% em relação à concentração nominal do padrão.

#### 4.3.2.2- Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003a).

A linearidade foi determinada para avaliar a performance do método. A regressão linear de  $1/x^2$  foi executada na razão área do pico do ramipril e enalapril *versus* as concentrações do ramipril de 8 padrões de plasma (0,20, 0,50, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0 e 50,0 ng/mL) em duplicata para gerar a curva de calibração. A regressão linear de  $1/x^2$  foi executada na razão da área do pico do ramiprilato e enalaprilato *versus* as concentrações de ramiprilato de 8 padrões de plasma (1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0, 20,0 ng/mL) em duplicata para gerar a curva de calibração.

A linearidade da curva de calibração foi avaliada dentro dos seguintes critérios:

- a) Desvio menor ou igual a 20% da concentração nominal do LOQ, para pelo menos uma das duplicatas;
- b) Desvio menor ou igual a 15% em relação a outros padrões para pelo menos uma das duplicatas;
- c) Pelo menos 75% dos padrões de cada concentração nominal obedecer aos critérios descritos acima;
- d) Apresentar um coeficiente de correlação igual ou maior que 0,98.

#### 4.4- Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão, quatro concentrações distintas (CQA, CQB, CQC e LOQ) foram avaliadas usando oito amostras de cada concentração. A precisão e exatidão foram determinadas dentro de um mesmo dia de ensaio (precisão e exatidão intralote), e entre diferentes dias (precisão e exatidão interlotes).

#### 4.4.1- Determinação das Concentrações dos Controles de Qualidade

Os controles de qualidade foram definidos baseados nos critérios apresentados na tabela abaixo, e ajustados nos teste subseqüentes e na quantificação das amostras levando em consideração a variação dos valores analíticos.

**Tabela 9-** Concentrações do LOQ e CQs para ramipril e ramiprilato

Composto	Tipo do CQ	Código do CQ	Definição da Variação	Valor definido
Ramipril/ Ramiprilato	Amostra do LOQ para definição do CQ	LOQ	Mesma concentração do LOQ	0.200 ng/mL 1.00 ng/mL
Ramipril/ Ramiprilato	Amostra de CQ de baixo valor	CQA	Cerca de 3 X LOQ	0,600 ng/mL 3.00 ng/mL
Ramipril/ Ramiprilato	Amostra de CQ de médio valor	CQB	Media entre o CQ de baixo e alto valor	4.00 ng/mL 9.00 ng/mL
Ramipril/ Ramiprilato	Amostra de CQ de alto valor	CQC	75% a 90% do padrão de calibração mais alto	40.0 ng/mL 16.0 ng/mL
Ramipril/ Ramiprilato	CQD (para diluição)	CQD	Maior do que o padrão mais alto	80.0 ng/mL 32.0 ng/mL

#### 4.4.2- Precisão e Exatidão Intralote

A validação da precisão e exatidão intralote foi conduzida usando um ensaio contendo as seguintes amostras:

- Uma curva de calibração contendo os padrões CQA, CQB, CQC e LOQ para ramipril e ramiprilato;
- Oito amostras de CQ e LOQ de cada uma das concentrações;
- As amostras do CQ e LOQ foram preparadas independentemente, por exemplo, diferentes soluções “mãe” das amostras padrões.

Os seguintes critérios foram estabelecidos para a determinação precisão e exatidão intralote:

- a) Precisão: para cada nível de concentração o CV na deve exceder 15%, com tolerância de 20% para o LOQ.
- b) Exatidão: valores médios de cada uma das concentrações CQA, CQB e CQC devem estar dentro de 15% do valor nominal, com tolerância de 20% para o LOQ.

#### 4.4.3- Precisão e Exatidão Interlote

A validação da precisão e exatidão interlote foi conduzida usando três ensaios, cada um preparado com plasma humano coletado de fontes diferentes.

As mesmas condições de preparação das amostras definidas para a validação intralote foram seguidas.

Os critérios estabelecidos para a determinação da precisão e exatidão interlote foram os mesmos adotados para a validação intralote.

#### 4.5- Recuperação

A eficiência da extração do método analítico foi assegurada usando uma lista específica contendo as seguintes amostras:

- a) Cinco amostras do CQ de cada concentração (CQA, CQB e CQC), obtidos pelo processo de extração usual;
- b) Pelo menos três amostras de cada uma das concentrações mencionadas acima, obtidas por diluição das soluções de trabalho em plasma branco extraído.

A recuperação foi avaliada pelo cálculo da média da resposta de cada concentração e comparando as áreas dos picos das amostras extraídas do plasma com as áreas dos picos das amostras não extraídas (extrato de plasma branco) de concentração correspondente.

A comparação com amostras não extraídas, ruídos nos resíduos de plasma foi realizada para eliminar o efeito matriz, dando uma recuperação verdadeira.

#### **4.6- Testes de Estabilidade**

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. A estabilidade do analito deve ser avaliada durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas (BRASIL, 2003a).

Os procedimentos de estabilidade avaliaram a estabilidade do analito em plasma humano sob condições distintas de temperatura e armazenamento, bem como a estabilidade do analito na solução estoque.

Para o teste de estabilidade, uma série de amostras padrão foi preparada a partir das soluções de trabalho e soluções estoque no mesmo solvente utilizado para a análise. Foram utilizadas as concentrações baixa, média e alta dos controles de qualidade incluindo o analito e o padrão interno.

Cinco alíquotas de cada concentração foram extraídas e quantificadas imediatamente para obter os valores de referência (“frescos”) e outras cinco alíquotas de cada concentração foram processadas para os testes desejados.

#### 4.6.1- Estabilidade Pós-Processamento

Para avaliar a estabilidade pós-processamento, oito alíquotas de cada tipo da amostra foram mantidas, imediatamente após preparação, na temperatura de pós-processamento durante a análise. Os parâmetros utilizados para o teste foram:

- a) Temperatura ambiente;
- b) Tempo de corrida antecipado (estimado para a análise): 24 horas;
- c) Tempo do teste: 73 horas.

As concentrações de CQA, CQB e CQC para ramipril foram 0,6 ng/mL, 4 ng/mL e 40 ng/mL, e para ramiprilato 3 ng/mL, 9 ng/mL e 16 ng/mL, respectivamente.

A estabilidade do analito e o padrão interno foram comparados com a respectiva concentração referência.

#### 4.6.2- Estabilidade com Ciclos de Congelamento Degelo

Para avaliar a estabilidade, ciclos de congelamento e degelo foram estabelecidos para a estocagem das três concentrações distintas das amostras na temperatura de -20°C, seguido por um degelo à temperatura ambiente. Foram utilizadas cinco amostras de CQA, CQB e CQC nas concentrações 0,6 ng/mL, 4 ng/mL e 40 ng/mL para ramipril, e 3 ng/mL, 9 ng/mL e 16 ng/mL para ramiprilato, respectivamente.

O procedimento do teste ocorreu da seguinte maneira:

Ciclo 1- As amostras foram congeladas a -20°C e mantidas no freezer por 24 horas.

Após este período, foram descongeladas à temperatura ambiente e retornadas ao freezer.

Ciclo 2- As amostras permaneceram congeladas por 12 horas. Após esse tempo, foram novamente descongeladas à temperatura ambiente e quando totalmente líquidas, retornaram ao freezer.

Ciclo 3- O mesmo procedimento foi realizado para o segundo ciclo.

Ciclo 4- Último ciclo seguido da mesma maneira que o anterior.

No último ciclo as amostras foram descongeladas decorrido 12 horas no freezer, e quantificadas junto com as amostras de referência preparadas à fresco.

#### 4.6.3- Estabilidade de Curta Duração à Temperatura Ambiente

Para o teste proposto, cinco alíquotas de cada amostra em três diferentes concentrações foram mantidas antes do preparo à temperatura ambiente por 6 horas, o qual excede o tempo em que as amostras poderiam ser mantidas à temperatura ambiente depois de descongeladas até serem analisadas.

A estabilidade do analito foi comparada com a respectiva amostra recém preparada.

As concentrações de CQA, CQB e CQC para ramipril 0,6 ng/mL, 4 ng/mL e 40 ng/mL, e para ramiprilato, 3 ng/mL, 9 ng/mL e 16 ng/mL, respectivamente.

#### 4.6.4- Estabilidade de Longa Duração

Alíquotas de cada amostra foram inicialmente congeladas a -20°C e então descongeladas para serem extraídas e quantificadas após 116 dias. Este tempo de armazenamento é superior ao intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última amostra dos voluntários.

Para a verificação da estabilidade, utilizaram-se cinco amostras de cada controle de qualidade como mostrado na figura anterior, porém as concentrações para CQA, CQB e CQC foram 1,5 ng/mL, 15 ng/mL e 50 ng/mL respectivamente.

#### 4.6.5- Estabilidade da Solução Padrão (Estoque)

Para avaliar a estabilidade da solução padrão, as soluções de cada analito e dos padrões internos foram preparadas a fresco e comparadas com as mesmas soluções anteriormente avaliadas sob as seguintes condições:

a) Ramipril e Ramiprilato- 58 dias.

b) Enalapril e Enalaprilato- 15 dias.

As concentrações utilizadas no teste foram de 4 ng/mL e 40 ng/mL (CQB e CQC) para ramipril e enalapril, e 9 ng/mL e 16 ng/mL (CQB e CQC) para ramiprilato e enalaprilato.

## **4.7- Etapa Clínica**

### 4.7.1- Aspectos Gerais do Estudo

Vinte e seis voluntários sadios de ambos os sexos com idade entre 18 e 50 anos e dentro da faixa de 15% do peso corporal ideal foram selecionados para o estudo após estimativa dos seus estados de saúde por avaliação clínica (exame físico, ECG) e os seguintes testes laboratoriais: glicose sanguínea, uréia, creatinina, transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), fosfatase alcalina,  $\gamma$ -GT, bilirrubina total, albumina e proteína total, triglicérides, colesterol total, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células branca, e análise de urina de rotina. Todos os indivíduos foram negativos para Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV), Hepatite C (HCV) e Hepatite B (HBV) (exceto para cicatriz sorológica). Todos os voluntários deram consentimento informado por escrito e a Universidade Estadual de Campinas - Unicamp aprovou o protocolo clínico. O estudo foi conduzido em concordância com o fornecimento de revisões da Declaração de Helsinkí (1964), Tokyo (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996) e Edinburgh (2000).

O estudo começou com 26 voluntários saudáveis e terminou com 24 voluntários sadios. Dois voluntários saíram do estudo por razões pessoais. Os voluntários têm as seguintes características clínicas (de acordo com o gênero e expressado conforme a média  $\pm$  desvio padrão [escala]): Masculino: idade:  $30.7 \pm 8.8$  anos [20 - 44], altura:  $172.0 \pm 8.0$  cm [160.0 - 185.0], peso corporal:  $68.1 \pm 7.8$  kg [55.0 - 81.5]. Feminino: idade:  $32.4 \pm 6.2$  anos [22 - 39], altura:  $157.0 \pm 6.0$  cm [144.0 - 165.0], peso corporal:  $58.7 \pm 5.7$  kg [49.5 - 68.2]. O estudo foi em dosagem única, aleatorizado com período de duas semanas entre as doses. Durante cada período, os voluntários foram hospitalizados às 3 horas da tarde e tiveram uma refeição normal à noite e na manhã seguinte (aproximadamente 7 horas) receberam

uma única dose de ramipril (5 mg do comprimido da formulação). Água (200mL) foi dada imediatamente após a administração do fármaco e os voluntários estavam em jejum por 2 horas. Depois do período, um lanche padrão foi servido e uma refeição a noite foi fornecida 11 horas após a dosagem. A refeição padrão foi constituída de arroz, feijão, vegetais e frango frito e frutas como sobremesa. Nenhum outro alimento estava permitido durante o período de internação e o consumo de líquido foi permitido após o lanche (com exceção de bebidas contendo xantina, incluindo chá, café e cola). Em cada tempo 0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 e 36 horas, a medida da pressão arterial sistólica e diastólica e a temperatura foram anotadas.

As formulações seguintes foram empregadas: Ramipril (formulação teste dos laboratórios Biossintética Ltda, Brasil; lote número 273/03, data de validade 07/2005) e Triatec® (formulação referência padrão da Aventis Pharma, lote número 204971, data de validade 06/2005).

#### 4.7.2- Critérios de inclusão dos voluntários

Os seguintes critérios devem ser satisfeitos para que o voluntário possa participar do estudo:

- 1- Homem ou Mulher com idade entre 18 a 50 anos. As mulheres não poderiam estar grávidas e nem em regime de amamentação.
- 2- Voluntário com índice de massa corpórea (BMI)  $>19 \text{ Kg/m}^2$  e  $<30 \text{ Kg/m}^2$ .
- 3- Boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo médico, de acordo com as regras definidas no protocolo, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico e psicológico, eletrocardiograma (ECG) e exames laboratoriais complementares.
- 4- O voluntário deve compreender a natureza e propósito do estudo, incluindo possíveis riscos e efeitos adversos, e com intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio. Isto de ser confirmado pelo voluntário mediante assinatura do termo de consentimento.

#### 4.7.3- Critérios de Exclusão

Os seguintes critérios foram adotados para a não participação do voluntário no estudo:

- 1- Os Valores laboratoriais do voluntário estão fora da faixa normal aceita, considerado não significante clinicamente pelo investigador.
- 2- O voluntário ter participado de um estudo experimental ou ter ingerido um fármaco experimental três meses anteriores ao estudo.
- 3- Apresentar alguma doença clínica significativa ou cirurgia dentro de oito semanas imediatamente anterior ao início do estudo ou em terapia com algum fármaco.
- 4- Ter sido hospitalizado, por qualquer motivo, até 8 semanas antes do início do estudo.
- 5- Histórico de abuso de fármaco, medicamento ou álcool, ou ingerido bebidas alcoólicas nas 48 horas que antecederam o período da internação para início do estudo.
- 6- Ter historia de doença hepática, renal, epilética ou hemopoiética.
- 7- Apresentar hipotensão ou hipertensão de qualquer etiologia que necessitasse de tratamento farmacológico;
- 8- Ter apresentado infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca;
- 9- O voluntário doou ou perdeu sangue entre 3 três os meses que antecederam o estudo ou mais do que 1500 mL entre os 12 meses anteriores ao inicio do estudo.
- 10- Voluntário tem alguma outra condição com de acordo com o julgamento do investigador.
- 11- Histórico de hipersensitividade para ramipril ou compostos químicos relacionados, e de reações adversas ou hipersensitividade para alguma fármaco ou presença de alergias requerendo tratamento.
- 12- Elevado consumo de cafeína (mais do que 5 copos de chá ou café por dia).

13- Voluntário fumante

14- Teste de gravidez positivo.

15- História ou presença de doenças hepáticas ou gastrointestinais ou outra condição que interfere com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo da fármaco.

16- Tratamento dentro dos tres meses previos ao estudo com alguma fármaco conhecida tendo um potencial bem definido para toxicidade para os principais orgaos.

#### 4.7.4- Entrada do Voluntário no Estudo

Os voluntários foram aceitos no estudo somente quando considerados saudáveis como determinado pela história médica, exame físico e exames laboratoriais realizados dentro de oito semanas que antecederam o início do estudo.

#### 4.7.5- Restrição dos Voluntários

Os voluntários chegaram à Unidade e tiveram uma refeição (jantar) aproximadamente às 21 horas. Todos os voluntários permaneceram em jejum até duas horas após a administração na manha seguinte, quando o café da manha foi servido. O almoço foi servido entre 5 e 6 horas após administração, e o jantar 11 horas após. Nenhum outro alimento foi permitido durante o período de internação.

Líquidos foram permitidos após as refeições, mas bebidas contendo xantinas (incluindo chá, café e cola) foram evitados.

Não foi permitido fumar durante o período do internamento. Medicções concomitantes foram evitadas quando possível durante o estudo. Medicções concomitantes foram evitadas quando possível, mas em caso de necessidade, foram registradas em formulário apropriado.

O consumo de álcool foi limitado do começo ao fim do estudo e evitado completamente durante as 48 horas que antecederam cada coleta de sangue.

#### 4.7.6- Critérios de Retirada do Estudo

Os critérios utilizados foram os seguintes:

- 1- Voluntário não desejar continuar no estudo por razões pessoais do que por efeitos adversos do fármaco, por exemplo, indisponibilidade ou intolerância aos procedimentos do estudo;
- 2- Testes laboratoriais anormais considerados de significância clínica;
- 3- Doença intercorrente necessitando medicação;
- 4- Alguma outra condição julgada pelo investigador.

#### 4.7.7- Efeitos Adversos

Foi solicitado aos voluntários que relatassem qualquer evento adverso e a sua data de ocorrência. Eles foram também solicitados a notificar o investigador se houve ou não a necessidade de medicação adicional. Alguns efeitos adversos que ocorreram durante o período do estudo foram registrados no formulário de relato de caso (CRF).

### **4.8- Protocolo Experimental**

Os voluntários receberam em cada um dos períodos as seguintes formulações, de acordo com um exemplo da tabela de randomização (Anexo I):

Formulação teste- Ramipril comprimido 5 mg.

Formulação referência- Triatec<sup>®</sup> 5 mg.

#### 4.8.1- Coleta das Amostras

As coletas de sangue para determinação das concentrações plasmáticas de ramipril foram obtidas, através de "butterfly" (escalpe) ou cateter venoso heparinizado, introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário antes e nos tempos de 0,33h, 0,66h, 1h, 1,33h, 1,66h, 2h, 2,5h, 3h, 3,5h, 4h, 4,5h, 5h, 5,5h, 6h, 6,5h, 7h, 8h, 10h, 12h, 14h, 16h, 18h, 24h, 32h e 36h após a administração de uma das formulações.

As amostras de sangue foram centrifugadas a aproximadamente 2500 g por 10 min à temperatura ambiente. O plasma foi transferido para tubos criogênicos devidamente identificados e estocados a temperatura de -20°C até que analisado o conteúdo para ramipril e ramiprilato.

#### 4.8.2- Aspectos Éticos

O protocolo clínico e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram aprovados pelo comitê de ética da Unicamp. O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996) e Edinburgo (2000).

##### 4.8.2.1- Termo de consentimento livre e esclarecido

Os voluntários receberam uma explicação da natureza e propósito do estudo pelo investigador. Foi de entendimento para o voluntário que o estudo foi realizado somente para objetivos de pesquisa, sem fornecer algum benefício terapêutico para o voluntário. O voluntário também foi esclarecido da sua liberdade de se retirar do estudo a qualquer hora sem se prejudicar. A cada voluntário foi solicitado que ao concordar em participar do estudo, assinasse o termo de consentimento para a participação do estudo.

##### 4.8.2.2- Confidencialidade

Os resultados dos testes laboratoriais e exames médicos foram registrados na ficha clínica do voluntário. Todas as informações obtidas durante a condução do estudo com respeito ao estado de saúde dos voluntários ficaram disponíveis para os médicos. Uma copia dos exames laboratoriais realizados pré e pós-estudo clínico foi entregue ao voluntário.

#### 4.9- Análise Farmacocinética e Estatística

A taxa de eliminação constante ( $k_e$ ) foi estimada por regressão linear dos pontos descrevendo a fase de eliminação em uma curva logarítmica-linear. O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) foi derivado desta taxa constante ( $t_{1/2} = \ln(2)/k_e$ ).

A bioequivalência entre as duas formulações foi avaliada pelo cálculo individual da razão teste/referência para o pico da concentração máxima ( $C_{max}$ ), área sob a curva (ASC) da concentração plasmática até a última concentração observada ( $ASC_{last}$ ), e a área sob a curva entre a primeira amostra (pré-dosagem) e infinito ( $ASC_{0-inf}$ ). A concentração máxima e o tempo empregado para alcançar esta concentração ( $T_{max}$ ) foram obtidos diretamente das curvas. As áreas sob as curvas da concentração de plasma de ramipril e ramiprilato versus o tempo de zero até a última concentração detectada ( $ASC_{last}$ ) foram calculadas pela aplicação de uma equação linear trapezoidal. A extrapolação destas áreas ao infinito ( $ASC_{0-inf}$ ) foi feita pela adição do valor  $C_{last}/k_e$  para a  $ASC_{last}$  calculada (onde  $C_{last}$  é a última concentração detectada). Os dados da ASC e  $C_{max}$  para as duas formulações foram analisados pelo ANOVA para estabelecer se o intervalo de confiança (IC) de 90% da razão estava dentro do intervalo de 80 – 125% indicando bioequivalência como proposto pela US Food and Drug Administration (FDA). Análises paramétricas e não-paramétricas das médias aritméticas e diferenças individuais de  $T_{max}$  entre as formulações teste e referência foram também executadas.

O programa usado inclui o WinNonLin Professional Network Edition (Scientific Consulting, v. 1.5), Microsoft Excel (v. 7.0) e GraphPad Prism (v. 3.02).



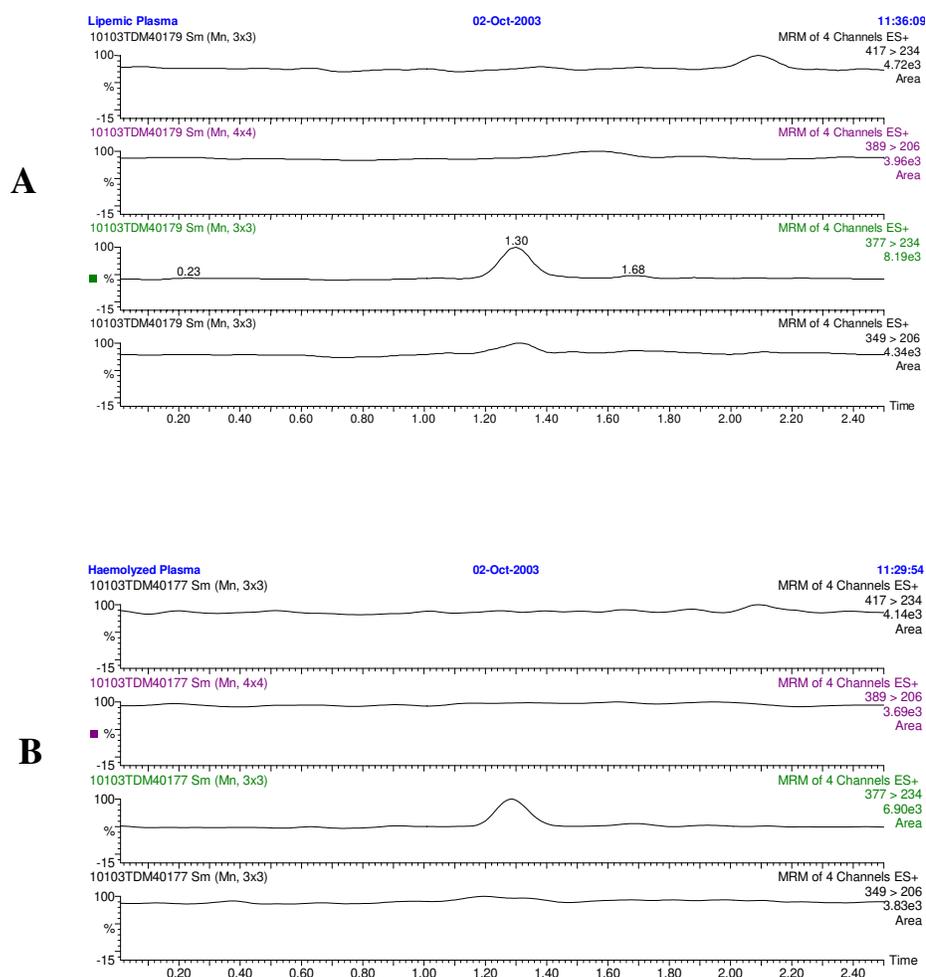
## ***5- RESULTADOS***

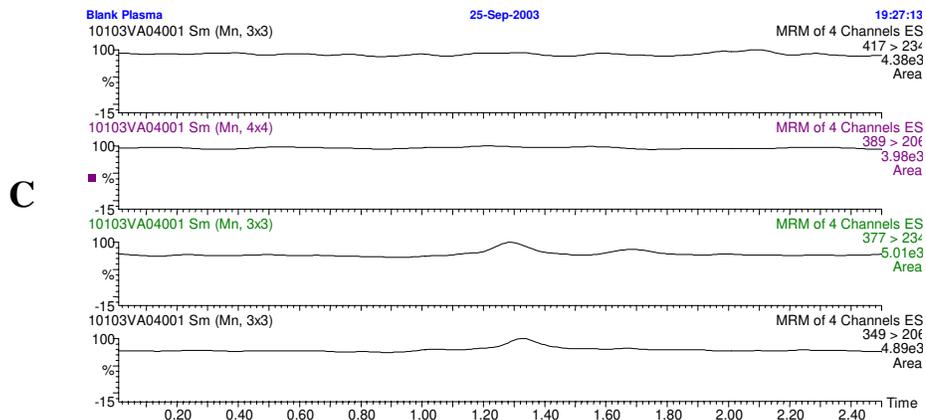


## 5.1- Especificidade

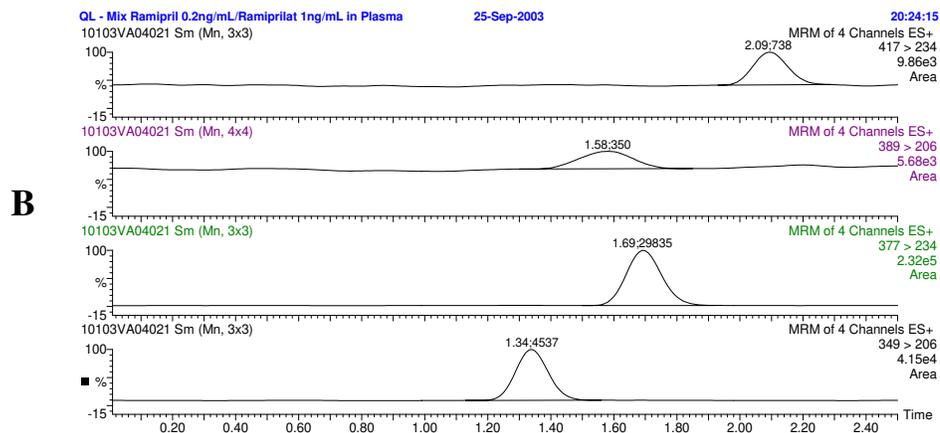
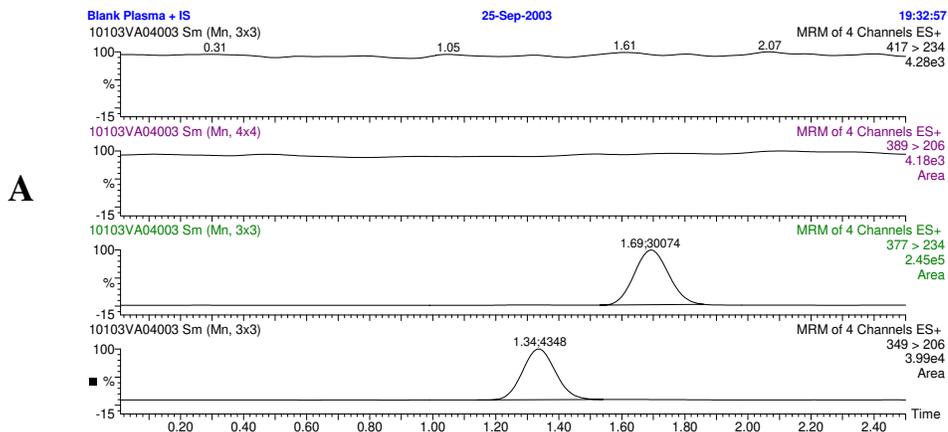
O método proposto mostrou-se específico para ramipril, ramiprilato, enalapril e enalaprilato, pois a análise dos três tipos de plasma branco humano (normal, lipêmico e hemolizado) mostrou que não houve interferentes por contaminação de fatores endógenos, como mostrado na figura 4.

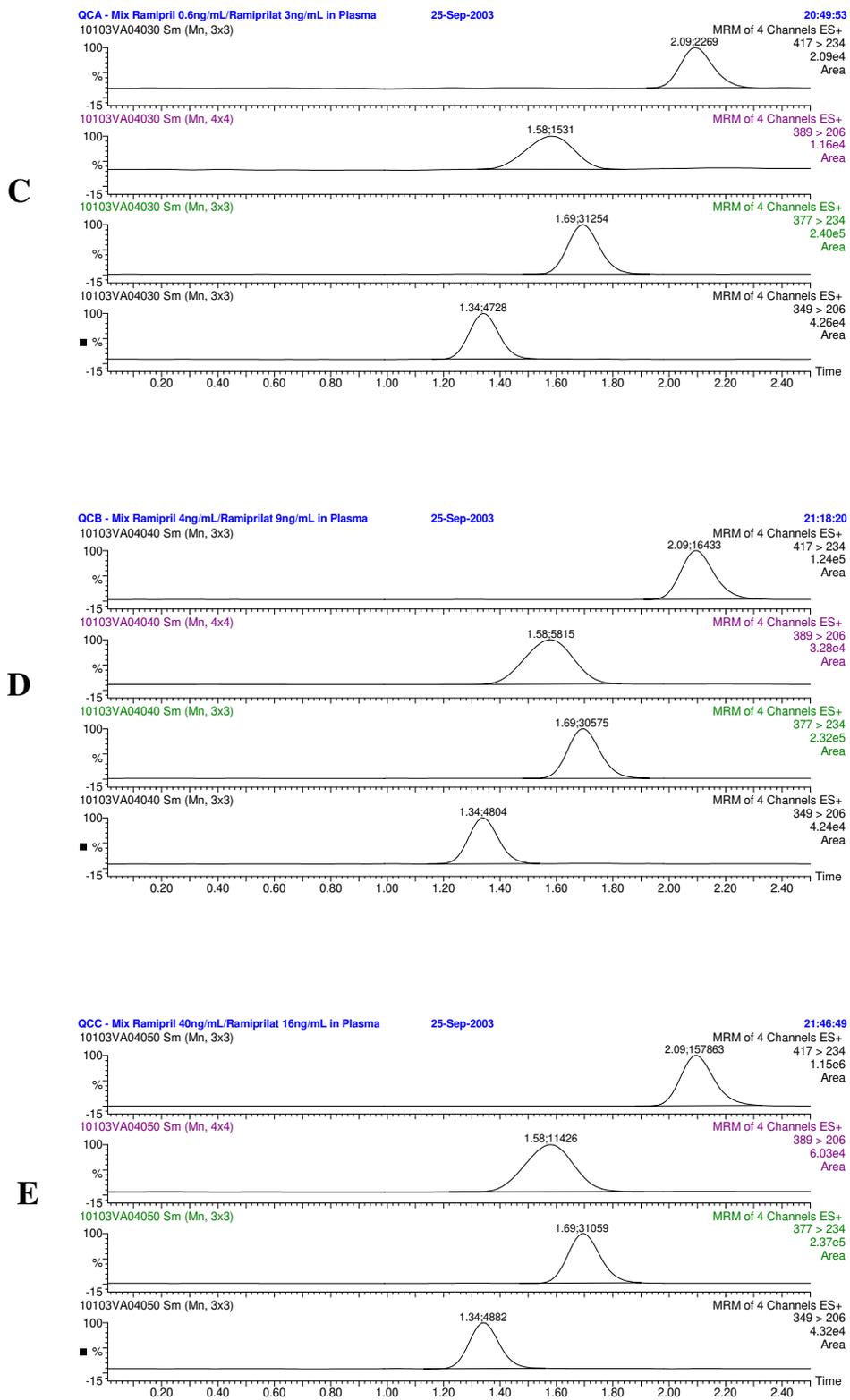
Nos cromatogramas dos picos padrões representativos para o zero, LOQ, CQA, CQB e CQC (figura 5), observou-se também que não houve interferência significativa nos tempos de retenção do fármaco e do padrão interno quando comparados com os cromatogramas obtidos do plasma branco.





**Figure 4-** Plasma branco lipêmico (A), hemolizado (B) e normal (C)





**Figure 5-** Picos representativos para branco + padrão interno (IS) (A), LOQ (B), CQA (C), CQB (D) e CQC (E) (Analitos e Padrões Internos)

### 5.1.1- Determinação do Limite de Quantificação

O LOQ validado sob as condições encontradas no pré-estudo de validação foi de 0,2 e 1 ng/mL para ramipril e ramiprilato, respectivamente. A precisão foi  $\leq 20\%$  e a exatidão esteve entre 80-120%. Os dados específicos estão apresentados nas tabelas 10 e 11.

**Tabela 10-** Validação do LOQ para ramipril

<b>Amostra utilizada</b>	<b>LOQ</b>
<b>Concentração medida (ng/mL)</b>	<b>Exatidão Individual (%)</b>
0.229	114.5
0.226	113.0
0.242	121.0
0.213	106.5
0.202	101.0
0.225	112.5
0.228	114.0
0.222	111.0
<b>Média (ng/mL)</b>	<b>0.223</b>
<b>Precisão (CV%)</b>	<b>5.3</b>
<b>Exatidão (%)</b>	<b>111.7</b>

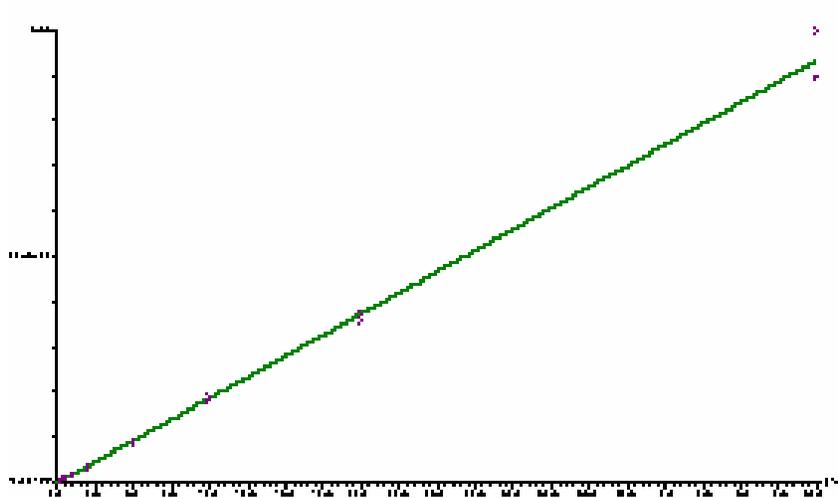
**Tabela 11-** Validação do LOQ para ramiprilato

<b>Amostra utilizada</b>	<b>LOQ</b>
<b>Concentração medida (ng/mL)</b>	<b>Exatidão Individual (%)</b>
1.25	125.0
1.22	122.0
1.19	119.0
1.19	119.0
1.18	118.0
1.22	122.0
1.15	115.0
1.16	116.0
<b>Média (ng/mL)</b>	<b>1.20</b>
<b>Precisão (CV%)</b>	<b>2.8</b>
<b>Exatidão (%)</b>	<b>119.5</b>

## 5.2- Linearidade

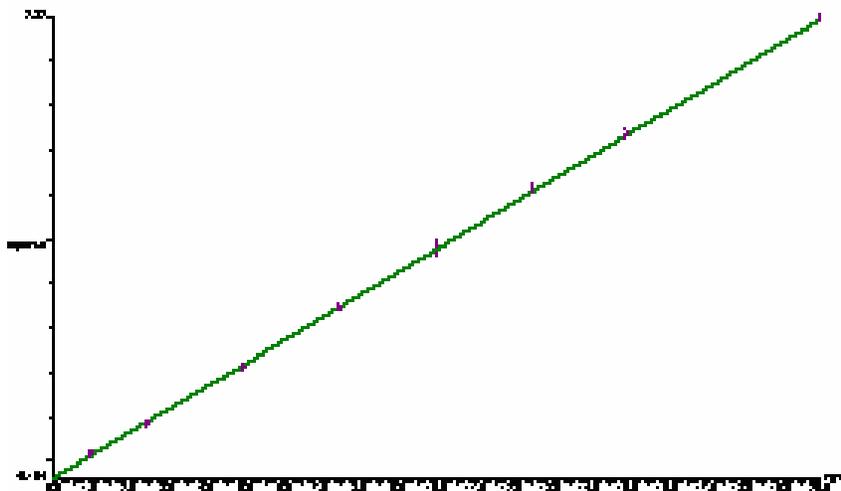
O método apresentou-se linear nas concentrações 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 e 50 ng/mL para ramipril com um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0.9999 como mostrado na figura 6, linear nas concentrações 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 e 20 ng/mL apresentando um coeficiente de correlação de 0.9996 para o ramiprilato como apresentado na figura 7.

### Ramipril



**Figura 6-** Linearidade do ramipril

### Ramiprilato



**Figura 7-** Linearidade do ramiprilato

### 5.3- Precisão e Exatidão

Para a obtenção da precisão e exatidão, pelo menos quatro concentrações distintas (LOQ e Controles de Qualidade) foram avaliadas usando oito amostras de cada concentração.

#### 5.3.1- Precisão e Exatidão Intralote

Os resultados estão apresentados na tabela 12 para o ramipril. A média final apresentada na tabela foi feita pelo cálculo das concentrações quantificadas de 8 amostras individuais. Como podemos observar, a precisão para as quatro concentrações variou de 2,1 a 5,3%, não excedendo o limite de 15% para os CQs e 20% para o LOQ. A exatidão esteve entre 105,0 e 111,7% .

As precisões e exatidões intralote para CQA, CQB e CQC foram 5,5 e 105,0, 2,1 e 107,9, 3,8 e 106,3, respectivamente. Estes resultados demonstram que os valores para o ramipril permaneceram dentro da variação permitida.

**Tabela 12-** Dados da análise intralote para o ramipril

LOQ/CQ	Concentração quantificada (ng/mL)								Validação			
	Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	Média (ug/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
LOQ		0,229	0,226	0,242	0,213	0,202	0,225	0,228	0,222	0,223	5,3	111,7
CQA		0,646	0,609	0,569	0,621	0,611	0,680	0,641	0,661	0,630	5,5	105,0
CQB		4,38	4,39	4,24	4,35	4,30	4,14	4,32	4,41	4,32	2,1	107,9
CQC		43,7	43,2	45,0	43,5	41,5	40,5	42,4	40,5	42,5	3,8	106,3

**Concentração nominal:** CQA = 0,6 ng/mL; CQB = 4 ng/mL; CQC = 40 ng/mL

Os dados da tabela 13 indicam a média final dos valores para cada uma das quatro concentrações. O Cálculo da média foi o mesmo feito para o ramipril. Os valores para precisão e exatidão interlote encontraram-se dentro do limite permitido de 15% para os CQs e 20% para o LOQ, e foram para CQA, CQB e CQC, 4,2 e 101,4, 3,2 e 103,4, 2,5 e 105,1 respectivamente.

**Tabela 13-** Dados da análise intralote para o ramiprilato

LOQ/ CQ	Concentração quantificada (ng/mL)								Validação		
	Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	Média (ug/mL)	CV (%)
LOQ	1,25	1,22	1,19	1,19	1,18	1,22	1,15	1,16	1,20	2,8	119,5
CQA	2,91	2,95	2,85	3,08	3,06	3,18	3,10	3,21	3,04	4,2	101,4
CQB	9,11	9,76	9,64	9,09	8,83	9,31	9,39	9,32	9,31	3,2	103,4
CQC	16,7	16,7	17,5	16,6	16,9	16,8	17,2	16,1	16,8	2,5	105,1

**Concentração nominal:** CQA = 3 ng/mL; CQB = 9 ng/mL; CQC = 16 ng/mL

### 5.3.2- Precisão e Exatidão Interlote

A análise dos resultados apresentados na tabela 14, mostra uma precisão e exatidão de 7,0 e 100,9, 7,5 e 98,7, 7,3 e 98,9, para CQA, CQB e CQC respectivamente. O LOQ também foi calculado, e para esse parâmetro os valores da precisão e exatidão foram 8,3 e 105,6 respectivamente.

**Tabela 14-** Dados da análise interlote para o ramipril

Amostras	Concentração média de cada ensaio (ng/mL)			Precisão e Exatidão interlote		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média (ng/mL)	Média CV (%)	Exatidão (%)
LOQ	0,223	0,196	0,214	<b>0,211</b>	<b>8,3</b>	<b>105,6</b>
CQA	0,630	0,585	0,600	<b>0,605</b>	<b>7,0</b>	<b>100,9</b>
CQB	4,32	3,81	3,71	<b>3,95</b>	<b>7,5</b>	<b>98,7</b>
CQC	42,5	38,5	37,7	<b>39,6</b>	<b>7,3</b>	<b>98,9</b>

**Concentração nominal:** CQA = 0,6 ng/mL; CQB = 4 ng/mL; CQC = 40 ng/mL

Para o ramiprilato, como poder ser observado na tabela 15, os valores para precisão e exatidão estiveram dentro do limite permitido, não excedendo 15% para cada

concentração analisada (CQ) e com tolerância de até 20% da concentração do limite de quantificação.

**Tabela 15-** Dados da análise interlote para o ramiprilato

Amostras	Concentração média de cada ensaio (ng/mL)			Precisão e Exatidão interlote		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média (ng/mL)	Média CV (%)	Exatidão (%)
24						
LOQ	1,20	1,09	1,14	<b>1,14</b>	<b>5,4</b>	<b>114,0</b>
CQA	3,04	2,96	3,05	<b>3,02</b>	<b>3,8</b>	<b>100,6</b>
CQB	9,31	9,13	9,28	<b>9,24</b>	<b>2,7</b>	<b>102,6</b>
CQC	16,8	16,5	16,8	<b>16,7</b>	<b>3,6</b>	<b>104,5</b>

Concentração nominal: CQA = 3 ng/mL; CQB = 9 ng/mL; CQC = 16 ng/mL

#### 5.4- Recuperação

Os resultados para os analitos ramipril e ramiprilato e os padrões internos enalapril e enalaprilato, mostraram uma recuperação consistente e reprodutível nas três diferentes concentrações como indicado na tabela 16. Estes resultados estiveram de acordo com os parâmetros de consistência e reprodutibilidade, e foram considerados adequados para o método.

**Tabela 16-** Resultados da recuperação média para ramipril, ramiprilato, enalapril e enalaprilato

Média dos valores em ng/mL - n = 5								
Analito	Ramipril		Ramiprilato		Enalapril		Enalaprilato	
	Média Recuperação	CV (%)	Média Recuperação	CV (%)	Média Recuperação	CV (%)	Média Recuperação	CV (%)
CQA	86,0	9,1	73,6	1,2	103,2	20,5	87,8	6,3
CQB	91,4	5,0	79,8	7,3	87,4	11,1	86,5	3,3
CQC	91,4	3,7	83,0	5,3	89,5	7,9	87,8	2,8

## 5.5- Estabilidade

### 5.5.1- Estabilidade com Ciclos de Congelamento e Degelo

Os resultados apresentados na tabela 17 indicam que os analitos ramipril e ramiprilato em plasma humano são estáveis por pelo menos quatro ciclos de congelamento e degelo, quando estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e descongelados a temperatura ambiente.

**Tabela 17-** Estudo de estabilidade do ramipril e ramiprilato após o quarto ciclo para os controles CQA, CQB e CQC.

Analito	Tipo da amostra	Concentração referência	Valores da concentração de Amostras recém-preparadas		Valores da concentração apos o 4º ciclo		Variação Média (%)
			Média	CV (%)	Média	CV (%)	
Ramipril (n=5)	CQA	0,6 ng/mL	0,613	3,8	0,593	2,5	-3,4
	CQB	4 ng/mL	4,00	2,0	4,02	1,9	0,7
	CQC	40 ng/mL	39,4	2,1	41,9	1,6	6,2
Ramiprilato (n=5)	CQA	3 ng/mL	3,01	1,9	3,04	2,0	0,8
	CQB	9 ng/mL	8,79	1,3	8,78	1,1	-0,2
	CQC	16 ng/mL	15,7	4,0	16,9	2,5	7,6

#### 5.5.2- Estabilidade de curta duração

Pode-se observar pelos resultados apresentados na tabela 18, que as variações em relação às concentrações nominais encontram-se dentro da faixa permitida, indicando que os analitos quando processadas após 6 horas na temperatura ambiente, não apresentaram degradação significativa.

**Tabela 18-** Estabilidade de curta duração para ramipril e ramiprilato.

Analito	Tipo da amostra	Concentração referênci	Valores da concentração de Amostras recém-preparadas		Valores da concentração apos 6 horas		Variação Média (%)
			Média	CV (%)	Média	CV (%)	
Ramipril (n=5)	CQA	0,6 ng/mL	0,613	3,8	0,586	3,6	-4,5
	CQB	4 ng/mL	4,00	2,0	3,91	3,3	-2,3
	CQC	40 ng/mL	39,4	2,1	40,9	3,3	3,7
Ramiprilato (n=5)	CQA	3 ng/mL	3,01	1,9	3,04	5,4	0,7
	CQB	9 ng/mL	8,79	1,3	8,38	3,7	-4,8
	CQC	16 ng/mL	15,7	4,0	16,4	2,1	4,6

### 5.5.3- Estabilidade de longa duração

Os resultados obtidos no teste de longa duração indicam que ramipril e ramiprilato em plasma humano podem ser armazenados em freezer a -20°C por pelo menos 116 dias, com nenhuma degradação significativa dos analitos após análise apresentando, portanto, estabilidade de longa duração. Dados apresentados na tabela 19.

**Tabela 19-** Estabilidade de longa duração para ramipril e ramiprilato

Analito	Tipo da amostra	Concentração referênci	Valores da concentração de Amostras recém-preparadas		Valores da concentração apos 116 dias		Variação Média (%)
			Média	CV (%)	Média	CV (%)	
Ramipril (n=5)	CQA	1,5 ng/mL	1,23	2,9	1,26	1,4	2,8
	CQC	50 ng/mL	47,2	5,5	47,9	1,5	1,4
Ramiprilato (n=5)	CQA	1,5 ng/mL	1,34	3,2	1,33	3,7	-1,0
	CQC	15 ng/mL	12,8	3,3	14,1	1,2	10,3

Concentração nominal: CQA = 1,5 ng/mL; CQC = 50 ng/mL (Ramipril);

CQA = 1,5 ng/mL; CQC = 15 ng/mL (Ramiprilato)

#### 5.5.4- Estabilidade da solução padrão (Estoque)

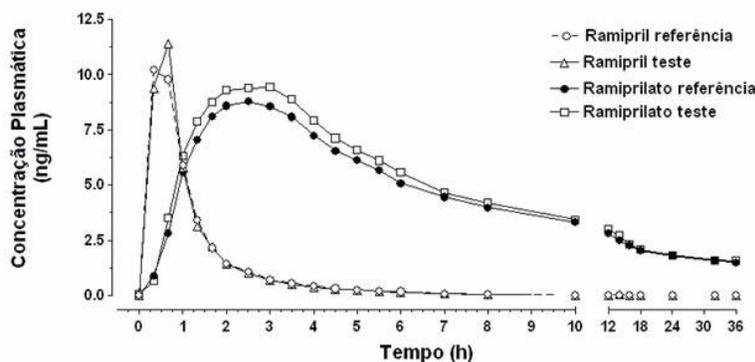
A concentração das soluções preparadas a fresco foi comparada com a concentração das soluções preparadas nos tempos de estocagem correspondentes de cada analito. O teste de estabilidade indicou que ramipril e ramiprilato não apresentaram degradação apos 58 dias quando estocados a + 4°C. Enalapril e enalaprilato podem ser estocados a + 4°C por pelo menos 15 dias. Os resultados estão apresentados na tabela 20.

**Tabela 20-** Estabilidade das soluções padrão

	Concentração para solução nova (ng/mL)		Concentração para solução velha (ng/mL)		Variação média após 58 ou 15 dias (%)	
	Concentração referência	Média	CV (%)	Média		CV (%)
<b>Ramipril</b> (58 dias)	4 ng/mL	4,01	1,3	4,05	2,5	0,8
	40 ng/mL	41,2	3,4	39,8	5,1	-3,4
<b>Enalapril</b> (15 dias)	4 ng/mL	4,16	2,8	3,82	3,0	-8,2
	40 ng/mL	44,6	1,8	38,6	3,3	-13,5
<b>Ramiprilato</b> (58 dias)	9 ng/mL	8,74	2,7	8,87	4,0	1,4
	16 ng/mL	16,0	4,6	15,5	3,9	-3,3
<b>Enalaprilato</b> (15 dias)	9 ng/mL	9,2	2,9	10,3	6,8	11,8
	16 ng/mL	15,9	2,2	18,6	5,0	16,8

### 5.6- Análise Farmacocinética e Estatística

A figura 8 apresenta a curva média das concentrações plasmáticas de ramipril e ramiprilato versus tempo após administração de cada uma das formulações 5 mg. Podemos observar que os valores correspondentes de C<sub>max</sub> e T<sub>max</sub> foram equivalentes entre as formulações estudadas.



**Figura 8-** Perfil da concentração plasmática *versus* o tempo para ramipril e ramiprilato, obtido após administração oral de formulação ramipril 5 mg.

A tabela 21 mostra os parâmetros farmacocinéticos usados para avaliar a

bioequivalência da formulação teste versus referência. Os parâmetros ASC foram avaliados para a extensão da absorção e  $C_{max}$  e  $T_{max}$  para a velocidade de absorção.

**Tabela 21-** Parâmetros farmacocinéticos do ramipril e ramiprilato

	Ramipril		Ramiprilato	
	Triatec® 5 mg	Ramipril 5 mg	Triatec® 5 mg	Ramipril 5 mg
<b>ASC<sub>last</sub> (ng*h/mL)</b>				
Média Geométrica	12,77	12,84	105,95	112,18
DP	5,09	4,58	25,22	21,70
<b>ASC<sub>inf</sub> (ng*h/mL)</b>				
Média Geométrica	13,33	13,59	187,02	184,48
DP	5,15	4,72	42,78	39,56
<b>ASC<sub>0-36</sub> (ng *h/mL)</b>				
Média Geométrica	13,16	13,28	106,21	112,38
DP	5,20	4,69	25,28	21,76
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>				
Média Geométrica	12,82	13,00	9,81	10,45
DP	5,87	4,99	6,34	5,80
<b>T<sub>1/2</sub> (h)</b>				
Média	1,46	1,83	36,59	32,09
Variação	0,54 - 3,61	0,29 - 5,18	13,30 - 80,64	11,65 - 75,66
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>				
Média	0,53	0,57	3,35	3,05
Variação	0,33 - 1,00	0,33 - 1,00	1,33 - 10,00	1,33 - 6,00

**ASC<sub>last</sub>**- Área sob a curva de concentração versus tempo da última concentração mensurável,  
**ASC<sub>inf</sub> (ng\*h/mL)**- Área sob a curva de concentração versus tempo do tempo zero ao infinito (extrapolado),  
**ASC<sub>0-36</sub> (ng \*h/mL)**- Área sob a curva de concentração versus tempo zero até o último tempo de coleta,  
**C<sub>max</sub> (ng/mL)**- A máxima concentração plasmática, **T<sub>1/2</sub> (h)**- Tempo de meia vida de eliminação,  
**T<sub>max</sub> (h)**- Tempo da máxima concentração plasmática

A Tabela 22 mostra os resultados das análises de bioequivalência dos parâmetros farmacocinéticos para  $ASC_{last}$ ,  $ASC_{inf}$  e  $C_{max}$ .

**Tabela 22-** Média Geométrica individual da  $ASC_{last}$ ,  $ASC_{0-\infty}$  e  $C_{max}$  (teste/ formulação referência), o respectivo intervalo de confiança de 90% (IC) e CV (%).

<b>n = 24</b>		<b>Ramipril</b>			<b>Ramiprilato</b>		
		<b>Paramétrico</b>			<b>Paramétrico</b>		
<b>Triatec®/Ramipril</b>			<b>Intra-</b>			<b>Intra-</b>	
<b>5 mg</b>	<b>Média</b>	<b>IC 90%</b>	<b>Indivíduo</b>	<b>Média</b>	<b>IC 90%</b>	<b>Indivíduo</b>	<b>CV%</b>
			<b>CV%</b>				
$ASC_{last}$	102,49	92,76 - 113,25	19,57	105,88	101,56 - 110,39	7,92	
$ASC_{inf}$	103,60	93,56 - 114,73	19,79	97,30	90,17 - 104,99	15,71	
$C_{max}$	104,69	93,21 - 117,59	22,31	108,48	98,86 - 119,04	17,21	
<b>Homem - n = 11</b>		<b>Ramipril</b>			<b>Ramiprilato</b>		
		<b>Paramétrico</b>			<b>Paramétrico</b>		
<b>Triatec®/Ramipril</b>			<b>Intra-</b>			<b>Intra-</b>	
<b>5 mg</b>	<b>Média</b>	<b>IC 90%</b>	<b>Indivíduo</b>	<b>Média</b>	<b>IC 90%</b>	<b>Indivíduo</b>	<b>CV%</b>
			<b>CV%</b>				
$ASC_{last}$	114,39	95,43 - 137,12	19,50	104,39	98,85 - 110,26	6,43	
$ASC_{inf}$	116,44	96,85 - 139,99	19,47	96,17	84,17 - 109,89	17,05	
$C_{max}$	116,55	97,75 - 138,98	18,58	110,90	98,72 - 124,58	12,91	
<b>Mulher - n = 13</b>		<b>Ramipril</b>			<b>Ramiprilato</b>		
		<b>Paramétrico</b>			<b>Paramétrico</b>		
<b>Triatec®/Ramipril</b>			<b>Intra-</b>			<b>Intra-</b>	
<b>5 mg</b>	<b>Média</b>	<b>IC 90%</b>	<b>Indivíduo</b>	<b>Média</b>	<b>IC 90%</b>	<b>Indivíduo</b>	<b>CV%</b>
			<b>CV%</b>				
$ASC_{last}$	93,06	82,74 - 104,67	17,88	105,63	98,99 - 112,7	8,69	
$ASC_{inf}$	93,60	83,04 - 105,50	18,10	98,52	88,21 - 110,04	15,88	
$C_{max}$	96,22	80,79 - 114,61	25,71	103,86	89,48 - 120,54	20,30	

## *6- DISCUSSÃO*



O desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação de fármacos em matrizes biológicas quer seja sangue total, plasma, soro ou urina, é uma ferramenta de grande importância para o controle de qualidade dos medicamentos. É um fator determinante na geração de dados reprodutíveis e confiáveis após execução de estudos farmacocinéticos.

A validação de um método bioanalítico deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise (BRASIL, 2003a).

A literatura relata várias técnicas de quantificação de ramipril em plasma e outros fluidos biológicos tais como cromatografia líquida de fase reversa de alta pressão quantificado por radioimunoensaio com limite de quantificação (LOQ) de 0.25 - 0.4 fmol/mL e tempo de retenção (TR) de 6 min (NUSSBERGER *et al*, 1985; CAMPBELL *et al*, 1993), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (LOQ 10 ng/mL; RT 10 min) (MAURER *et al*, 1998), espectrometria UV tendo um LOQ= 23000 ng/mL (BONAZZI *et al*, 1997); cromatografia líquida de alta pressão com fase reversa (LOQ= 500 ng/mL e TR= 8.5 - 30 min) (HOGAN *et al*, 2000); polarografia (LOQ= 20 ng/mL) (AL-MAJED *et al*, 2000); cromatografia líquida acoplada com detecção UV (LOQ= 180 ng/mL e TR= 7.36 min) (BELAL *et al*, 2001) e cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LOQ= 0.5 ng/mL e tempo de retenção (TR)= 1.0 - 1.5 min para ambos ramipril e ramiprilato (ZHU *et al*, 2002).

O processamento de um grande número de matrizes biológicas, que geralmente é requerido em estudos de farmacocinética, bioequivalência e biodisponibilidade, necessita de procedimentos analíticos rápidos, sensíveis específicos e seletivos. Nosso método teve um LOQ adequado de 0,2 ng/mL e 1,0 ng/mL para ramipril e ramiprilato respectivamente. É um método apropriado que pode ser realizado em um curto período, pois apresenta um TR de 2,1 e 1,6 min para ramipril e ramiprilato apresentando tempo total de corrida de 2,5 minutos.

A recuperação de um analito em um ensaio é a resposta do detector de uma quantidade de analito adicionada e ou separada de uma matriz biológica. A recuperação está ligada à eficiência do método de extração utilizado, dentro dos limites de variabilidade (SHAH *et al.*, 2000).

Embora vários métodos de extração tenham sido testados para o isolamento do ramipril, ramiprilato e seus padrões internos de plasma humano, o cartucho de extração Oasis HBL fornece uma melhor recuperação devido aos seus grupos funcionais combinados hidrofílico-lipofílico. No entanto, isso pode resultar na saturação do cartucho de extração. Isto pode ser resolvido por uma centrifugação simples antes de acrescentar a amostra e durante o processo de extração da amostra (ZHU *et al.*, 2002).

A técnica de extração utilizada no nosso estudo foi a extração em fase sólida. Nosso método apresentou uma média de recuperação de 89,6% (ramipril), 78,8% (ramiprilato), 93,3% (enalapril) e 87,3% (enalaprilato).

Métodos anteriormente descritos para a determinação de ramipril apresentaram LOQ (sensibilidade) variando de 0,5 ng/mL – 23000 ng/mL (MAURER *et al.*, 1998; AL-MAJED *et al.*, 2000; BONAZZI *et al.*, 1997; HOGAN *et al.*, 2000; BELAL *et al.*, 2001 e ZHU *et al.*, 2002). O método proposto apresentou sensibilidade de 0,2 ng/mL para ramipril e de 1ng/mL para ramiprilato. Com a sensibilidade apresentada pelo método as concentrações plasmáticas de ramiprilato podem ser determinadas até 36 horas com precisão e exatidão, após a administração de ramipril (pró-droga) 5 mg.

A metodologia validada foi aplicada para determinação dos parâmetros farmacocinéticos de duas formulações de ramipril 5 mg em um estudo de biodisponibilidade comparativa.

Após administração oral de ramipril 5 mg, os valores de ramipril e ramiprilato observados para  $C_{max}$  e  $T_{max}$  foram similares aos relatados na literatura (LEE *et al.*, 1996; VAN GRIENSVEN *et al.*, 1995) e equivalente entre as formulações.

O intervalo de confiança de 90% calculado para a razão individual das médias de  $C_{max}$ ,  $ASC_{last}$  e  $ASC_{0-inf}$  para Ramipril/Triatec<sup>®</sup> e Ramiprilato/Triatec<sup>®</sup> esteve incluído dentro do intervalo de 80-125% definido pelo FDA (FDA, 1993; FDA, 1998), estabelecendo assim a bioequivalência para taxa e extensão de absorção entre as duas formulações.

A metodologia para determinação simultânea de ramipril e ramiprilato em plasma humano mostrou estar de acordo com os conceitos de alta sensibilidade, alta especificidade e rápido processamento de amostras requerido para estudos farmacocinéticos, bioequivalência e biodisponibilidade.



## *7- CONCLUSÃO*



O método analítico descrito para a quantificação de ramipril e ramiprilato em plasma humano apresentou alta sensibilidade, pois o menor limite de quantificação do método (LQ=0,2 ng/mL) apresentou um coeficiente de variação inferior a 20%, e especificidade já que não houve interferência nos tempos de retenção dos picos do analito e do padrão interno superior a 20% da resposta do limite de quantificação.

O IC 90% para as razões de  $C_{max}$  e  $ASC_{last}$  esteve dentro do intervalo de 80-125% proposto pelo FDA, e concluiu-se que as formulações de ramipril avaliadas em estudo farmacocinético apresentaram bioequivalência para ambos grau e extensão de absorção



## ***8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



AIACHE, J.M.; ROCA, R.; BASTIDE, J.; BASTIDE, M.; KANTELIP, J.P. Biopharmaceutical study of new oral dosage forms of indomethacin. **J Pharm Belg.** 1983; 38(1):5-21

AL-MAJED, A..A.; BELAL, F.; ABADI, A.; AL-OBAID, A.M. The voltammetric study and determination of ramipril in dosage forms and biological fluids. **Farmaco** 2000; 55:233-8.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, Jr. L. V. **Farmacotécnica. Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos.** São Paulo: Premier, 2000.

ARANCIBIA, A. Calidad Biofarmacéutica. Estudios “in vitro” e “in vivo”. **Acta Farm. Bonarense**, Buenos Aires, 1991; v. 10, n. 2, p. 123-133,

A SYMPOSIUM: RAMIPRIL - A new angiotensin converting enzyme inhibitor. **American Journal of Cardiology** 1987; 59 (10): 1D - 177D.

BRASIL. Resolução N° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003a.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada da ANVISA (RDC) N° 135, de 29 de maio de 2003. Estabelece regulamento técnico para medicamento genérico. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003b.

BELAL, F.; AL-ZAAGI, I.A.; GADKARIEM, E.A.; ABOUNASSIF, M.A. A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. **J Pharm Biomed Anal.**, 2001; 24:335-42.

BENNETT, L.Z. Understanding Bioequivalence Testing. **Transplantation Proceedings** 1999; v. 31, Suppl 3A, 7S-9S.

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.**, 1994; New York, v. 11, n. 5, p. 715-722.

BONAZZI, D.; GOTTI, R.; ANDRISANO, V.; CAVRINI, V. Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). **J. Pharm. Biomed. Anal.** 1997; 16:431-8.

BUNNING, P.. Inhibition of angiotensin converting enzyme by 2-{*N*-{(*S*)-1-(ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl}-L-alanyl}-(1*S*,3*S*, 5*S*)-2-azabicyclo(3-3-0) octane carboxylic acid (HOE 498 diacid): comparison with captopril and enalaprilat. **Arzneimittel-Forschung**, 1984; 34(II): 1406-1410.

BUNNING, P. Kinetic properties of the angiotensin converting enzyme inhibitor ramiprilat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** 10, 1987; (suppl. 7): S31-S35.

CAMPBELL, D.J.; KLADIS, A.; DUNCAN, A.M. Nephrectomy, converting enzyme inhibition and angiotensin peptides. **Hypertension**, 1993; 2:513-22.

de Graeff, P.A.; Kingma, J.H.; Dunselman, P.H.J.M.; Wesseling, H.; Lie, K.I. Acute hemodynamic and hormonal effects of ramipril in chronic congestive heart failure and comparison with captopril. **Am J Cardiol.**, 1987 Apr; 24;59 (10):164D-170D.

de Graeff, P.A.; Kingma, J.H.; Viersma, J.W.; Wesseling, H.; Lie, K.I. Acute and chronic effects of ramipril and captopril in congestive heart failure. **Int J Cardiol.** 1989 Apr; 23 (1):59-67.

DOLLERY, C. in Churchill Livingstone (Editor), **Therapeutic Drugs**, United Kingdom, 1999; Vol.2, pp. R03-R07.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION **In vivo bioequivalence guidances.** **Pharmacopeial**, 1993; 19:6501-6508.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION **Bioavailability and bioequivalence requeriments; abbreviated applications; proposed revisions-FDA. Proposed rule.** **Fed. Regist.**, 1998; 63: 64 222–64 228.

FRAMPTON, J.E.; PETERS, D.H. Ramipril: an update review of its therapeutic use in essential hypertension and heart failure. **Drugs** 1995; Mar; 49 (3): 440-66.

GIBALDI, M. **Biopharmaceuticals and Clinical Pharmacokinetics**. 4a Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. 1991, 406p.

GREGORY, T.; WARNER, PERRY C.M. Ramipril: A Review of its Use in the Prevention of Cardiovascular Outcomes. **Drugs**. 2002; 62 (9): 1381-1405.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E.; **Tratado de Fisiologia Médica**. 9 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.194-195, p.209.

HEBER, M.E.; BRIGDEN, G.S.; CARUANA, M.P.; LAHIRI, A.; RAFTERY, E.B. First dose response and 24-hour antihypertensive efficacy of the new once-daily angiotensin converting enzyme inhibitor, ramipril. **Am J Cardiol**. 1988 Aug 1;62(4):239-45.

HOGAN, B.L.; WILLIAMS, M.; IDICULLA, A.; VEYSOGLU, T.; PARENTE, E. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of the related substances of ramipril in Altace capsules. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 2000; 23:637-651.

HORVITZ, R.A. More on bioavailability and generics. **Drug Ther.**, 1975; New York, v.5, n.9, p. 125-130.

JACKSON, A.J. Generics and bioequivalence. Rockville: CRC, 1994. 203p.

KARLBERG, B.E.; LINDSTROM, T.; ROSENQVIST, U.; OHMAN, K.P. Efficacy, tolerance and hormonal effects of a new oral angiotensin converting enzyme inhibitor, ramipril (HOE 498), in mild to moderate primary hypertension. **Am J Cardiol**. 1987 Apr 24; 59(10):104D-109D.

LEE, I.D.; HUNT, T.L.; BRADLEY, C.R.; COPP, C.; GRIFFITHS, L.; BROBST-KROMER. Effects on the pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly of coadministering ramipril with water, apple juice, and applesauce. **J. Pharm Res**. 1996; 13:639-42.

MAURER, H.H.; KRAEMER, T.; ARLT, J.W. Screening for the detection of angiotensin-converting enzyme inhibitors, their metabolites, and AT II receptor antagonists. **Ther Drug Monit**. 199820:706-13.

METZLER, C.M. Bioavailability--a problem in equivalence. **Biometrics**. 1974 Jun;30(2):309-17.

MONARCH PHARMACEUTICALS. Altace<sup>®</sup> Capsules (ramipril) [online]. Available from URL: [www.monarchpharm.com](http://www.monarchpharm.com) [Accessed 2001 Nov 28].

NUSSBERGER, J.; BRUNNER, D.B.; WAEBER, B.; BRUNNER, H.R. **Hypertension** 7 1985; I-1.

NUSSBERGER, J.; BRUNNER, D.B.; WAEBER, B.; BRUNNER, H.R. True versus immunoreactive angiotensin II in human plasma. **Hypertension** 1995; 7:I-1-7.

PHYSICIANS' DESK REFERENCE, 54 Edition 2000. Medical Economics Company, New Jersey. USA. p.1928-1929

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 331-332

SHAH, V.P. et al. Bioanalytical method validation - A revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, 2000; v. 17, p. 1551-1557.

SMITH, M.C. The pharmacist and generic drugs – a study of ampicillin. **J. Am. Pharm. Assoc. Sci.**, 1972. Ed., New York, v. NS 12, n. 10, p.511-515.

SOARES, AKAS. Biodisponibilidade comparativa de três formulações de captopril **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Ceará - CE, p. 107, 2002.

STORPIRTIS, S. Fundamentos científicos e conceitos utilizados em farmacocinética, biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. São Paulo: s.c.p., 1994. 7p. [Simpósio: **Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos**, 1994].

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERE, 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.

TODD, P.A.; BENFIELD, P. Ramipril: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in cardiovascular disorders. **Drugs** 1990; 39 (1): 110-35

UNGER, T.; MORRSI, M.; GANTEN, D.; HERMANN, K.; LANG, R.E. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 8 1986; 276.

VAN GRIENSVEN, J.M.T. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and bioavailability of the ACE inhibitor ramipril. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 1995; 47 (6): 513-8.

VILLAMIL, A. S.; CAIRNS, V.; WITTE, P. U.; BERTOLASI, C. A. A double-blind study to compare the efficacy, tolerance and safety of two doses of the angiotensin converting enzyme inhibitor ramipril with placebo. **Am J Cardiol.** 1987 Apr 24; 59(10):110D-114D.

WALTER, U.; FORTHOFFER, R.; WITTE, P.U. Dose-response relation of the angiotensin converting enzyme inhibitor ramipril in mild to moderate essential hypertension. **Am J Cardiol.** 1987 Apr 24; 59(10):125D-132D.

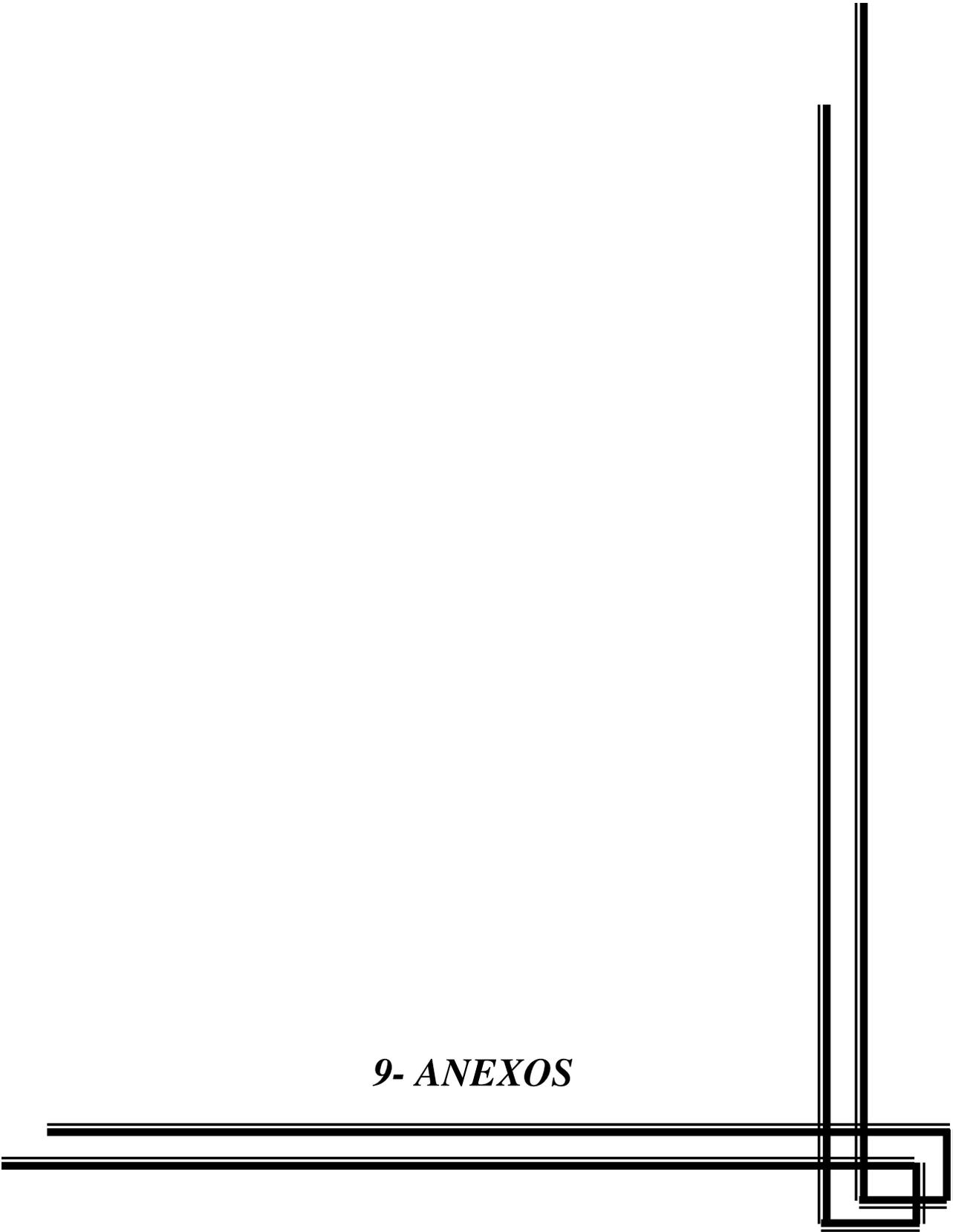
VERNENGO, M. Elementos técnicos de una política de medicamentos genéricos. Geneve: Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud. 1993. 47p.

YUSUF, S. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. **The New England Journal of Medicine**, 2000, v. 342, n. 3, p. 145-153.

ZHU, Z.; VACHAREAU, A.; NEIRINCK, L. **Journal of Chromatography B** 2002; 779 297-306.



***9- ANEXOS***





### Lista de Randomização Ramipril

Voluntários	Seqüência de Administração	
	1º Período	2º Período
1	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
2	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
3	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
4	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
5	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
6	<b>TRIA TEC®**</b>	Ramipril **
7	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
8	<b>TRIA TEC®**</b>	Ramipril **
9	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
10	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
11	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
12	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
13	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
14	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
15	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
16	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
17	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
18	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
19	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
20	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
21	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
22	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
23	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril
24	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
25	Ramipril	<b>TRIA TEC®</b>
26	<b>TRIA TEC®</b>	Ramipril



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Estudo de Biodisponibilidade Comparativa de uma Formulação de Ramipril comprimido de 5 mg da Biosintética Laboratórios Ltda. (formulação teste) versus uma Formulação de Ramipril comprimido de 5 mg do Produto de Referência da Aventis Pharma (Triatec®) em Voluntários Sadios de ambos os sexos**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Responsável: Prof. Dr. Gilberto De Nucci

O abaixo-assinado, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, RG nº \_\_\_\_\_ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do médico/pesquisador Prof. Dr. Gilberto De Nucci da Unidade de Farmacologia Clínica Miguel Servet - UNICAMP. O abaixo-assinado está ciente que:

### **1- Natureza e propósito do estudo**

O objetivo da pesquisa é verificar se um comprimido de Ramipril (5 mg) produzido pelo Laboratório Biosintética Ltda - *Formulação Teste* - atinge níveis no sangue equivalentes ao Triatec® da Aventis Pharma.- *Formulação Referência*. Você receberá as duas medicações, cada uma em uma ocasião diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá a um sorteio.

## **2- Procedimentos a serem realizados e responsabilidades**

Antes de sua participação no estudo e após a sua participação você será convidado a ir à Unidade Clínica da Cartesius para avaliar a sua condição de saúde. Você será examinado por um médico que lhe fará um exame completo, medindo o seu pulso, sua temperatura, sua pressão arterial. Também será feito um exame do coração (eletrocardiograma). O médico lhe perguntará se você teve ou tem alguma doença e se você faz uso de algum medicamento. Durante a visita serão coletadas amostras de sangue, urina e fezes para exames laboratoriais. Os exames laboratoriais incluem exame de sangue completo como hemograma completo; bioquímica sangüínea (glicose no sangue, proteínas totais, albumina, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, uréia, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos); exame sumário de urina (Urina I) e teste de gravidez ( $\beta$ -HCG) para mulheres. Exames para a hepatite B e C e para AIDS (HIV 1 e HIV2), no sangue, e exame de fezes (protoparasitológico), serão feitos somente no pré estudo.

Durante o estudo, você será internado duas vezes por aproximadamente 48 horas cada período, na Unidade de Farmacologia Clínica Miguel Servet, com intervalo mínimo de 14 dias. Em cada internamento, a) será colhida uma amostra de sangue para dosagem de creatinina, hemoglobina, hematócrito, transaminases e, para os voluntários do sexo feminino,  $\beta$ -HCG; b) será administrado um comprimido de Ramipril, acompanhado de 200 mL de água sem gás; c) serão coletadas 24 amostras de sangue de 4 mL cada, através de agulha introduzida em veia superficial para a dosagem do medicamento e mais uma amostra de 30 mL antes da administração da medicação (somente na primeira internação) para o controle do método. d) em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura; e) serão também servidas refeições padronizadas (jantar, ceia, na noite da internação [se não interferir com o jejum]; café da manhã, almoço, lanche da tarde, jantar e ceia no dia de administração do medicamento; café da manhã no dia de alta) ou bebidas em horários preestabelecidos. Um total de 222 mL de sangue será colhido durante todo o estudo.

A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em 60 dias, a contar da primeira internação, após o processo de seleção.

### **3- Responsabilidades**

É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que esteja em boa saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações e que tampouco tenha participado de outro estudo clínico com medicamentos nos últimos 3 meses. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo: a) não pode ser dependente de drogas ou álcool e caso o investigador tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas; b) não pode ter doado (ou retirado/perdido por qualquer motivo) sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo ou ter doado 1500 mL (um litro e meio) no período de um ano antecedendo o estudo; c) não pode tomar bebidas contendo cafeína e xantinas (café, chá, coca-cola, etc) nas 12 horas que antecedem as internações até a última coleta.

É ainda de sua responsabilidade em relação a sua participação no ensaio clínico: a) comparecer às internações na data e horários informados; b) permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos 7 horas) em cada internação; c) tomar toda a medicação prevista; d) Ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; e) retornar à Unidade Clínica na data, horário e local combinados, para realização da consulta e exames de alta, independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

### **4- Possíveis riscos e desconfortos**

A administração por boca de Ramipril de maneira continuada pode causar reações como: sono, fraqueza, aumento de peso, irritação do estômago, distúrbios gastrointestinais (dor de barriga), depressão, tremor. Entretanto o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração de dose única de Ramipril tem menor probabilidade de aparecer. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

A retirada de sangue é um procedimento seguro e pode causar um leve desconforto, além de uma mancha roxa pequena no local da picada que freqüentemente resolve sem maiores problemas.

## **5- Benefícios ou compensações**

A participação neste estudo, não tem objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Conseqüentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função do tratamento.

## **6- Intercorrências (efeitos indesejáveis)**

Se você sofrer algum malefício em decorrência direta de sua participação no estudo, você receberá tratamento nesta Instituição, sem qualquer custo. Não haverá, no entanto qualquer compensação de ordem financeira em função do ocorrido, a não ser que a condição faça jus da indenização prevista no Seguro de Vida em Grupo mencionado abaixo. Contudo, ao assinar este termo, você não está renunciando qualquer direito legal que você possui.

Durante o período de 180 dias a partir da data da assinatura deste termo, o voluntário estará assegurado (Seguro de Vida em Grupo) pela empresa Executivos Seguros (Sul América Aetna).

## **7- Ressarcimento**

De acordo com valores previamente estabelecidos (R\$ 400.00), os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo despendidos na realização do supracitado estudo clínico após a consulta de alta. Caso desista, ou seja, dispensado antes do estudo ser finalizado o voluntário receberá proporcionalmente ao tempo despendido, no final do estudo. Entende também que a desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

Estima-se que durante o período de sua participação no Estudo vocês terão como despesa apenas os gastos de deslocamento da residência ou trabalho até o Hospital para internação ou à Unidade Clínica para a realização dos exames e consultas, bem como coletas de amostras após a alta. Ainda deve ser previsto eventuais visitas posteriores para acompanhamento dos eventos adversos. O ressarcimento destas despesas já está incluído no valor estabelecido no item acima.

## **8- Participação voluntária**

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador ou a um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento médico deste Hospital.

Obteve todas as informações e esclarecimentos necessários para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.

Independente de seu desejo e consentimento, sua participação no ensaio clínico poderá ser interrompida, em função a) da ocorrência de eventos adversos; b) da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo; c) do não cumprimento das normas estabelecidas; d) de qualquer outro motivo que, a critério médico, seja do interesse de seu próprio bem estar ou dos demais participantes; e) da suspensão do Estudo como um todo.

A Unidade Analítica Cartesius o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade Analítica Cartesius.

## **9- Divulgação de informações quanto a participação no estudo**

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. A Unidade Analítica Cartesius não identificará o voluntário por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética e Pesquisa Clínica, ou autoridades do(s) órgão(s) governamentais envolvido(s) na fiscalização e acompanhamento do estudo terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem no entanto violar a condição de que tais informações são confidenciais. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está também autorizando tal acesso, mesmo se você se retirar do Estudo.

## **10- Contatos e perguntas**

Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar a Unidade Analítica Cartesius (Fone 3091-7493) e solicitar que a mesma contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico ou então entrar em contato diretamente com os mesmos nos telefones indicados no final deste *Termo de Consentimento*.

Poderá contactar o Dr. Gilberto De Nucci para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário.

Poderá contactar a Secretaria do *Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP* pelo telefone 3788-8936 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

Se você concorda com o exposto acima leia e assine o documento abaixo.

Eu declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após, tive nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo o também sobre o Estudo e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmo estar livre e espontaneamente decidindo participar do Estudo.

Ao assinar este Termo de Consentimento eu também estou certificando que toda a informação que eu prestei, incluindo minha história médica, é verdadeira e correta até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento.

Ao assinar este Termo de Consentimento estou autorizando o acesso às minhas informações, conforme explicitado anteriormente.

Ao assinar este Termo de Consentimento eu não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

São Paulo, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

NOME DO VOLUNTÁRIO	DATA	Assinatura
--------------------	------	------------

---

PESSOA QUE ESTÁ OBTENDO O TERMO DE CONSENTIMENTO	DATA	Assinatura
-----------------------------------------------------	------	------------

---

TESTEMUNHA (Somente necessário se o voluntário não souber ler)	DATA	Assinatura
-------------------------------------------------------------------	------	------------

---

CONTROLE INTERNO    N° do Estudo: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_    N° do Voluntário: \_\_\_\_\_

**Telefones para contato**

**UNIDADE ANALÍTICA CARTESIUS (11) 3091-7493**

Dr. GILBERTO DE NUCCI (19) 3251-6928; (19) 9792-4032; (11) 3091-7493.

Dra. MIRIAM PRADO GALUPPO (19) 3251-2983; (11) 3091-7493; (11) 5908-6000.

Dr. CELSO H. DE OLIVEIRA (19) 9112 8820; (11) 3091-7493; (11) 5908-6000.

## Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



CEP, 28/06/05  
(PARECER PROJETO 341/2003)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP  
☎ (0\_19) 3788-8936  
FAX (0\_19) 3788-8925  
🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)  
✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

### PARECER

#### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: “ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE UMA FORMULAÇÃO DE RAMIPRIL COMPRIMIDO DE 5 MG TESTE DO LABORATÓRIO BIOSINTÉTICA LTDA (FORMULAÇÃO TESTE) VERSUS UMA FORMULAÇÃO DE RAMIPRIL COMPRIMIDO DE 5 MG DO PRODUTO DE REFERÊNCIA DA AVENTIS PHARMA (TRIA TEC®) EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS”**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Gilberto de Nucci.

#### II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou o Relatório Final, apresentado em maio de 2005, do protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

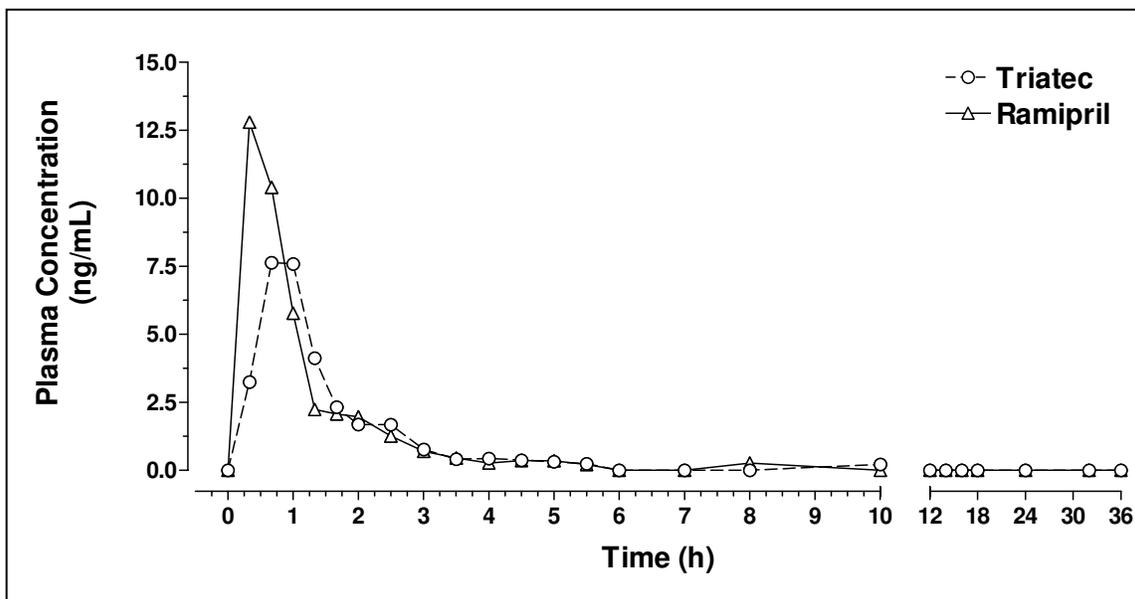
Recomendação: quando da publicação enviar cópia ao CEP/FCM.

  
**Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP



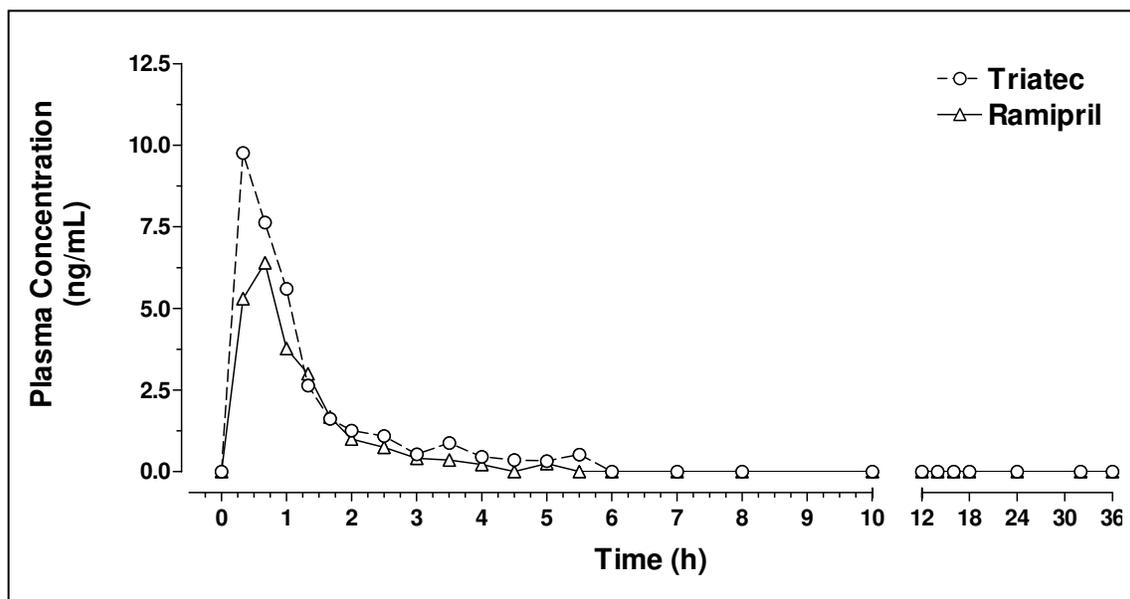
**Gráficos das Curvas de concentração versus tempo e parâmetros farmacocinéticos  
individuais para o Ramipril**

**Voluntário 2**



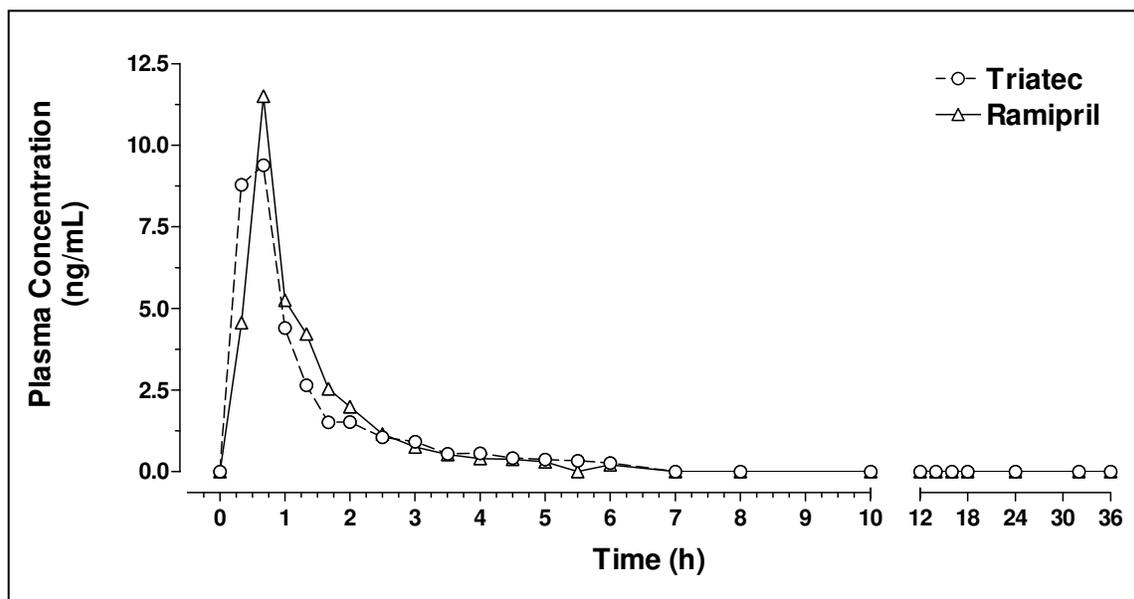
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	8.02	8.02
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	10.99	13.67
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	11.83	14.26
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	7.13	4.14
$T_{last}$ (h)	10.00	8.02
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	11.20	13.67
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	5.32	4.14
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	11.55	14.16
$C_{max}$ (ng/mL)	7.63	12.80
$T_{max}$ (h)	0.67	0.33
$T_{1/2}$ (h)	2.04	1.53
$K_e$ (1/h)	0.34	0.45

### Voluntário 3



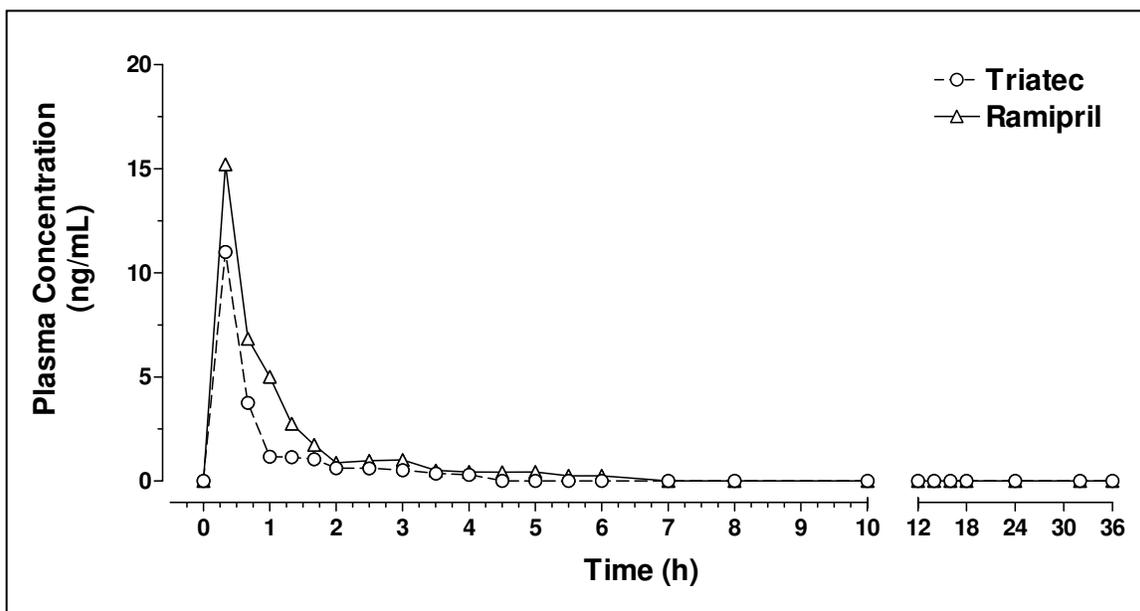
	Ramipril	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	5.00	5.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	11.22	7.98
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	12.26	8.29
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	8.51	3.73
T <sub>last</sub> (h)	5.50	5.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	11.43	7.98
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	6.81	3.73
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	11.71	8.13
C <sub>max</sub> (ng/mL)	9.76	6.40
T <sub>max</sub> (h)	0.33	0.67
T <sub>1/2</sub> (h)	1.10	0.85
K <sub>e</sub> (1/h)	0.63	0.81

### Voluntário 4



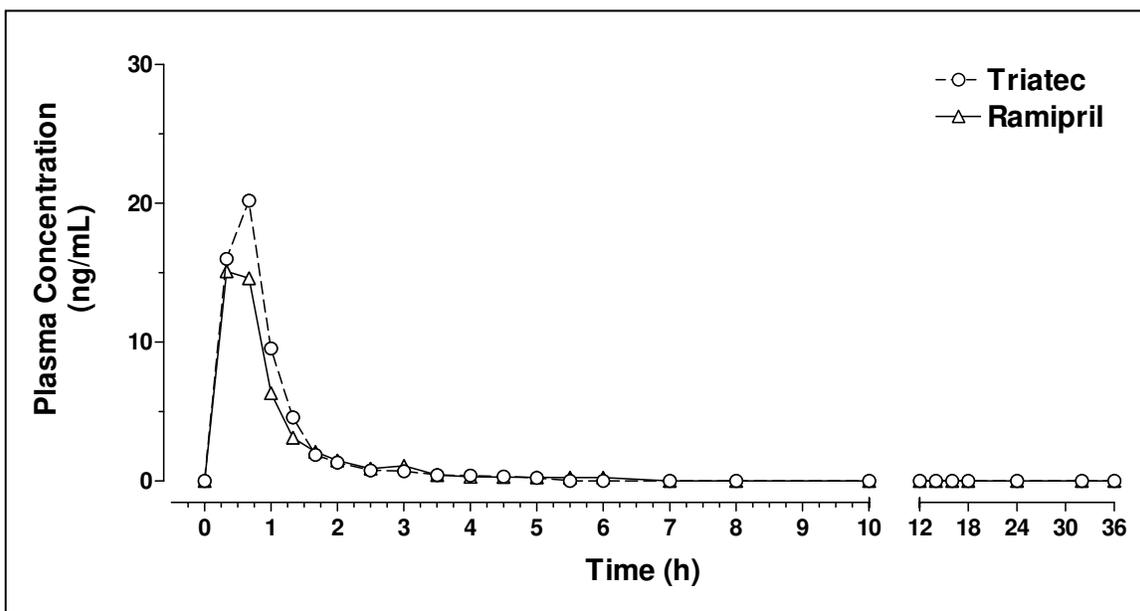
	Ramipril	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	6.00	6.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	11.57	11.82
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	12.19	12.42
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	5.11	4.87
$T_{last}$ (h)	6.00	6.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	11.57	11.82
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	5.11	4.87
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	11.86	12.13
$C_{max}$ (ng/mL)	9.39	11.50
$T_{max}$ (h)	0.67	0.67
$T_{1/2}$ (h)	1.65	1.97
$K_e$ (1/h)	0.42	0.35

## Voluntário 5



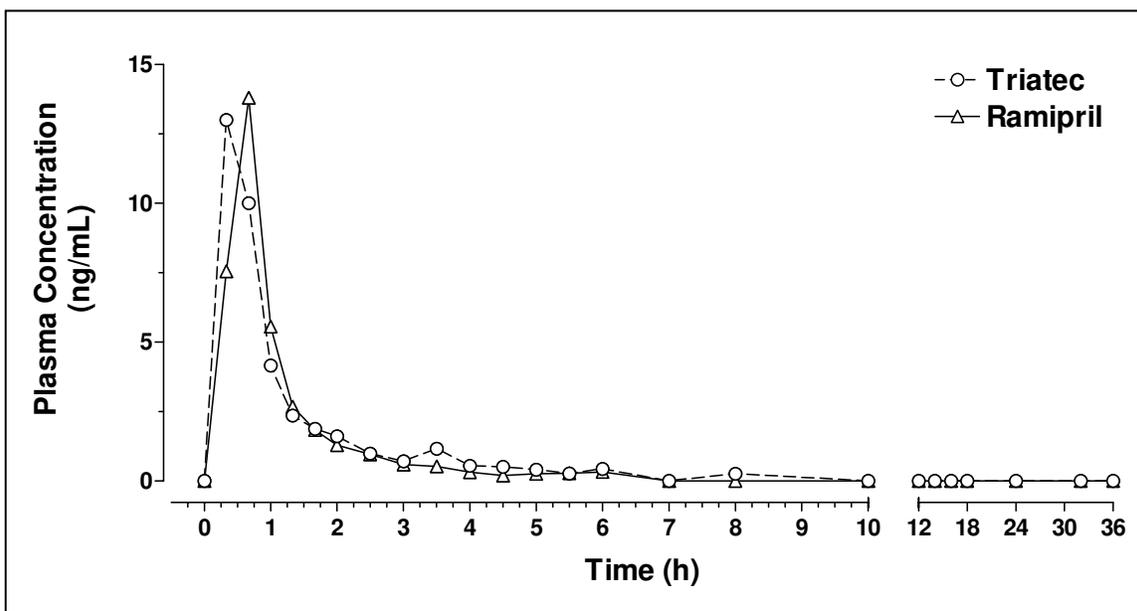
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	4.00	4.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	6.83	11.96
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	7.43	13.29
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	8.13	9.97
T <sub>last</sub> (h)	4.00	6.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	6.83	12.68
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	8.13	4.57
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	7.21	13.10
C <sub>max</sub> (ng/mL)	11.00	15.20
T <sub>max</sub> (h)	0.33	0.33
T <sub>1/2</sub> (h)	1.40	1.70
K <sub>e</sub> (1/h)	0.49	0.41

## Voluntário 6



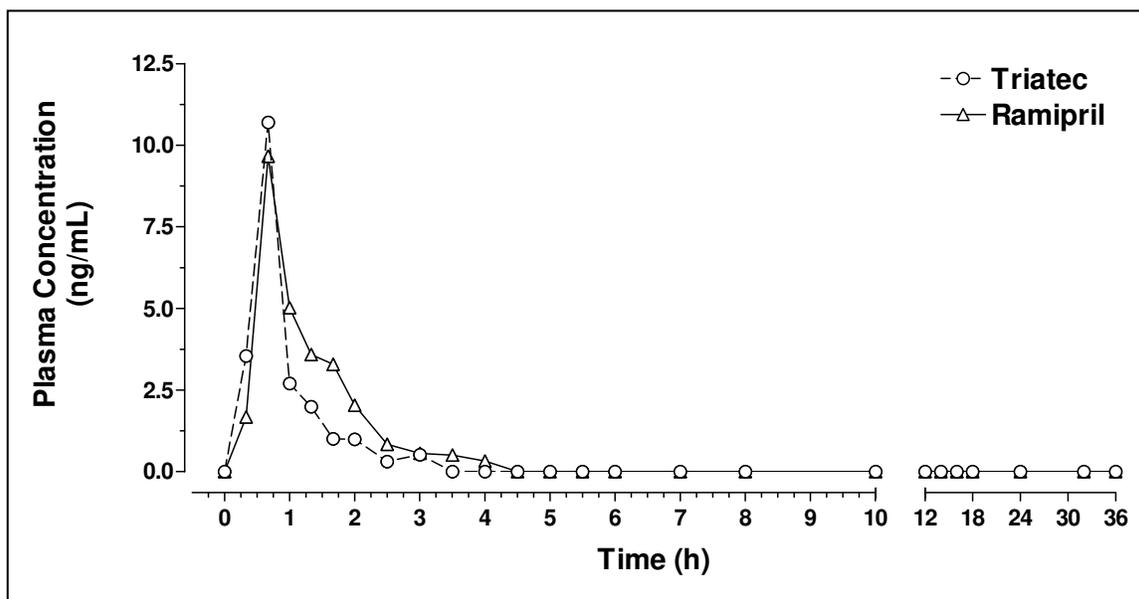
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	5.00	5.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	18.95	15.67
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	19.43	17.72
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	2.45	11.55
$T_{last}$ (h)	5.00	6.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	18.95	15.92
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	2.45	10.15
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	19.42	16.35
$C_{max}$ (ng/mL)	20.20	15.10
$T_{max}$ (h)	0.67	0.33
$T_{1/2}$ (h)	1.39	5.15
$K_e$ (1/h)	0.50	0.13

## Voluntário 7



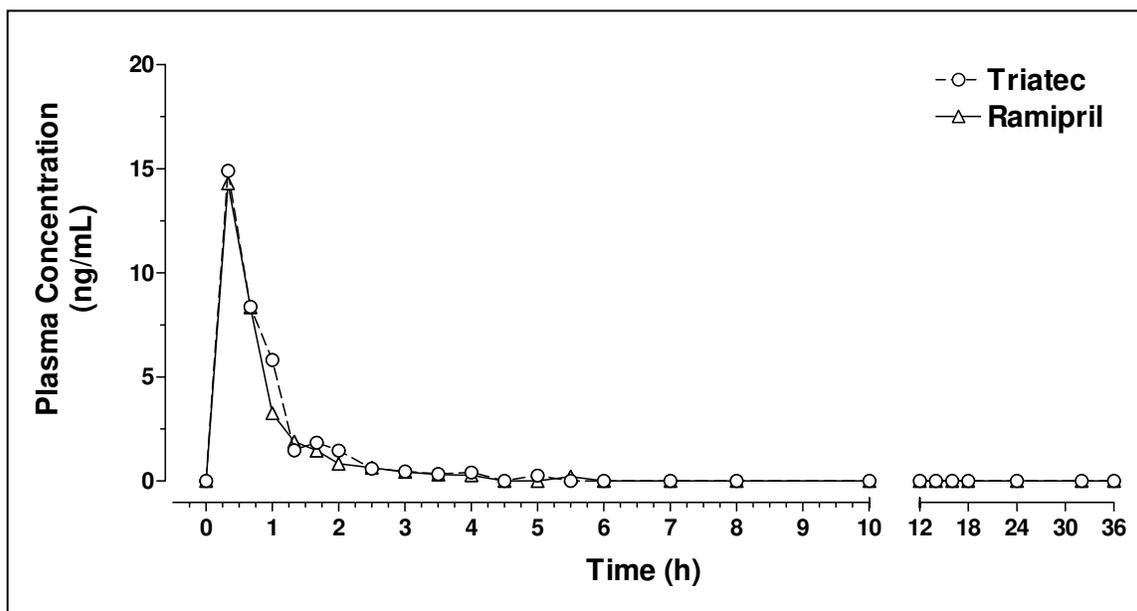
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	6.00	6.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	13.33	12.44
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	14.45	13.18
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	7.76	5.58
$T_{last}$ (h)	8.00	6.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	13.68	12.44
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	5.32	5.58
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	14.19	12.93
$C_{max}$ (ng/mL)	13.00	13.80
$T_{max}$ (h)	0.33	0.67
$T_{1/2}$ (h)	2.02	1.55
$K_e$ (1/h)	0.34	0.45

## Voluntário 8



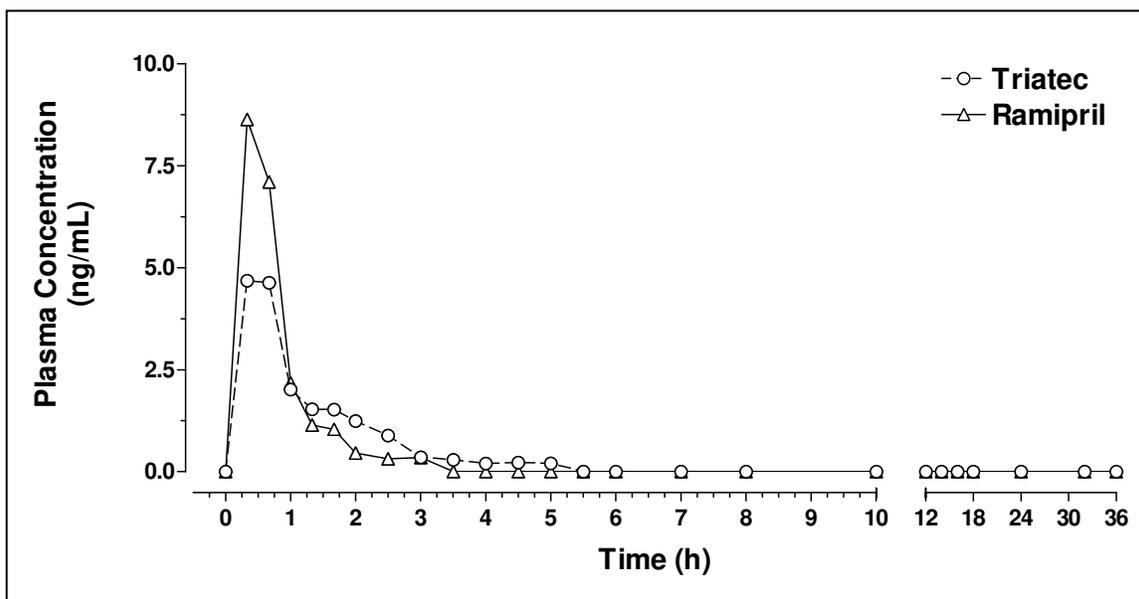
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	3.00	3.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ( $[ng \cdot h]/mL$ )	7.01	9.00
$AUC_{0-inf}$ ( $[ng \cdot h]/mL$ )	7.41	9.79
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	5.42	8.06
$T_{last}$ (h)	3.00	4.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ( $[ng \cdot h]/mL$ )	7.01	9.47
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	5.42	3.25
$AUC_{0-36}$ ( $[ng \cdot h]/mL$ )- linear	7.49	9.72
$C_{max}$ (ng/mL)	10.70	9.66
$T_{max}$ (h)	0.67	0.67
$T_{1/2}$ (h)	0.54	0.68
$K_e$ (1/h)	1.29	1.01

## Voluntário 9



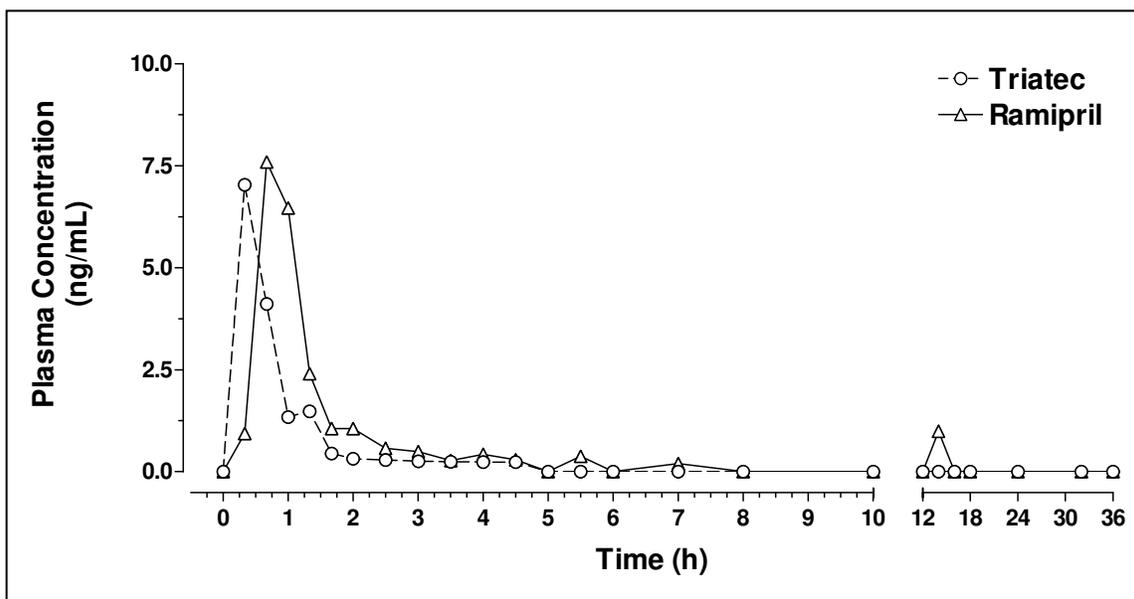
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	5.00	5.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	12.08	10.71
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	12.42	11.43
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	2.73	6.29
$T_{last}$ (h)	5.00	5.50
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	12.08	10.77
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	2.73	5.81
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- <i>linear</i>	12.48	11.08
$C_{max}$ (ng/mL)	14.90	14.30
$T_{max}$ (h)	0.33	0.33
$T_{1/2}$ (h)	0.89	2.09
$K_e$ (1/h)	0.78	0.33

## Voluntário 11



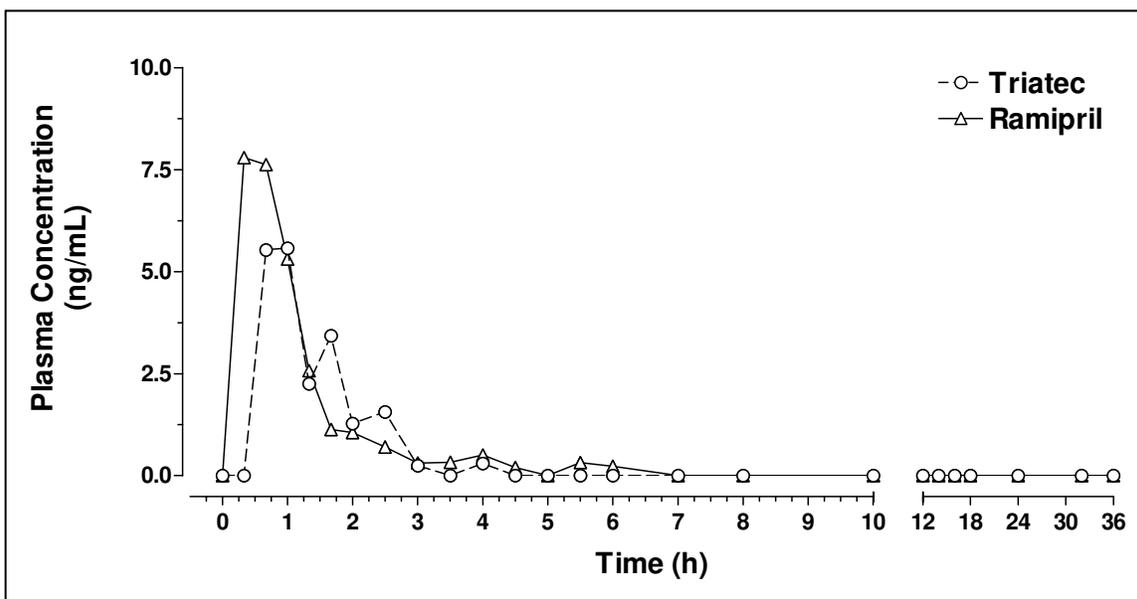
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	3.00	3.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	5.76	7.00
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	6.53	7.26
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	11.83	3.56
$T_{last}$ (h)	5.00	3.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	6.25	7.00
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	4.27	3.56
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	6.40	7.30
$C_{max}$ (ng/mL)	4.68	8.63
$T_{max}$ (h)	0.33	0.33
$T_{1/2}$ (h)	0.94	0.51
$K_e$ (1/h)	0.74	1.35

## Voluntário 12



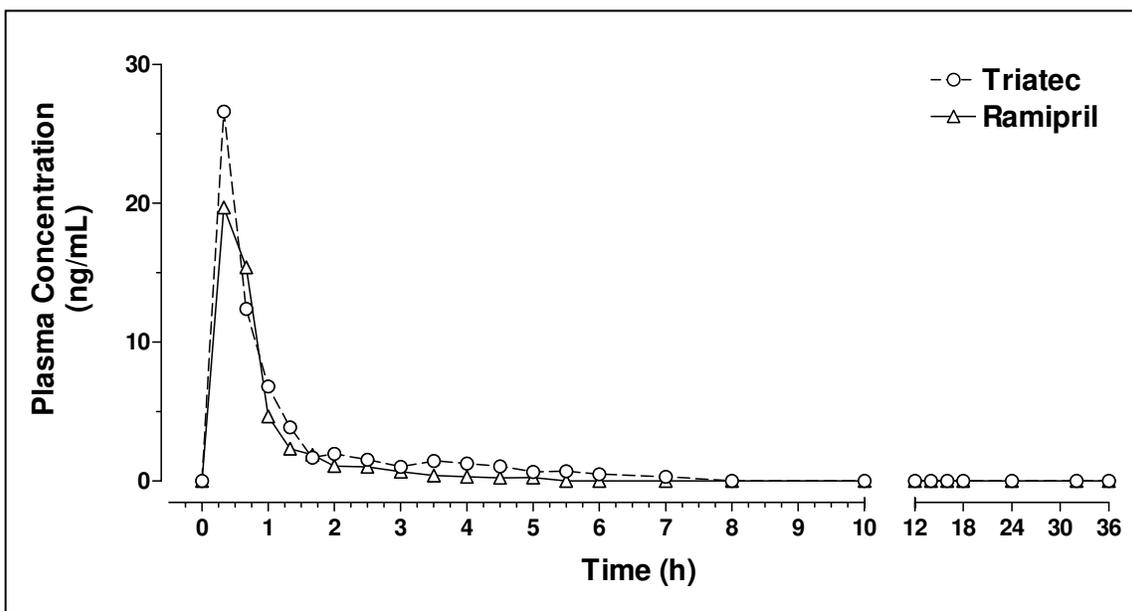
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	4.50	4.50
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	5.35	7.37
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	6.57	12.44
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	18.55	40.70
$T_{last}$ (h)	4.50	14.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	5.35	8.83
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	18.55	29.01
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	5.57	9.99
$C_{max}$ (ng/mL)	7.03	7.59
$T_{max}$ (h)	0.33	0.67
$T_{1/2}$ (h)	3.61	2.52
$K_e$ (1/h)	0.19	0.27

### Voluntário 13



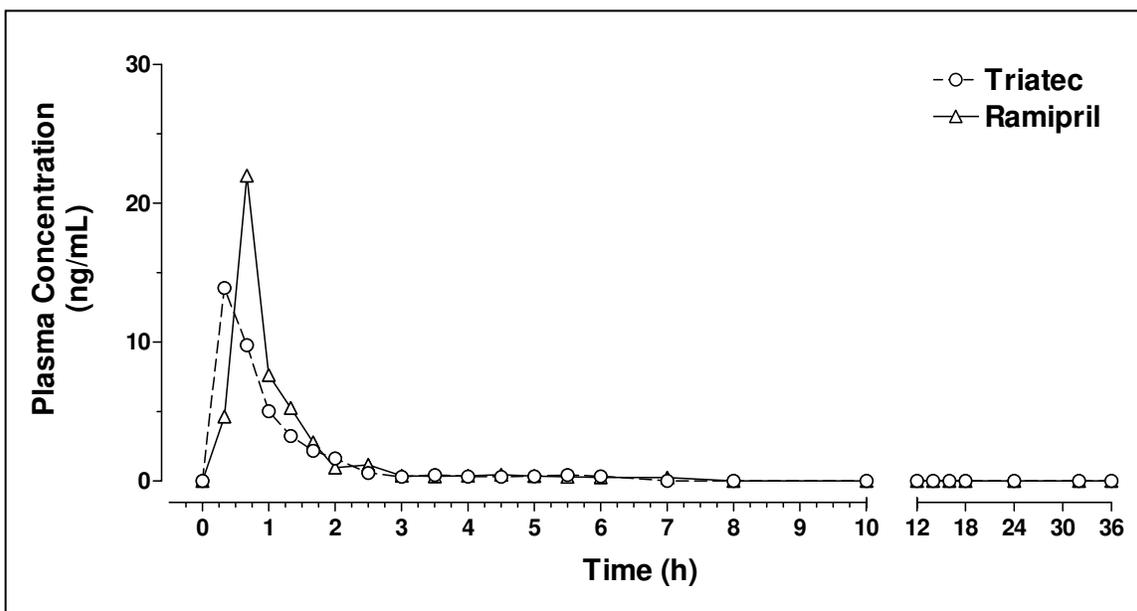
	Ramipril	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	4.00	4.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> (paired) ([ng* h]/mL)	6.85	9.25
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	7.13	10.06
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	4.01	8.05
T <sub>last</sub> (h)	4.00	6.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	6.85	9.69
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	4.01	3.76
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	7.17	9.96
C <sub>max</sub> (ng/mL)	5.57	7.79
T <sub>max</sub> (h)	1.00	0.33
T <sub>1/2</sub> (h)	0.67	1.14
K <sub>e</sub> (1/h)	1.03	0.61

### Voluntário 14



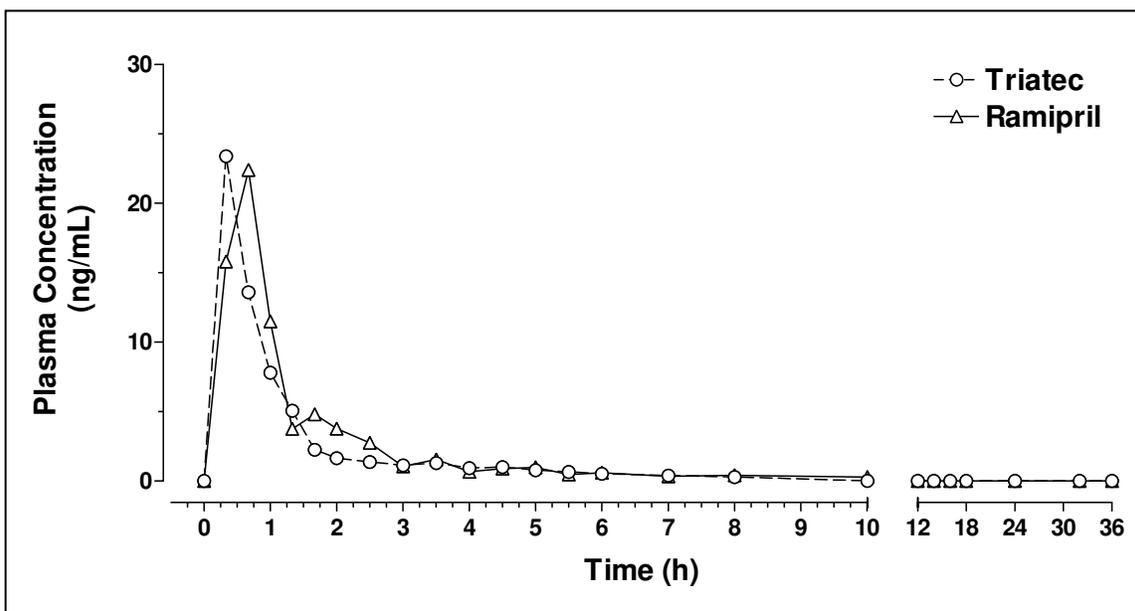
	Ramipril	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	5.00	5.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h)/mL)	20.78	15.86
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h)/mL)	22.37	16.25
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	7.10	2.42
T <sub>last</sub> (h)	7.00	5.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h)/mL)	21.81	15.86
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	2.51	2.42
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h)/mL)- linear	22.50	16.37
C <sub>max</sub> (ng/mL)	26.60	19.70
T <sub>max</sub> (h)	0.33	0.36
T <sub>1/2</sub> (h)	1.27	1.06
K <sub>e</sub> (1/h)	0.55	0.65

### Voluntário 15



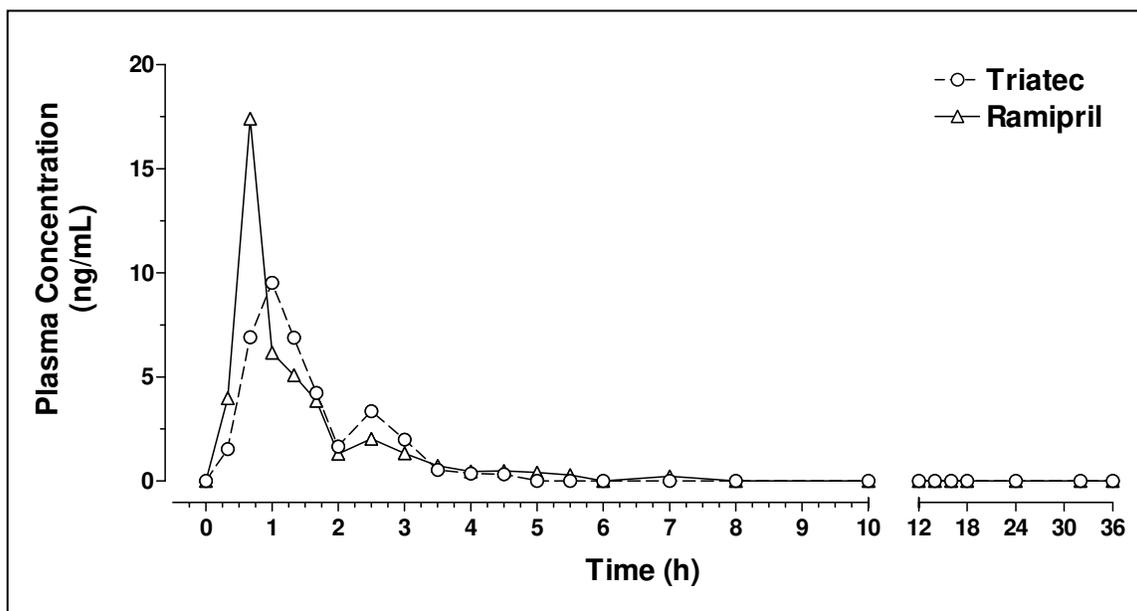
	Ramipril	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	6.00	6.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	13.30	15.72
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	13.82	17.78
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	3.77	11.62
T <sub>last</sub> (h)	6.00	7.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	13.30	15.97
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	3.77	10.18
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	13.69	16.67
C <sub>max</sub> (ng/mL)	13.90	22.00
T <sub>max</sub> (h)	0.33	0.67
T <sub>1/2</sub> (h)	1.06	5.18
K <sub>e</sub> (1/h)	0.66	0.13

### Voluntário 16



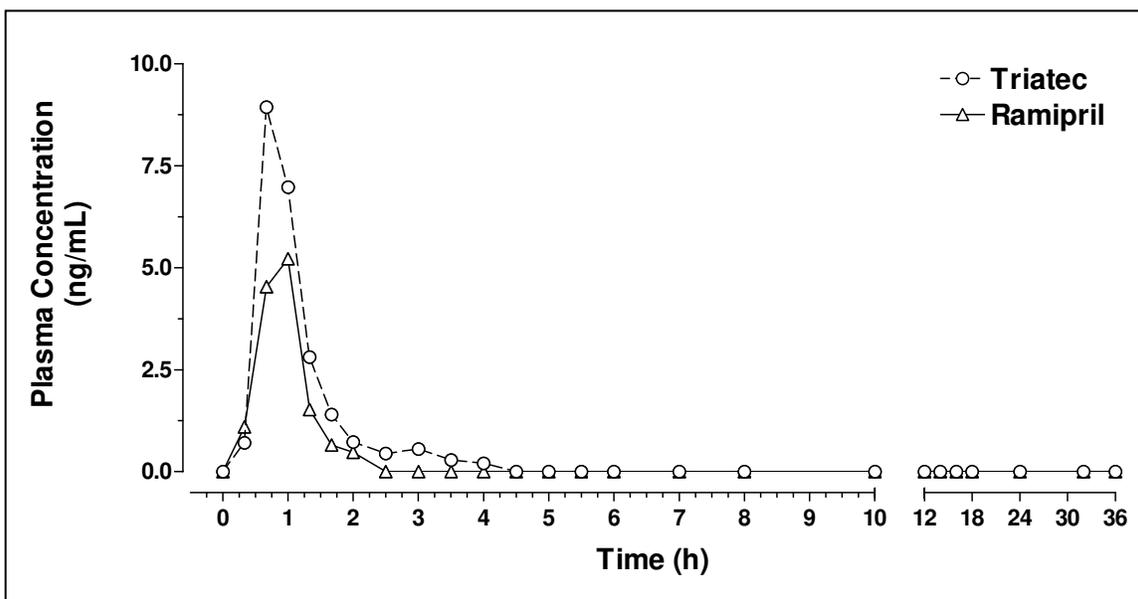
	Ramipril	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	8.00	8.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	22.25	25.62
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	23.07	27.13
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	3.55	5.57
T <sub>last</sub> (h)	8.00	10.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	22.25	26.31
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	3.55	3.03
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	22.89	27.20
C <sub>max</sub> (ng/mL)	23.40	22.40
T <sub>max</sub> (h)	0.33	0.67
T <sub>1/2</sub> (h)	2.05	2.04
K <sub>e</sub> (1/h)	0.34	0.34

### Voluntário 17



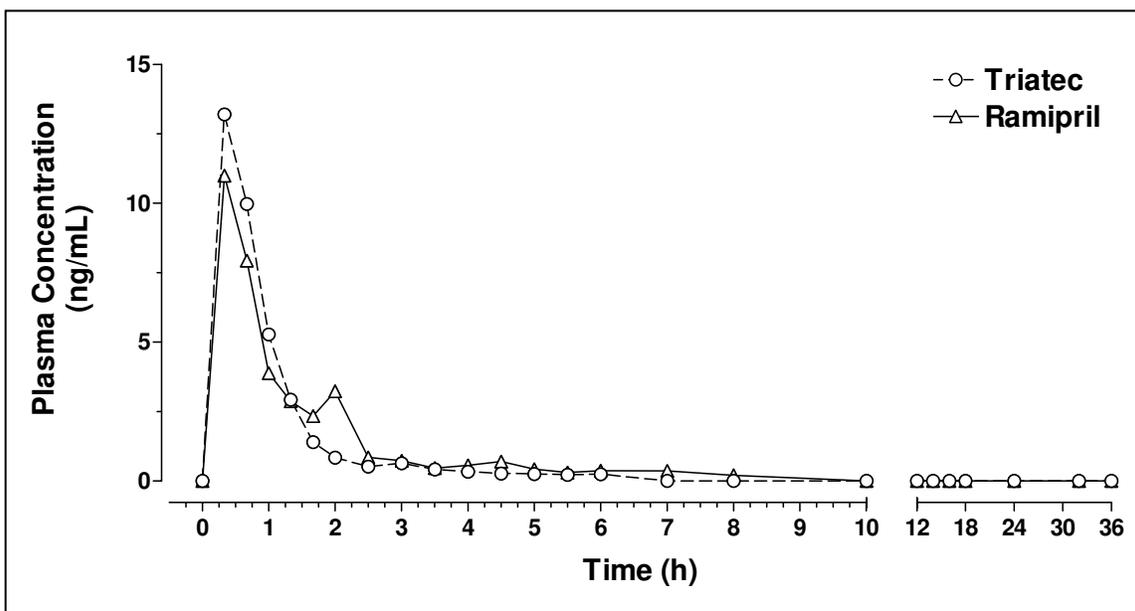
	Ramipril	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	4.50	4.50
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	13.30	14.68
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	13.63	16.09
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	2.45	8.75
T <sub>last</sub> (h)	4.50	7.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	13.30	15.26
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	2.45	5.15
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	13.66	15.83
C <sub>max</sub> (ng/mL)	9.52	17.40
T <sub>max</sub> (h)	1.00	0.67
T <sub>1/2</sub> (h)	0.71	2.54
K <sub>e</sub> (1/h)	0.98	0.27

### Voluntário 18



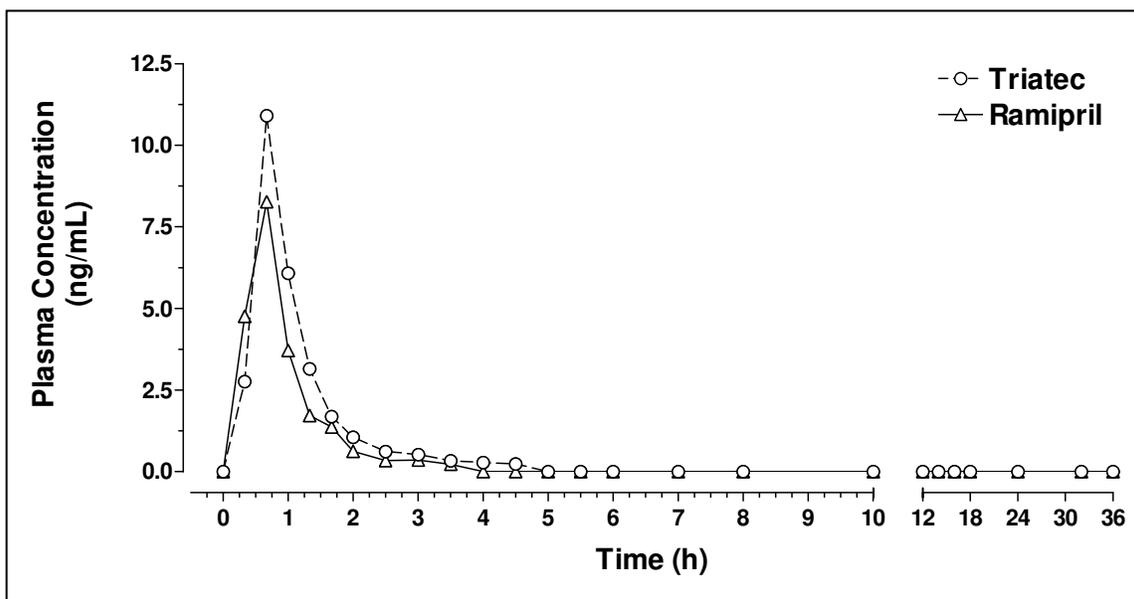
	Ramipril	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	2.00	2.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	6.90	4.27
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	7.99	4.47
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	13.61	4.43
T <sub>last</sub> (h)	4.05	2.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	7.77	4.27
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	2.73	4.43
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	7.99	4.53
C <sub>max</sub> (ng/mL)	8.93	5.22
T <sub>max</sub> (h)	0.67	1.00
T <sub>1/2</sub> (h)	0.74	0.29
K <sub>e</sub> (1/h)	0.94	2.40

### Voluntário 19



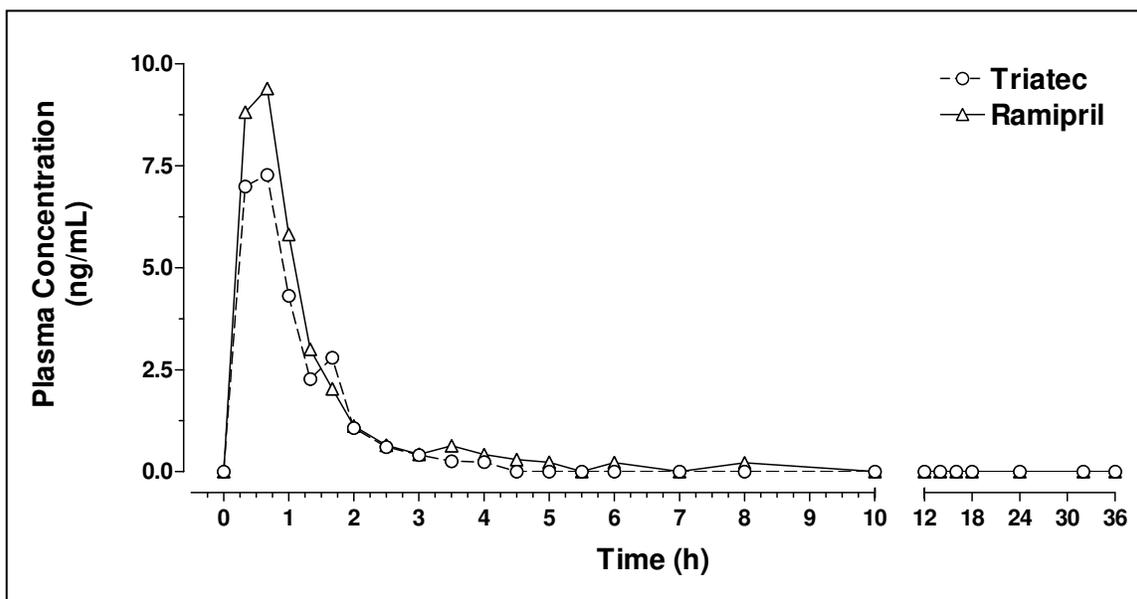
	Ramipril	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	6.00	6.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h)/mL)	12.50	12.55
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h)/mL)	13.24	13.62
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	5.58	7.82
T <sub>last</sub> (h)	6.00	8.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h)/mL)	12.50	13.19
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	5.58	3.09
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h)/mL)- linear	12.82	13.68
C <sub>max</sub> (ng/mL)	13.20	11.00
T <sub>max</sub> (h)	0.33	0.33
T <sub>1/2</sub> (h)	2.13	1.44
K <sub>e</sub> (1/h)	0.32	0.48

## Voluntário 20



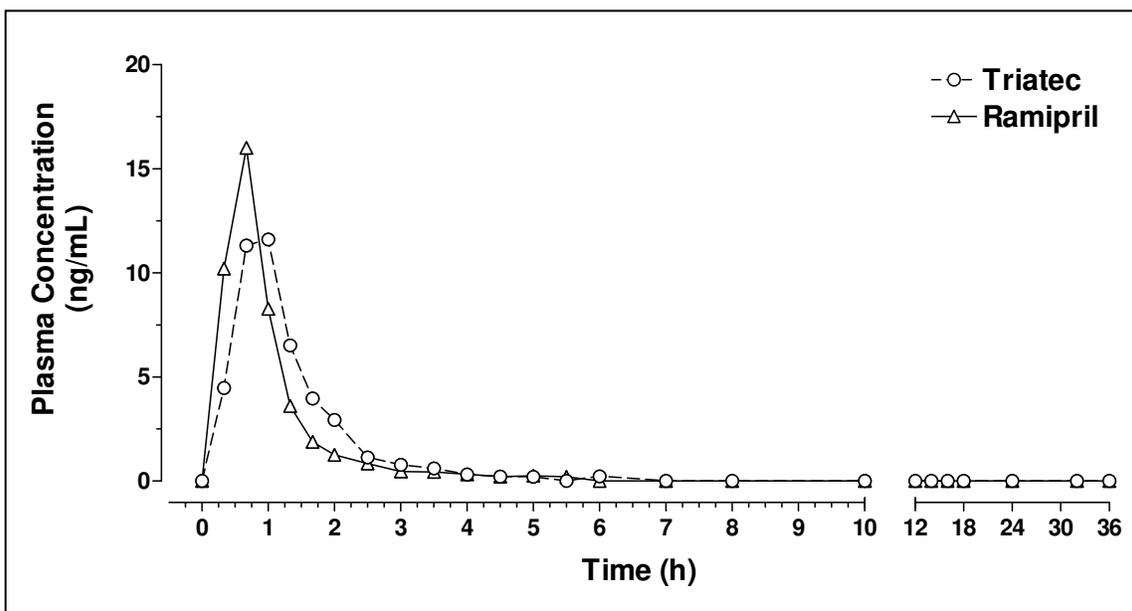
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	3.50	3.50
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	9.12	7.12
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	10.10	7.32
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	9.76	2.70
$T_{last}$ (h)	4.50	3.50
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	9.40	7.12
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	6.93	2.70
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	9.64	7.34
$C_{max}$ (ng/mL)	10.90	8.27
$T_{max}$ (h)	0.67	0.67
$T_{1/2}$ (h)	2.05	0.60
$K_e$ (1/h)	0.34	1.15

## Voluntário 21



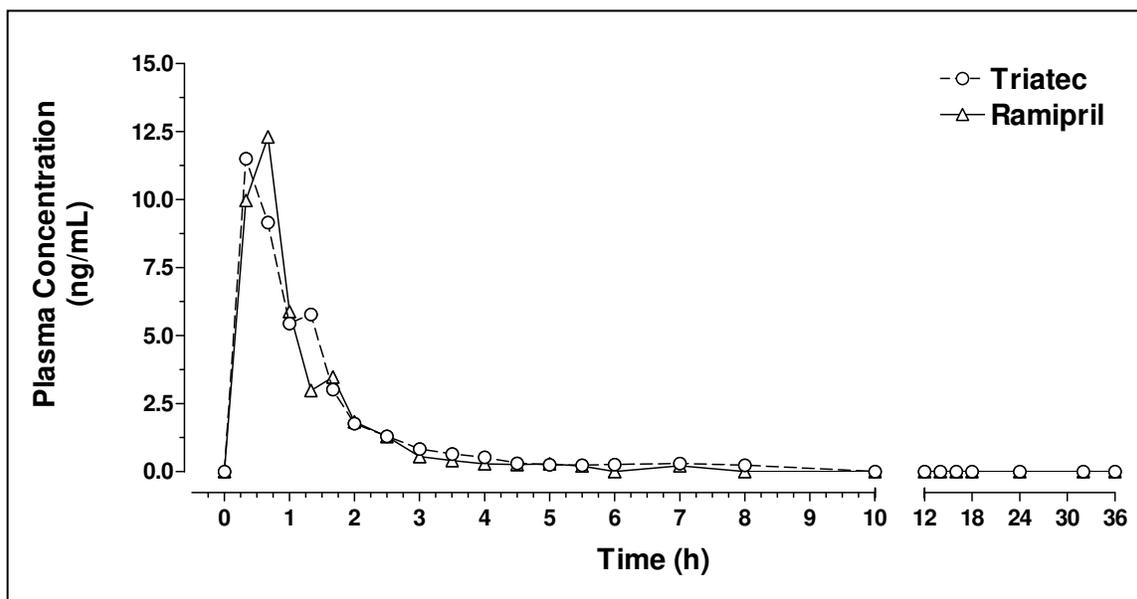
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	4.00	4.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	8.90	10.98
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	9.12	31.21
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	2.48	64.81
$T_{last}$ (h)	4.00	8.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	8.90	11.63
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	2.48	62.73
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	9.10	12.00
$C_{max}$ (ng/mL)	7.27	9.39
$T_{max}$ (h)	0.67	0.67
$T_{1/2}$ (h)	0.66	61.69
$K_e$ (1/h)	1.05	0.01

## Voluntário 22



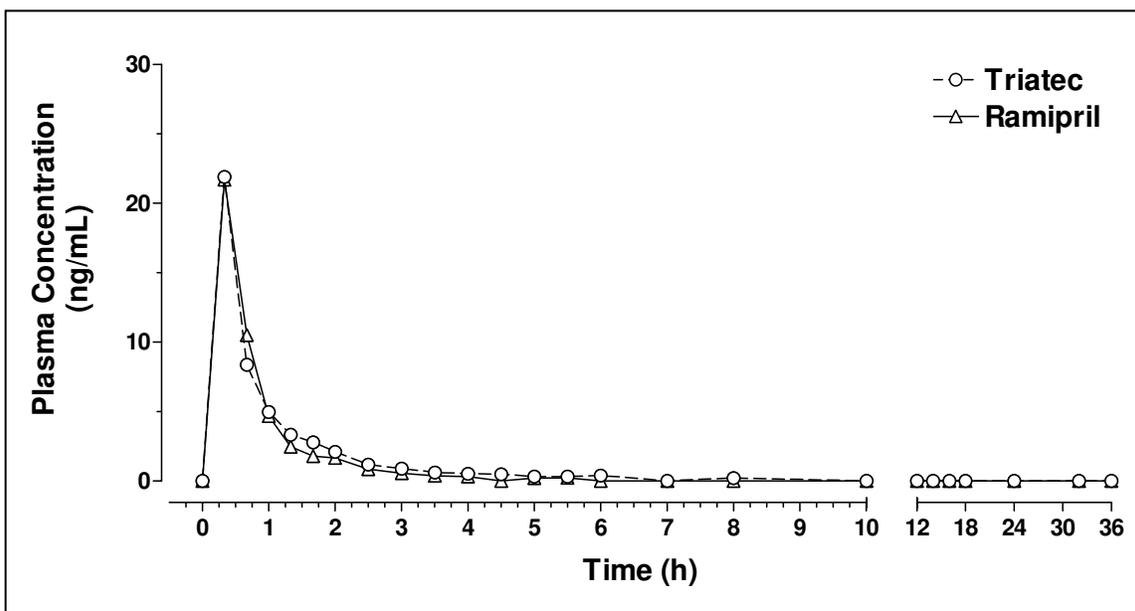
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	5.50	5.50
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ( $[ng \cdot h]/mL$ )	15.26	14.87
$AUC_{0-inf}$ ( $[ng \cdot h]/mL$ )	15.57	15.22
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	2.01	2.32
$T_{last}$ (h)	6.00	5.50
$AUC_{0-T_{last}}$ ( $[ng \cdot h]/mL$ )	15.32	14.87
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	1.66	2.32
$AUC_{0-36}([ng \cdot h]/mL)$ - linear	15.64	15.22
$C_{max}$ (ng/mL)	11.60	16.00
$T_{max}$ (h)	1.00	0.67
$T_{1/2}$ (h)	0.81	1.21
$K_e$ (1/h)	0.86	0.57

### Voluntário 23



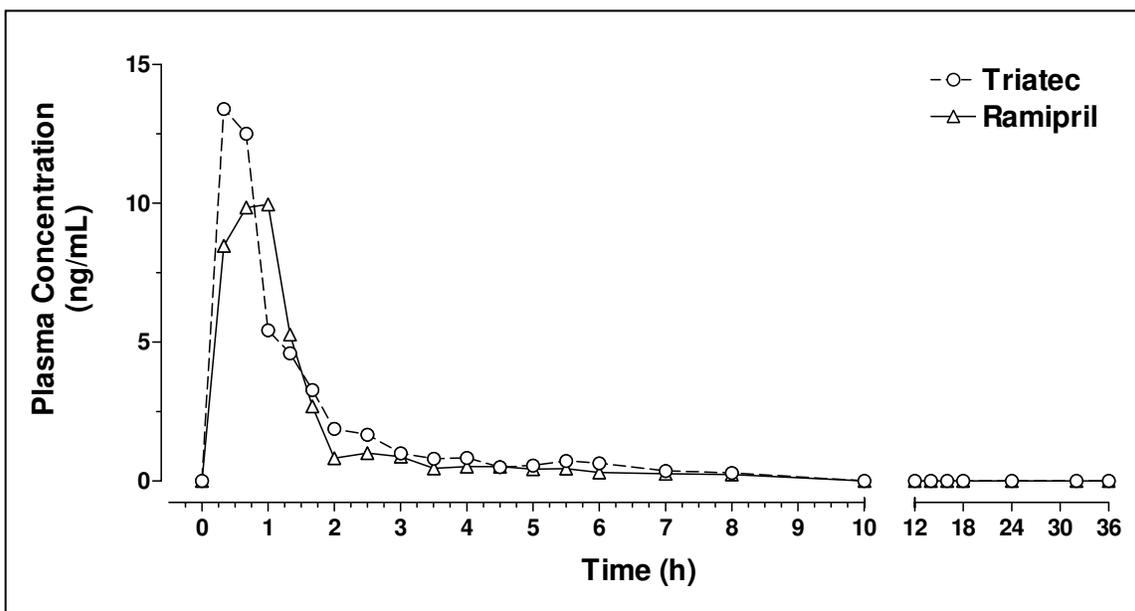
	Ramipril	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	7.00	7.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h)/mL)	14.66	13.83
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h)/mL)	15.35	14.16
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	4.50	2.28
T <sub>last</sub> (h)	8.00	7.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h)/mL)	14.93	13.83
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	2.76	2.28
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h)/mL)- linear	15.32	14.20
C <sub>max</sub> (ng/mL)	11.50	12.30
T <sub>max</sub> (h)	0.33	0.67
T <sub>1/2</sub> (h)	1.25	1.04
K <sub>e</sub> (1/h)	0.56	0.67

## Voluntário 24



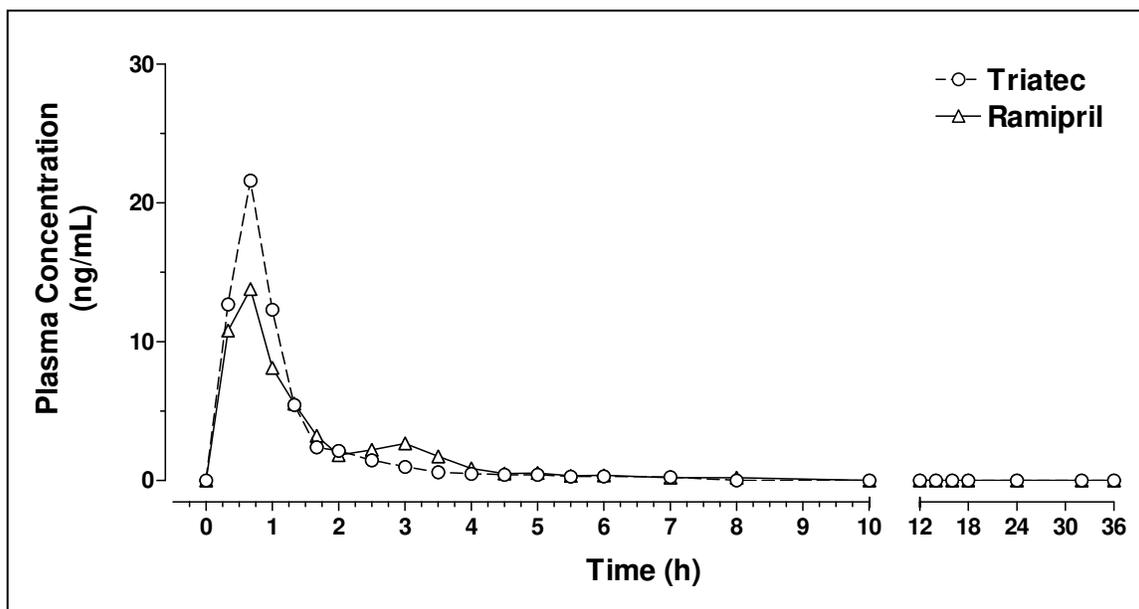
	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	5.50	5.50
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h)/mL)	16.34	15.15
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h)/mL)	17.29	15.55
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	5.49	2.54
$T_{last}$ (h)	8.00	5.50
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h)/mL)	16.81	15.15
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	2.75	2.54
$AUC_{0-36}$ ([ng* h)/mL)- linear	17.49	15.63
$C_{max}$ (ng/mL)	21.90	21.70
$T_{max}$ (h)	0.33	0.35
$T_{1/2}$ (h)	1.61	1.19
$K_e$ (1/h)	0.43	0.58

## Voluntário 25



	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	8.00	8.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	17.68	14.95
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	18.44	16.48
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	4.14	9.25
$T_{last}$ (h)	8.00	8.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	17.68	14.95
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	4.14	9.25
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	18.21	15.39
$C_{max}$ (ng/mL)	13.40	9.96
$T_{max}$ (h)	0.33	1.00
$T_{1/2}$ (h)	1.80	4.59
$K_e$ (1/h)	0.39	0.15

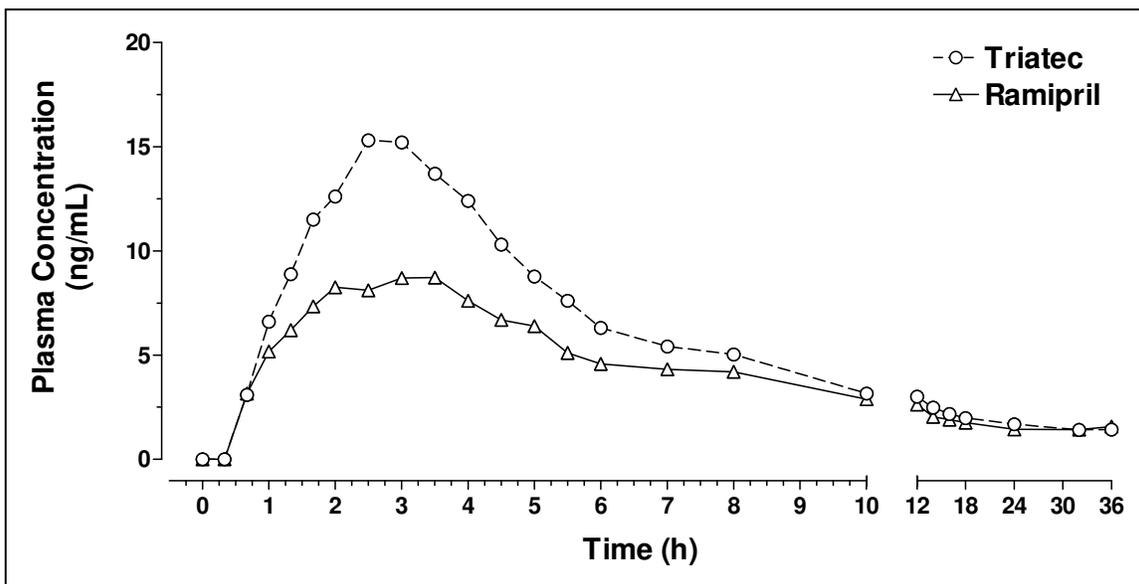
## Voluntário 26



	<b>Ramipril</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	7.00	7.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	21.36	19.23
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	22.30	19.81
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	4.22	2.93
$T_{last}$ (h)	7.00	8.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	21.36	19.44
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	4.22	1.85
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	21.88	19.88
$C_{max}$ (ng/mL)	21.60	13.80
$T_{max}$ (h)	0.67	0.67
$T_{1/2}$ (h)	2.67	1.22
$K_e$ (1/h)	0.26	0.57

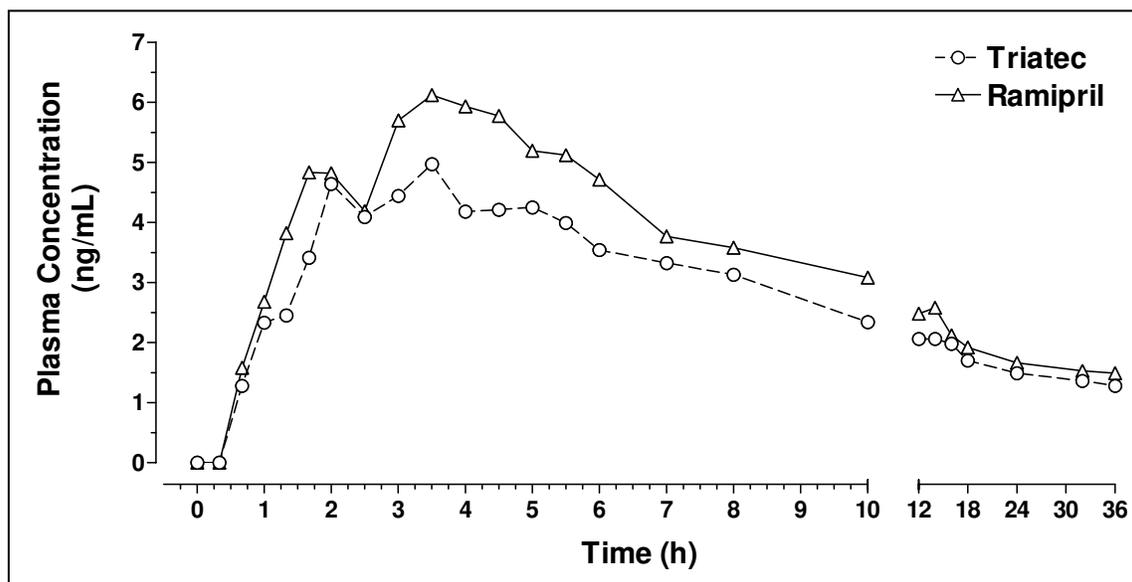
**Gráficos das Curvas de concentração versus tempo e parâmetros farmacocinéticos individuais para o Ramiprilato**

**Voluntário 2**



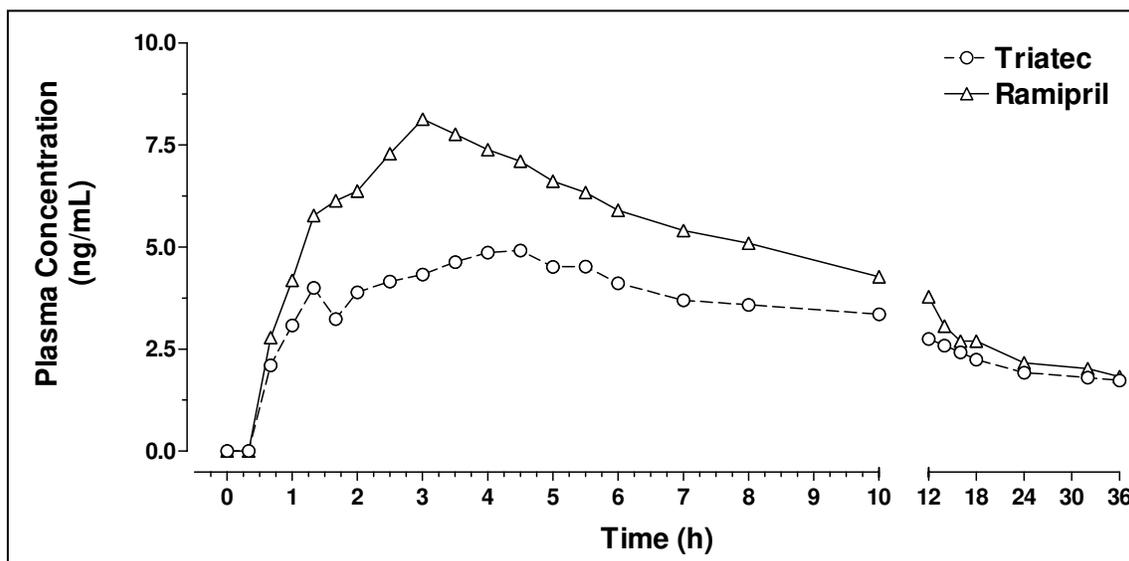
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	126.93	98.00
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	193.43	124.38
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	34.38	21.21
$T_{last}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	126.93	98.00
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	34.38	21.21
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	127.23	98.18
$C_{max}$ (ng/mL)	15.30	8.72
$T_{max}$ (h)	2.50	3.50
$T_{1/2}$ (h)	32.23	11.65
$K_e$ (1/h)	0.02	0.06

### Voluntário 3



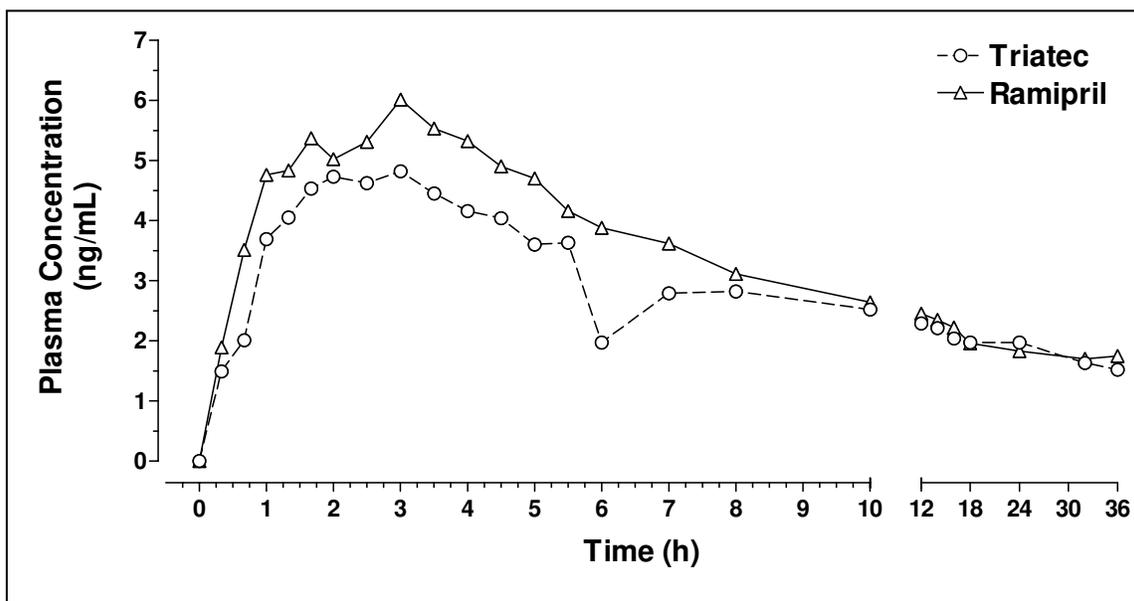
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	75.57	89.94
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	178.12	252.57
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	57.58	64.39
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	75.57	89.94
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	57.58	64.39
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	75.65	90.04
C <sub>max</sub> (ng/mL)	4.97	6.12
T <sub>max</sub> (h)	3.50	3.50
T <sub>1/2</sub> (h)	55.53	75.66
K <sub>e</sub> (1/h)	0.01	0.01

### Voluntário 4



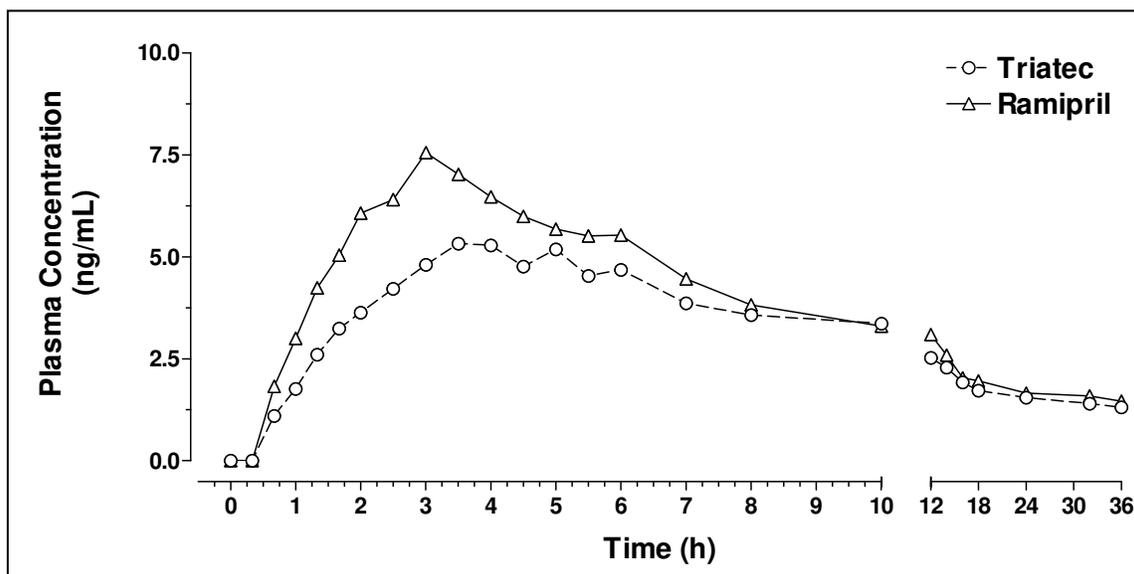
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	92.64	120.83
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	293.91	213.55
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	68.48	43.42
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	92.64	120.83
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	68.48	43.42
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	92.71	120.98
C <sub>max</sub> (ng/mL)	4.91	8.13
T <sub>max</sub> (h)	4.50	3.00
T <sub>1/2</sub> (h)	80.64	35.31
K <sub>e</sub> (1/h)	0.01	0.02

## Voluntário 5



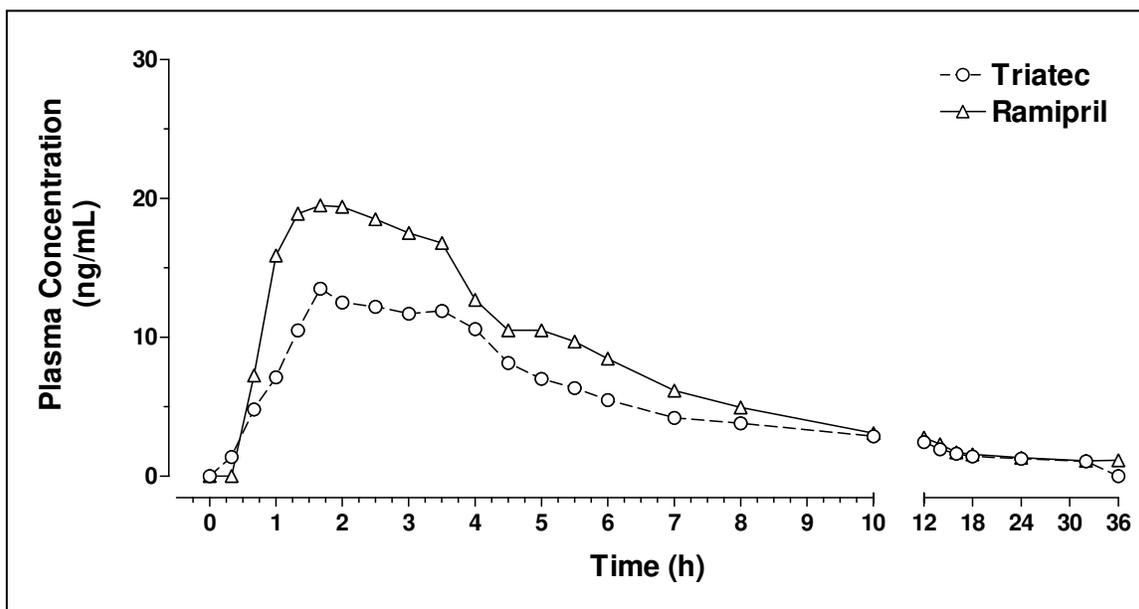
	<b>Ramiprilat</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	82.87	91.67
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	152.25	199.94
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	45.57	54.15
$T_{last}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	82.87	91.67
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	45.57	54.15
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	83.00	91.72
$C_{max}$ (ng/mL)	4.82	6.01
$T_{max}$ (h)	3.00	3.00
$T_{1/2}$ (h)	31.64	42.88
$K_e$ (1/h)	0.02	0.02

## Voluntário 6



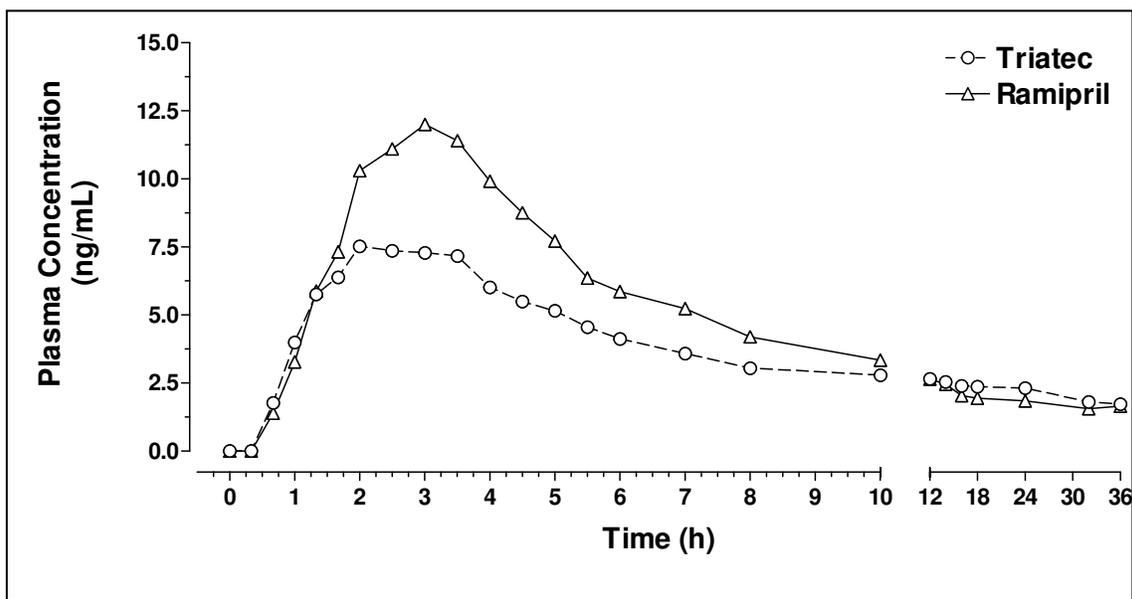
	<b>Ramiprilat</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	82.98	97.72
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	171.79	190.63
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	51.69	48.74
$T_{last}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	82.98	97.72
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	51.69	48.74
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	83.09	97.84
$C_{max}$ (ng/mL)	5.32	7.55
$T_{max}$ (h)	3.50	3.00
$T_{1/2}$ (h)	46.99	44.11
$K_e$ (1/h)	0.01	0.02

## Voluntário 7



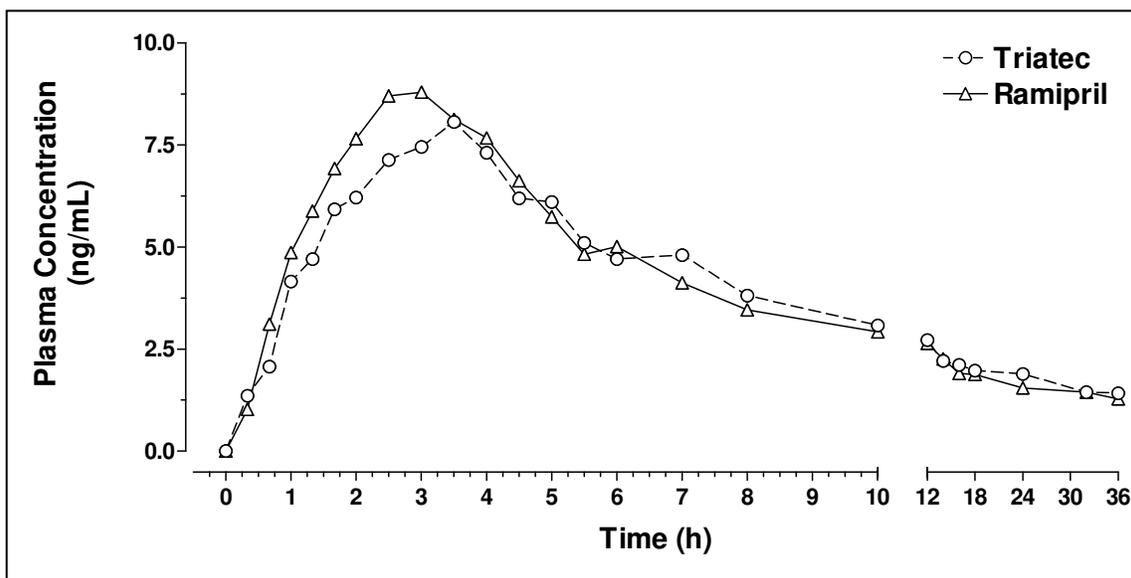
	<b>Ramiprilat</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	32.05	32.05
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h)/mL)	102.01	136.38
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h)/mL)	155.25	195.30
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	34.29	30.17
$T_{last}$ (h)	32.05	36.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h)/mL)	102.01	140.85
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	34.29	27.88
$AUC_{0-36}$ ([ng* h)/mL)- linear	104.33	141.26
$C_{max}$ (ng/mL)	13.50	19.50
$T_{max}$ (h)	1.67	1.74
$T_{1/2}$ (h)	34.49	32.82
$K_e$ (1/h)	0.02	0.02

## Voluntário 8



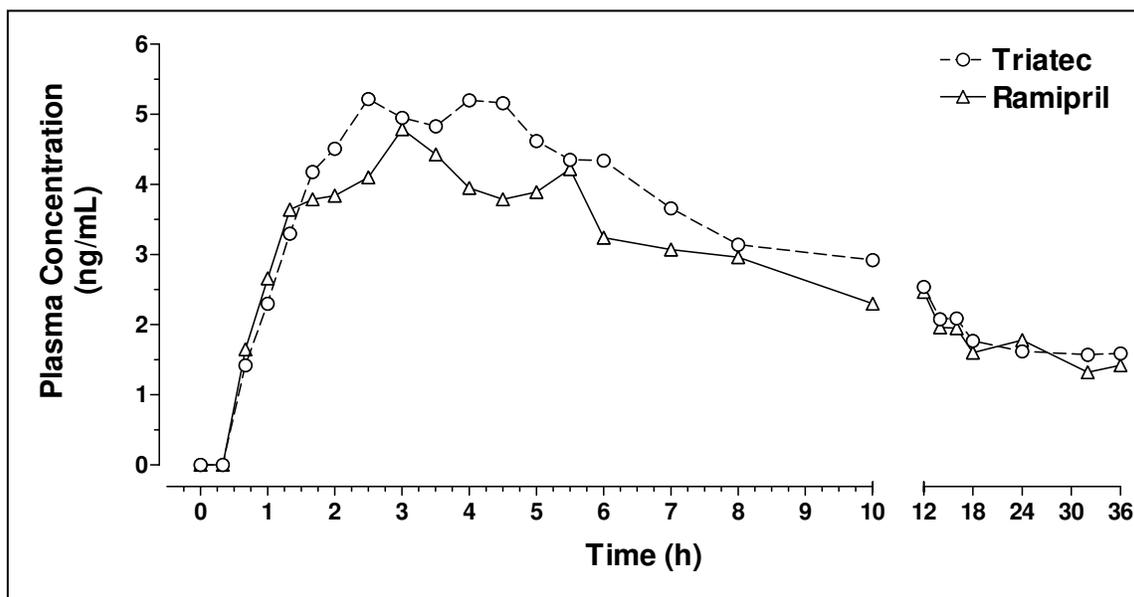
	<b>Ramiprilat</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h)/mL)	102.42	113.88
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h)/mL)	198.51	250.61
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	48.41	54.56
$T_{last}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h)/mL)	102.42	113.88
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	48.41	54.56
$AUC_{0-36}$ ([ng* h)/mL)- <i>linear</i>	102.54	114.05
$C_{max}$ (ng/mL)	7.52	12.00
$T_{max}$ (h)	2.00	3.00
$T_{1/2}$ (h)	38.73	57.44
$K_e$ (1/h)	0.02	0.01

### Voluntário 9



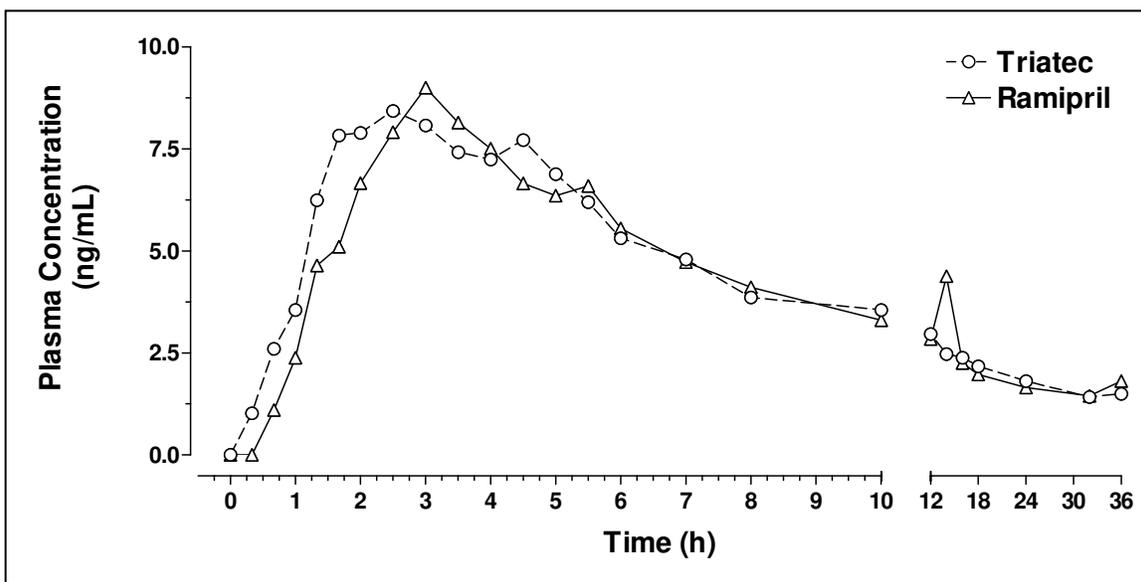
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Lo	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	99.04	97.60
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	167.02	163.64
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	40.70	40.36
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	99.04	97.60
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	40.70	40.36
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	99.22	97.73
C <sub>max</sub> (ng/mL)	8.06	8.79
T <sub>max</sub> (h)	3.50	3.00
T <sub>1/2</sub> (h)	33.18	35.76
K <sub>e</sub> (1/h)	0.02	0.02

### Voluntário 11



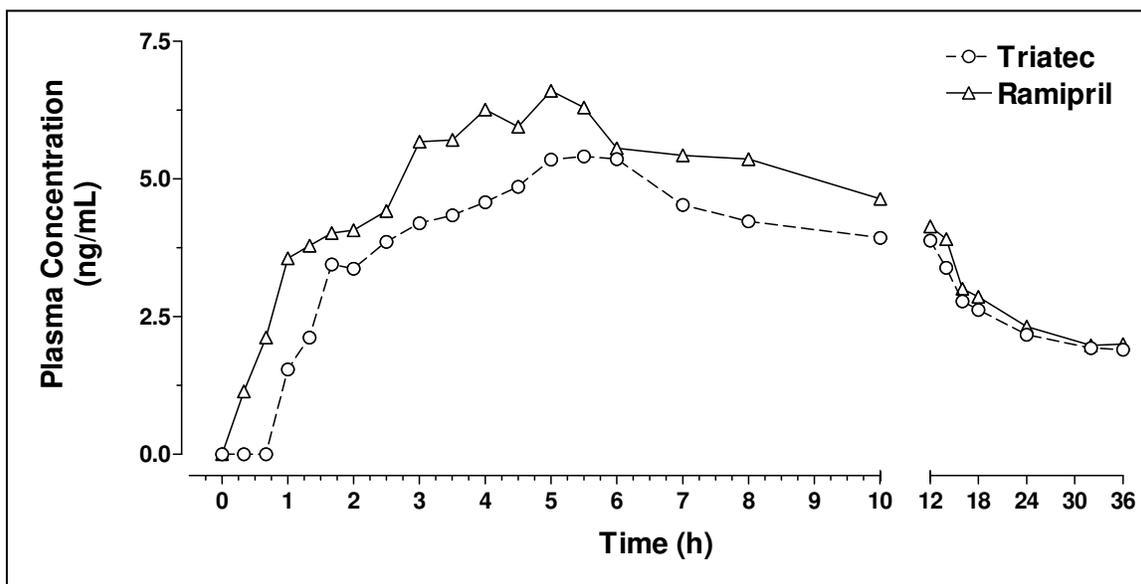
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	84.69	76.78
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	122.74	114.52
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	31.00	32.96
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	84.69	76.78
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	31.00	32.96
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	84.75	76.96
C <sub>max</sub> (ng/mL)	5.22	4.79
T <sub>max</sub> (h)	2.50	3.00
T <sub>1/2</sub> (h)	16.59	18.42
K <sub>e</sub> (1/h)	0.04	0.04

## Voluntário 12



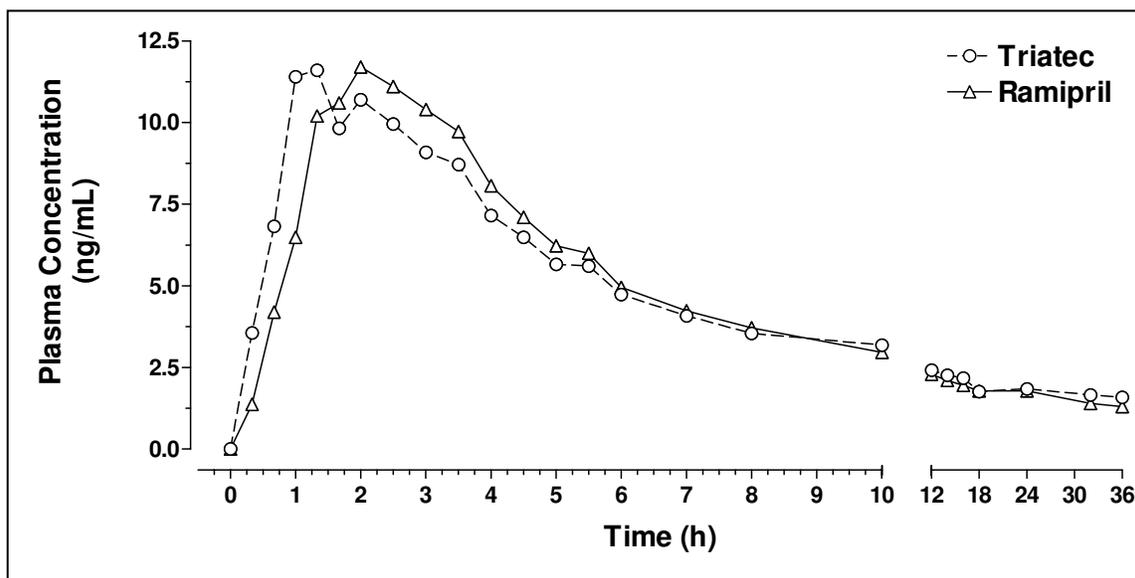
	<b>Ramiprilat</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	106.39	105.09
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	165.08	138.21
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	35.55	23.97
$T_{last}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	106.39	105.09
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	35.55	23.97
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	106.57	105.59
$C_{max}$ (ng/mL)	8.43	9.00
$T_{max}$ (h)	2.50	3.00
$T_{1/2}$ (h)	27.12	12.69
$K_e$ (1/h)	0.03	0.05

### Voluntário 13



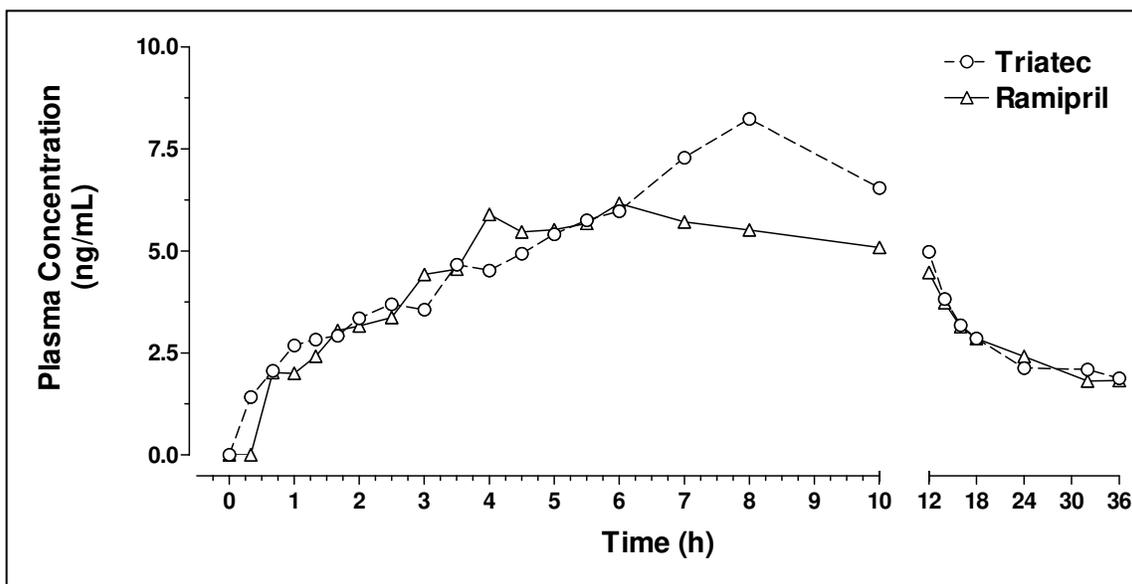
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	103.87	119.62
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	201.26	169.00
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	48.39	29.22
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	103.87	119.62
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	48.39	29.22
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	103.98	119.79
C <sub>max</sub> (ng/mL)	5.41	6.60
T <sub>max</sub> (h)	5.50	5.00
T <sub>1/2</sub> (h)	35.53	17.12
K <sub>e</sub> (1/h)	0.02	0.04

### Voluntário 14



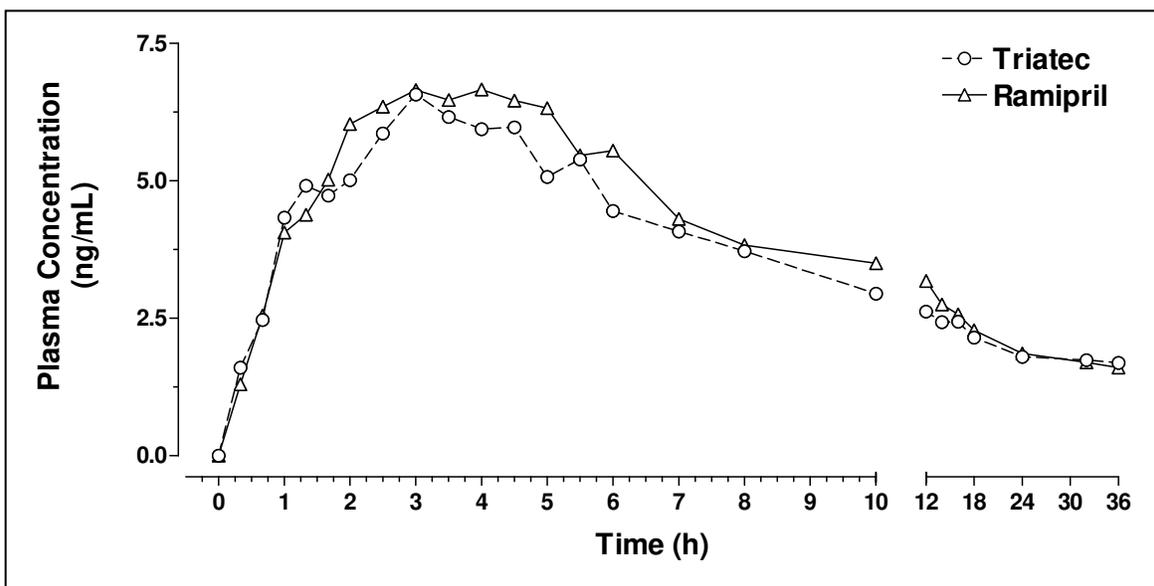
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	111.15	107.60
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	234.09	156.23
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	52.52	31.12
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	111.15	107.60
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	52.52	31.12
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	111.28	107.78
C <sub>max</sub> (ng/mL)	11.60	11.70
T <sub>max</sub> (h)	1.33	2.00
T <sub>1/2</sub> (h)	53.94	25.93
K <sub>e</sub> (1/h)	0.01	0.03

### Voluntário 15



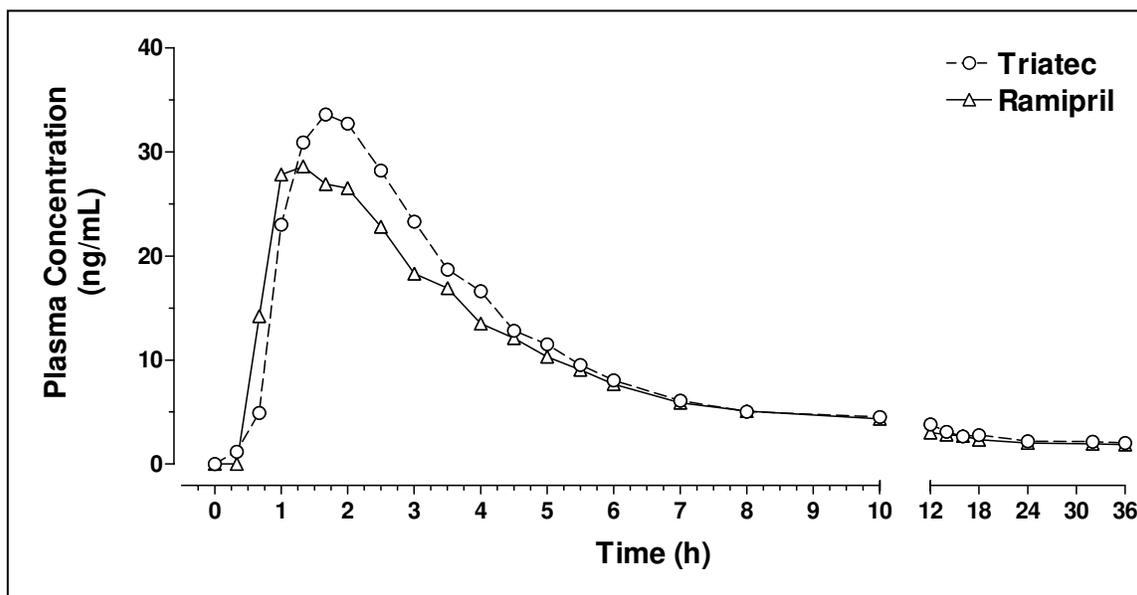
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	125.05	115.89
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	190.24	179.38
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	34.27	35.40
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	125.05	115.89
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	34.27	35.40
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	125.38	116.10
C <sub>max</sub> (ng/mL)	8.23	6.16
T <sub>max</sub> (h)	8.00	6.00
T <sub>1/2</sub> (h)	24.03	24.18
K <sub>e</sub> (1/h)	0.03	0.03

### Voluntário 16



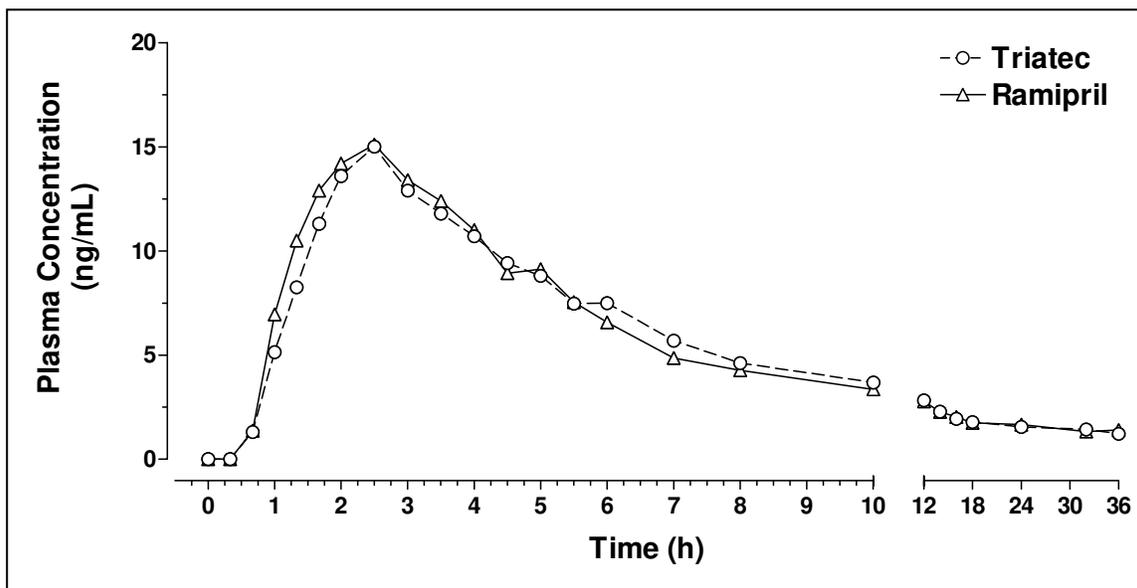
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	97.39	104.10
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	152.52	233.54
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	36.15	55.42
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	97.39	104.10
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	36.15	55.42
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	97.49	104.22
C <sub>max</sub> (ng/mL)	6.57	6.66
T <sub>max</sub> (h)	3.00	4.00
T <sub>1/2</sub> (h)	22.61	56.07
K <sub>e</sub> (1/h)	0.03	0.01

## Voluntário 17



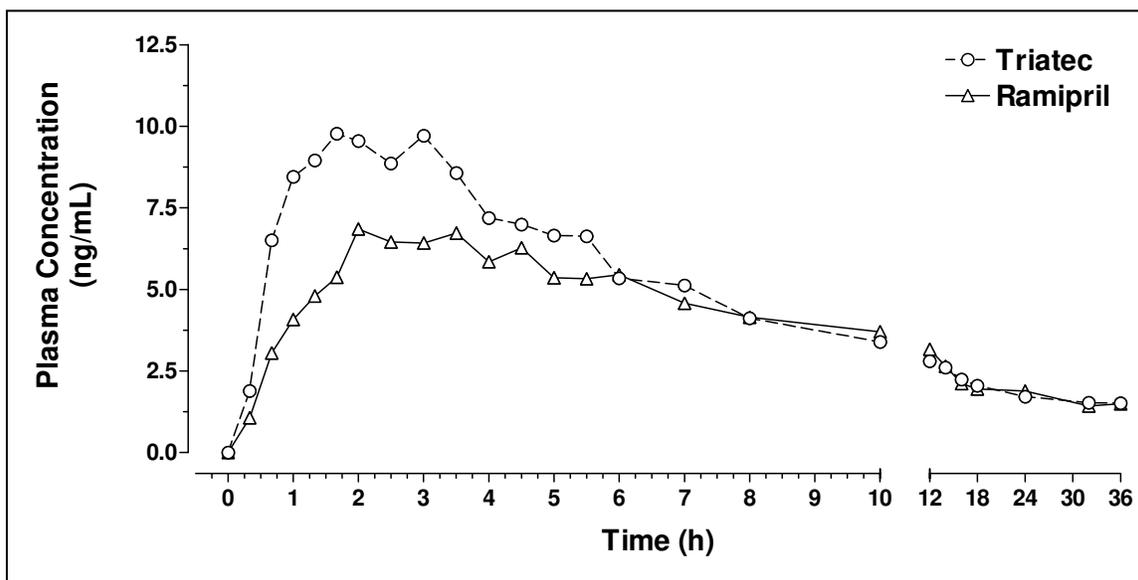
	<b>Ramiprilat</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ( $[ng^* h]/mL$ )	195.96	179.00
$AUC_{0-inf}$ ( $[ng^* h]/mL$ )	308.56	231.64
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	36.49	22.73
$T_{last}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ( $[ng^* h]/mL$ )	195.96	179.00
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	36.49	22.73
$AUC_{0-36}([ng^* h]/mL)$ - linear	196.35	179.32
$C_{max}$ (ng/mL)	33.60	28.60
$T_{max}$ (h)	1.67	1.33
$T_{1/2}$ (h)	38.83	19.41
$K_e$ (1/h)	0.02	0.04

### Voluntário 18



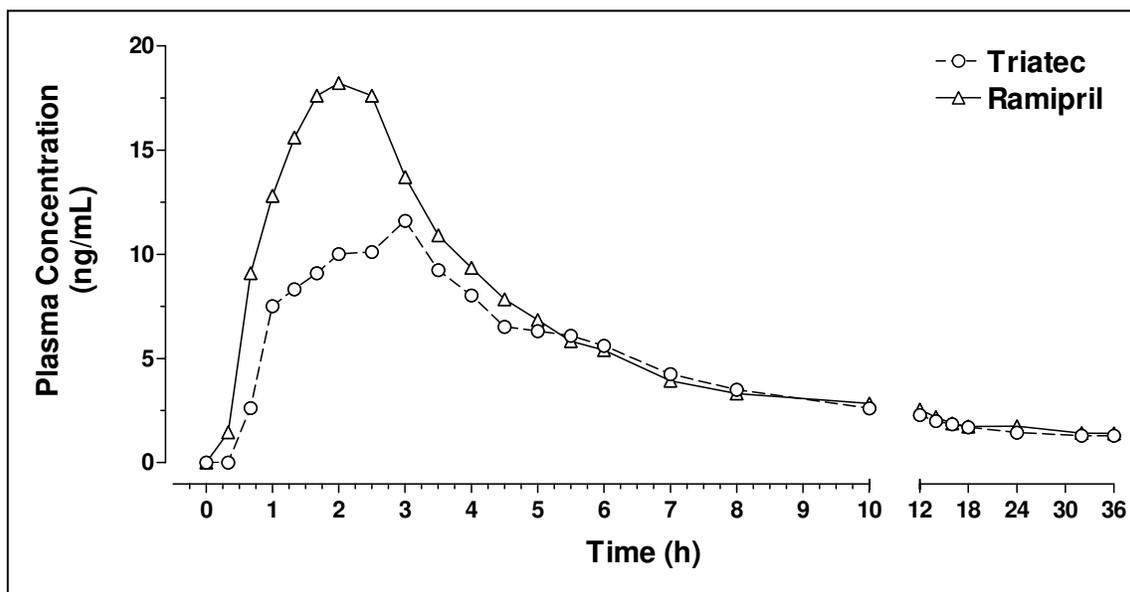
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	120.90	121.45
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	180.10	186.25
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	32.87	34.79
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	120.90	121.45
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	32.87	34.79
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	121.13	121.69
C <sub>max</sub> (ng/mL)	15.00	15.10
T <sub>max</sub> (h)	2.50	2.50
T <sub>1/2</sub> (h)	33.64	32.08
K <sub>e</sub> (1/h)	0.02	0.02

### Voluntário 19



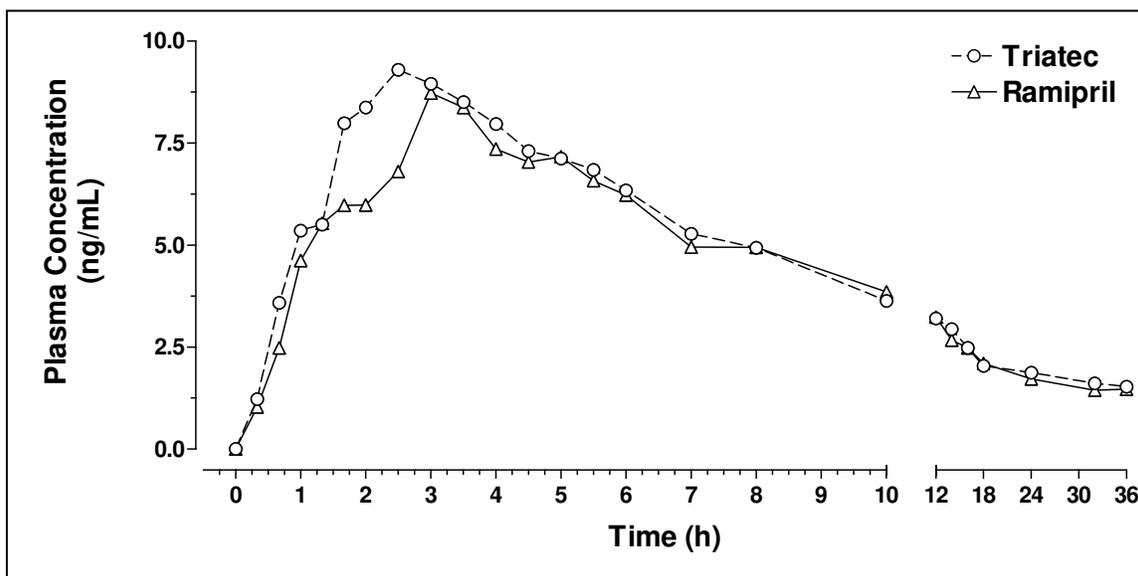
	<b>Ramiprilat</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	112.74	100.80
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	189.86	129.84
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	40.62	22.36
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	112.74	100.80
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	40.62	22.37
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	112.89	100.98
C <sub>max</sub> (ng/mL)	9.77	6.85
T <sub>max</sub> (h)	1.67	2.00
T <sub>1/2</sub> (h)	35.40	13.42
K <sub>e</sub> (1/h)	0.02	0.05

## Voluntário 20



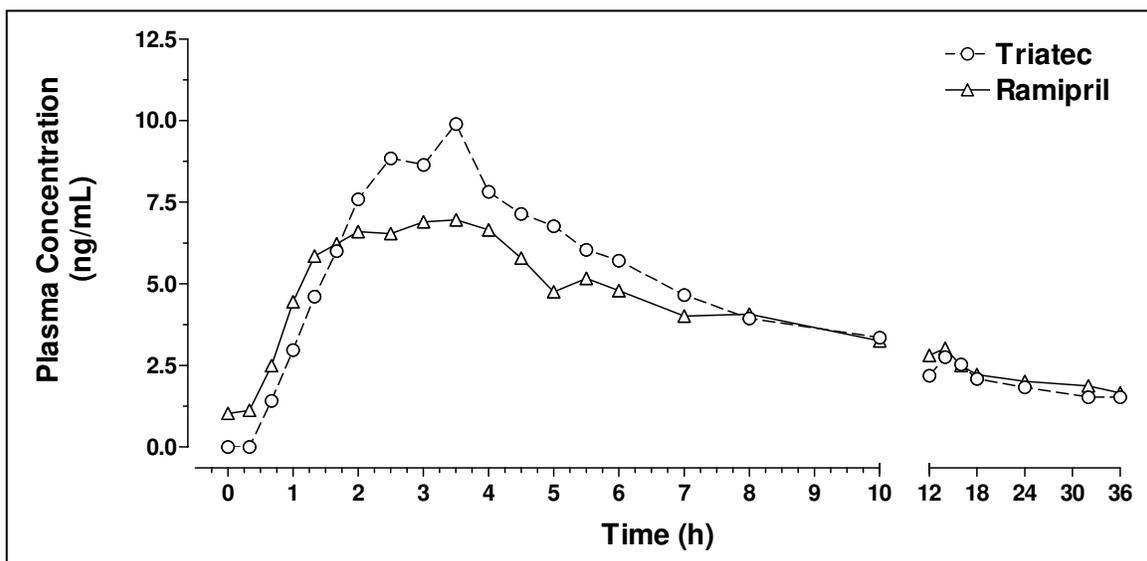
	<b>Ramiprilat</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Lo	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	100.54	124.56
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	165.26	218.21
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	39.16	42.92
T <sub>last</sub> (h)	36.02	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	100.56	124.56
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	39.15	42.92
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	100.74	124.79
C <sub>max</sub> (ng/mL)	11.60	18.20
T <sub>max</sub> (h)	3.00	2.00
T <sub>1/2</sub> (h)	34.76	46.37
K <sub>e</sub> (1/h)	0.02	0.01

### Voluntário 21



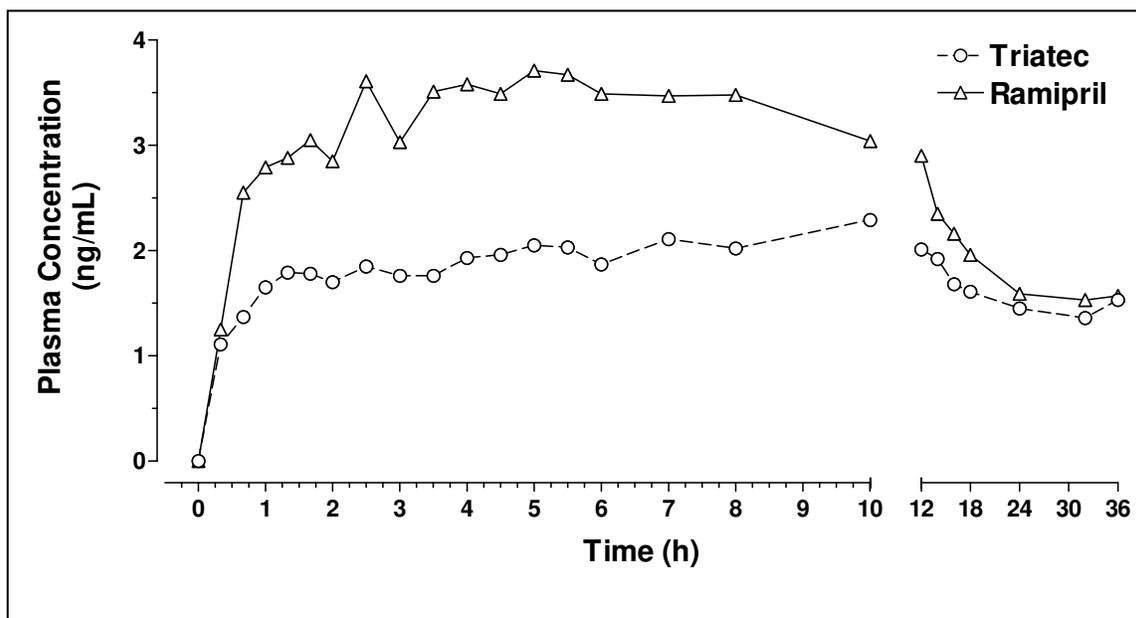
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	115.06	108.38
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	208.12	160.73
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	44.72	32.57
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	115.06	108.38
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	44.72	32.57
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	115.22	108.58
C <sub>max</sub> (ng/mL)	9.29	8.72
T <sub>max</sub> (h)	2.53	3.00
T <sub>1/2</sub> (h)	42.16	24.68
K <sub>e</sub> (1/h)	0.02	0.03

## Voluntário 22



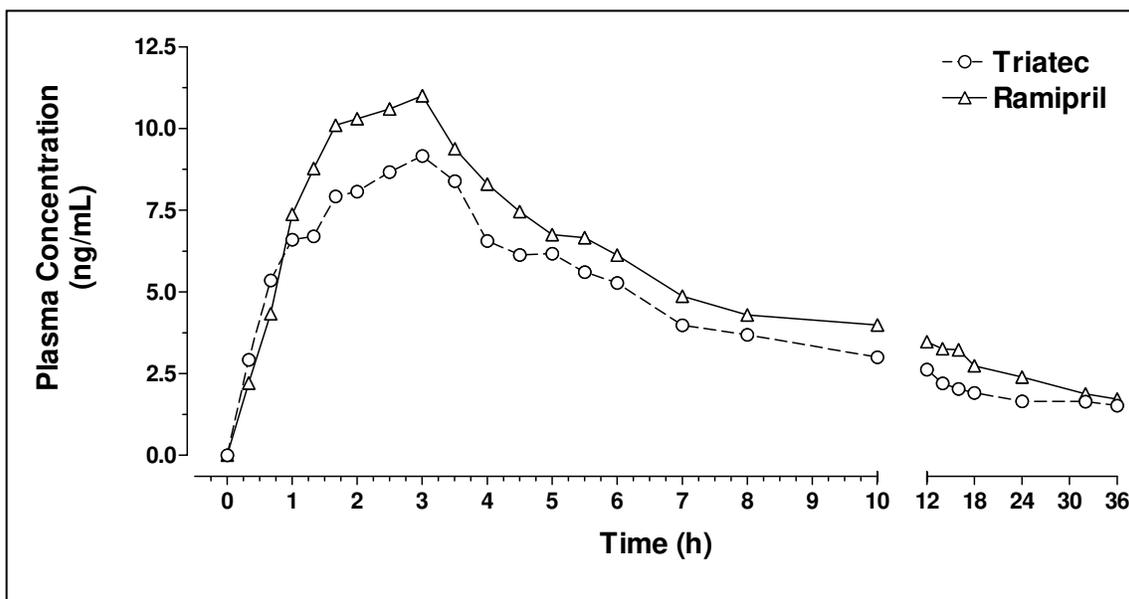
	<b>Ramiprilat</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	105.48	105.24
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	188.71	217.05
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	44.10	51.51
$T_{last}$ (h)	36.02	36.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	105.51	105.24
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	44.09	51.51
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	105.76	105.36
$C_{max}$ (ng/mL)	9.89	6.96
$T_{max}$ (h)	3.50	3.50
$T_{1/2}$ (h)	37.69	46.69
$K_e$ (1/h)	0.02	0.01

### Voluntário 23



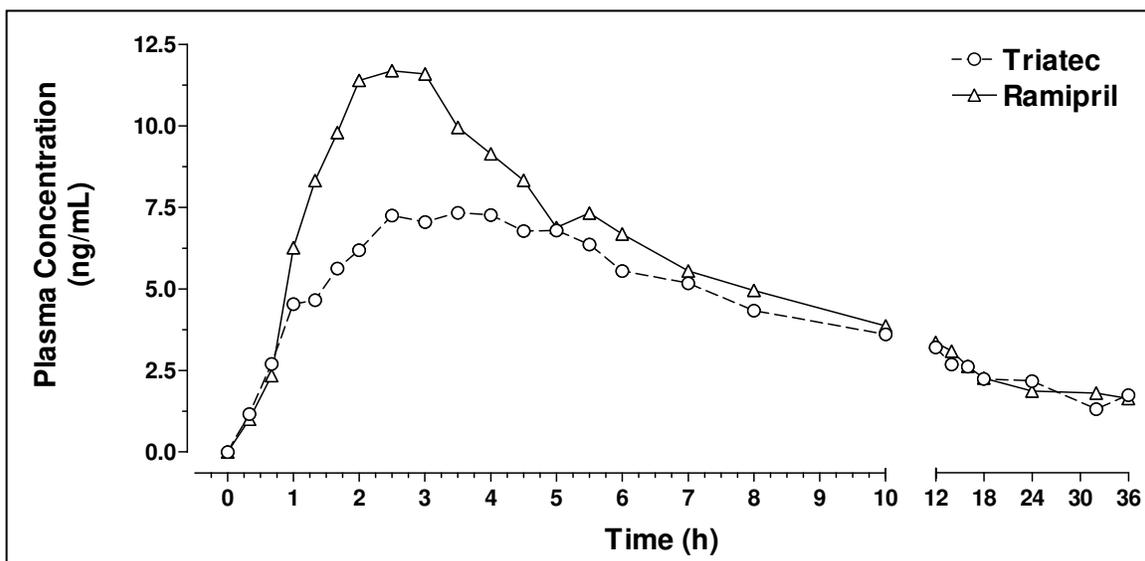
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	60.06	81.09
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	159.54	130.55
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	62.35	37.89
T <sub>last</sub> (h)	36.03	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	60.10	81.09
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	62.33	37.89
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	60.14	81.16
C <sub>max</sub> (ng/mL)	2.29	3.71
T <sub>max</sub> (h)	10.00	5.00
T <sub>1/2</sub> (h)	45.05	21.84
K <sub>e</sub> (1/h)	0.02	0.03

### Voluntário 24



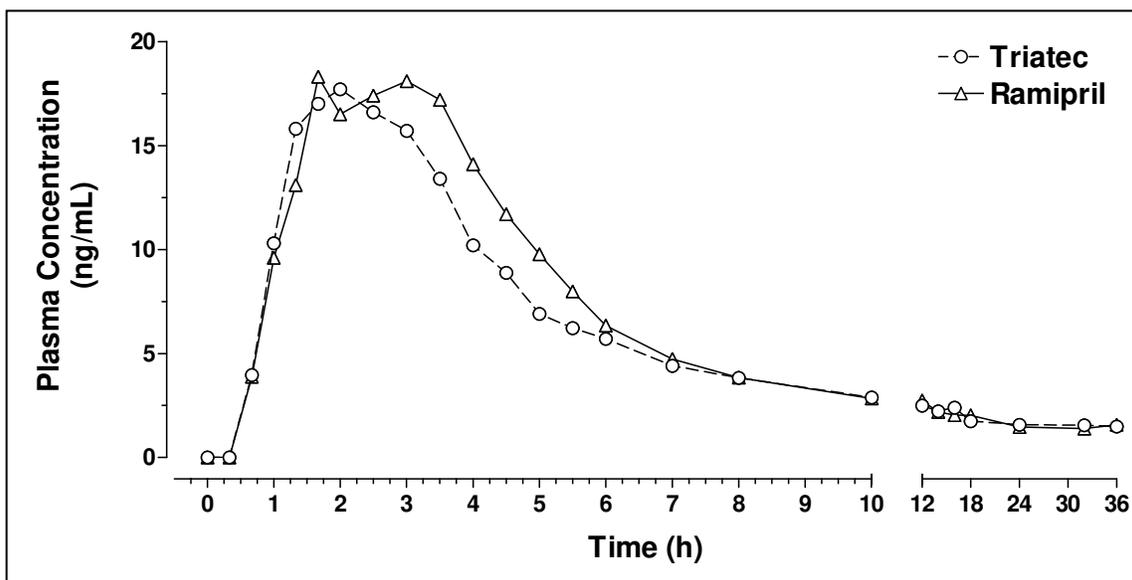
	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	103.64	131.32
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	205.02	196.20
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	49.45	33.07
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.02
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	103.64	131.36
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	49.45	33.05
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	103.77	131.55
C <sub>max</sub> (ng/mL)	9.16	11.00
T <sub>max</sub> (h)	3.00	3.00
T <sub>1/2</sub> (h)	46.23	26.13
K <sub>e</sub> (1/h)	0.02	0.03

### Voluntário 25



	Ramiprilat	
	Triatec®	Ramipril
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
T <sub>paired</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast(paired)</sub> ([ng* h]/mL)	108.65	126.59
AUC <sub>0-inf</sub> ([ng* h]/mL)	142.23	179.20
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	23.61	29.36
T <sub>last</sub> (h)	36.00	36.00
AUC <sub>0-Tlast</sub> ([ng* h]/mL)	108.65	126.59
% AUC <sub>0-inf</sub> extrapolated	23.61	29.36
AUC <sub>0-36</sub> ([ng* h]/mL)- linear	109.05	126.77
C <sub>max</sub> (ng/mL)	7.34	11.70
T <sub>max</sub> (h)	3.50	2.50
T <sub>1/2</sub> (h)	13.30	22.24
K <sub>e</sub> (1/h)	0.05	0.03

## Voluntário 26



	<b>Ramiprilat</b>	
	<b>Triatec®</b>	<b>Ramipril</b>
	(Trapezoidal Method) Linear-Log	(Trapezoidal Method) Linear-Log
$T_{paired}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}(paired)}$ ([ng* h]/mL)	126.62	134.40
$AUC_{0-inf}$ ([ng* h]/mL)	164.90	196.30
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	23.21	31.53
$T_{last}$ (h)	36.00	36.00
$AUC_{0-T_{last}}$ ([ng* h]/mL)	126.62	134.40
% $AUC_{0-inf}$ extrapolated	23.21	31.53
$AUC_{0-36}$ ([ng* h]/mL)- linear	126.85	134.73
$C_{max}$ (ng/mL)	17.70	18.30
$T_{max}$ (h)	2.00	1.67
$T_{1/2}$ (h)	17.81	27.33
$K_e$ (1/h)	0.04	0.03

**Comparative bioavailability of two Ramipril formulations in healthy human  
volunteers after a single dose administration**

Gustavo Duarte Mendes<sup>1,3</sup>, André Tasso Dantas Sanfelice<sup>1</sup>, Ney Carter do Carmo Borges<sup>2</sup>,  
Luiz Eduardo Cavedal<sup>2</sup>, Carlos Sverdloff<sup>3</sup>, Mirian Prado Galuppo<sup>3</sup>, João Henrique Módolo<sup>3</sup>  
& Gilberto De Nucci<sup>1,2,3</sup> \*

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, State University of Campinas, Campinas/SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, State University of Campinas, PO Box 6111  
Campinas/SP, Brazil

<sup>3</sup>Cartesius Development of Clinical Research, Jesuino Marcondes Machado Ave, 415,  
13092-320 Campinas/SP, Brazil

**Running title:** ramipril and ramiprilat bioequivalence study

**Key words:** tandem mass spectrometry, LC/MS/MS, bioavailability, pharmacokinetics

**\* Author for correspondence:**

Gilberto De Nucci, MD, PhD.

415 Jesuino Marcondes Machado Ave, Campinas, SP, Brazil

Postal Code: 13092-320 - Fax: 55 19 3252-1516

e-mail: [denucci@dglnet.com.br](mailto:denucci@dglnet.com.br)

## SUMMARY

**Objective:** To assess the bioequivalence of one ramipril 5 mg tablet formulation (ramipril test formulation from Laboratórios Biosintética Ltda and Triatec<sup>®</sup> from Aventis Pharma standard reference formulation) in 26 healthy volunteers of both sexes.

**Methods:** The study was conducted using an open, randomized, two-period crossover design with a 2-week washout interval. Plasma samples were obtained over a 36h period. Plasma ramipril and ramiprilat concentrations were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) with positive ion electrospray ionization using multiple reaction monitoring (MRM). From the ramipril and ramiprilat plasma concentration vs time curves, the following pharmacokinetic parameters were obtained:  $AUC_{last}$ ,  $AUC_{inf}$  and  $C_{max}$ .

**Results:** The limit of quantification was  $0.2 \text{ ng.mL}^{-1}$  and  $1.0 \text{ ng.mL}^{-1}$  for ramipril and ramiprilat, respectively. The geometric mean and respective 90% confidence interval (CI) Ramipril/Triatec<sup>®</sup> and Ramiprilat/Triatec<sup>®</sup> percent ratios were respectively: 104.69% (90% CI= 93.21%-117.59%) for  $C_{max}$ , 102.49% (90% CI= 92.76%-113.24%) for  $AUC_{last}$ , 103.60% (90% CI= 93.56%-114.73%) for  $AUC_{inf}$ , 108.48% (90% CI= 98.86%-119.03%) for  $C_{max}$ , 105.88% (90% CI= 101.55%-110.39%) for  $AUC_{last}$ , 97.30% (90% CI= 90.17%-104.99%) for  $AUC_{inf}$ .

**Conclusion:** Since the 90% CI for  $AUC_{last}$ ,  $AUC_{inf}$  and  $C_{max}$  ratios were within the 80-125% interval proposed by the US FDA, it was concluded that ramipril formulation elaborated by Laboratórios Biosintética Ltda is bioequivalent to the Triatec<sup>®</sup> formulation for both the rate and the extent of absorption.

## INTRODUCTION

The ramipril, 2-[N-[(S)-1-(ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-L-alanyl]- (1S,3S,5S) 2-azabicyclo(3-3-0) octane carboxylic acid, is an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) [1], that regulates hypertension and treatment of congestive heart failure [2,3,4]. It is a pro-drug [1,2], that acts on the renin-angiotensin aldosterone system by inhibiting the conversion of the inactive angiotensin I to the highly potent vasoconstrictor, angiotensin II.

The aim of this study was to compare in healthy volunteers of both sexes, the pharmacokinetic profiles and to evaluate the bioequivalence of two ramipril 5 mg tablet formulations. Ramipril and ramiprilat plasma levels were measured by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) in human plasma using enalapril and enalaprilat as the internal standards.

## MATERIALS AND METHODS

### Clinical protocol

Twenty six healthy volunteers of both sexes between 18 and 50 years of age and within 15% of the ideal body weight, were selected for the study after assessment of their health status by clinical evaluation (physical examination, ECG) and the following laboratory tests: blood glucose, urea, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase,  $\gamma$ -GT, total bilirubin, albumin and total protein, triglyceride, total cholesterol, hemoglobin, hematocrit, total and differential white cell counts, and routine urinalysis. All subjects were negative for HIV, HCV and HBV (except for serological scar).

The study began with 26 healthy volunteers and finished with 24 healthy volunteers. Two male volunteers dropped out of the study for personal reasons. The volunteers had the following clinical characteristics (according to gender and expressed as mean  $\pm$  SD [range]): males: age:  $30.7 \pm 8.8$  yr. [20 - 44], height:  $172.0 \pm 8.0$  cm [160.0 - 185.0], body weight:  $68.1 \pm 7.8$  kg [55.0 - 81.5]; females: age:  $32.4 \pm 6.2$  yr. [22 - 39], height:  $157.0 \pm 6.0$  cm [144.0 - 165.0],

body weight:  $58.7 \pm 5.7$  kg [49.5 - 68.2]. All subjects gave written informed consent and the State University of Campinas - Unicamp approved the clinical protocol. The study was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (1964), Tokyo (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996) and Edinburgh (2000) revisions. After screening and wash-out period (of at least 2 weeks), the individuals who qualified were confined for 2 periods of approximately 48 hours.

The study was a single dose, two-way randomized crossover design with a two-week washout period between the doses. During each period, the volunteers were hospitalized at 03:00 p.m. and after an overnight fast they received (at approximately 7:00 a.m.) a single dose of ramipril (5 mg of either tablet formulation). Water (200 mL) was given immediately after the drug administration and the volunteers then fasted for 2 h, after which, a standard lunch was served; an evening meal was provided 10 h after dosing. A standard meal of rice, beans, vegetables, and fried chicken meat plus a fruit as dessert was consumed. No other food was permitted during the "in-house" period and liquid consumption was allowed *ad libitum* after lunch (with the exception of xanthine-containing drinks, including tea, coffee, and cola). At time intervals of 0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 and 36 hours, systolic and diastolic arterial pressure (measured non-invasively with a sphygmomanometer), heart rate and temperature were recorded.

### **Formulations**

The following formulations were employed: ramipril (test formulation from Laboratórios Biosintética Ltda, Brazil; lot N° 273/03, expiration 07/2005) and Triatec<sup>®</sup> (standard reference formulation from Aventis Pharma, lot N° 204971, expiration date 06/2005.)

### **Drug analysis**

Blood samples (4 mL) from a suitable antecubital vein were collected by an indwelling catheter into EDTA containing tubes at 0.33h, 0.66h, 1h, 1.33h, 1.66h, 2h, 2.5h, 3h, 3.5h, 4h, 4.5h, 5h, 5.5h, 6h, 7h, 8h, 10h, 12h, 14h, 16h, 18h, 24h, 32h and 36h

post-dosing. The blood samples were centrifuged at approximately 2000 x *g* for 1 min at 4°C and the plasma decanted stored at -20°C until assayed for ramipril and ramiprilat contents.

Drug plasma extraction was performed using a solid-phase extraction. Briefly, 500 µL of each plasma sample were introduced into a glass tube followed by the internal standards (50 µL of 0.1 µg/mL of Enalapril/Enalaprilat in methanol/water 50/50; v/v solution) and vortex-mixed the samples for approximately 10s. The HLB Oasis SPE cartridges for the assay were pre-conditioned by washing with 1 mL methanol and with 1 mL of deionized water. All samples were applied to individual HLB Oasis SPE cartridges, then washed (5 times) the cartridges with 1 mL of washing solution (aqueous hydrochloric acid solution (10 mM)). Cartridges were then eluted with 0.5 mL of the methanol and the solvent was evaporated using a flow of nitrogen. The residue was dissolved with 0.2 mL of pure deionized water and vortex-mixed for 15 s. All solutions were transferred to 96-well plates and then placed into auto injector racks. Typical standard retention times were 2.1, 1.6, 1.7 and 1.3 min for ramipril, ramiprilat, enalapril and enalaprilat, respectively. The mass spectrometer (Micromass model Quattro Ultima) equipped with an electro-spray source using a cross-flow counter electrode was run in positive mode (ES+), and was set up in Multiple Reaction Monitoring (MRM), monitoring the transitions 417.00 > 234.0, 389.00 > 206.00, 377.00 > 234.0 and 349.00 > 206.0 for ramipril, ramiprilat, enalapril maleate and enalaprilat, respectively as the precursor ions *m/z* and the respective product ions.

### **Stability**

Stability quality control plasma samples (0.6, 4.0 and 40.0 ng/mL for ramipril and 3.0, 9.0 and 16.0 ng/mL for ramiprilat) were subjected to short-term (6h) room temperature, three freeze/thaw (-20 to 25°C) cycles, 73h auto-sampler stability (room temperature) and long-term stability (116 days) tests. Subsequently, the ramipril and ramiprilat concentrations were measured compared to freshly prepared samples. The significance of the results obtained was analyzed by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

## Pharmacokinetics and statistical analysis

Bioequivalence between the two formulations was assessed by calculating individual test/reference ratios for the peak of concentration ( $C_{max}$ ), area under curve (AUC) of plasma concentration until the last concentration observed ( $AUC_{last}$ ), and the area under curve between the first sample (pre-dosage) and infinite ( $AUC_{0-inf}$ ). The  $C_{max}$  and the time taken to achieve this concentration ( $T_{max}$ ) were obtained directly from the curves. The areas under the ramipril and ramiprilat plasma concentration vs. time curves from 0-to the last detectable concentration ( $AUC_{last}$ ) were calculated by applying the linear trapezoid rule. Extrapolation of these areas to infinity ( $AUC_{0-inf}$ ) was done by adding the value  $C_{last}/ke$  to the calculated  $AUC_{last}$  (where  $C_{last}$  = the last detectable concentration). The AUC and  $C_{max}$  data for the two formulations were analyzed by ANOVA to establish whether the 90% CI of the ratios was within the 80-125% interval indicating bioequivalence as proposed by the US Food and Drug Administration. Parametric and non-parametric analyses of ln-transformed arithmetic means and individual  $T_{max}$  differences between test and reference formulations were also performed.

## RESULTS

The ramipril was well tolerated at the administered doses and no significant adverse reactions were observed or reported. All biochemical parameters did not present any clinically relevant alterations.

The mass chromatograms of a sample are shown in Figure 1, in which both the retention times of Ramipril, Ramiprilat, Enalapril and Enalaprilat were 2.1, 1.6, 1.7 and 1.3 min respectively. Table 1 shows the precision and accuracy for the LOQ and QCs.

The mean ramipril plasma concentrations vs. time profiles after a single oral dose of each 5mg tablet formulation of ramipril is shown in Figure 2. Table 2 shows the mean pharmacokinetics parameters obtained from 26 volunteers after the administration of 5 mg ramipril tablet. Table 3 shows the geometric mean of the individual  $C_{max}$ ,  $AUC_{last}$ ,

$AUC_{inf}$ , (test/reference formulation), the respective 90% confidence intervals (CI), Intra-subject CV for the 26 volunteers and separated gender.

## DISCUSSION

Ramipril has been determined in plasma and other biological fluids by several methods such as reversed-phase high-pressure liquid chromatography quantified by radioimmunoassay (LOQ 0.25 - 0.4 fmol/mL; RT 6 min) [2,3], gas chromatography-mass spectrometry (LOQ 10 ng/mL; RT 10 min) [6], UV spectrophotometry (LOQ 23000 ng/mL) [8], reversed-phase high-pressure liquid chromatography (LOQ 500 ng/mL; RT 8.5-30 min) [9], polarography (LOQ 20 ng/mL) [7], high-pressure liquid chromatography coupled with UV detection (LOQ 180 ng/mL RT 7.36 min) [10] and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LOQ 0.5ng/mL RT 1.0-1.5 min for both ramipril and ramiprilat) [11]. Our method has a suitable LOQ (0.2 ng/mL, 1 ng/mL ramipril and ramiprilat) sufficient for bioequivalence study and can be performed in a short time (RT 2.1, 1.6 min for ramipril and ramiprilat, respectively), employing a high yield solid-phase extraction (mean recovery 93.4%).

After the oral administration of the ramipril tablets, the observed ramipril and ramiprilat peak plasma concentration ( $C_{max}$ ) values and the time values ( $T_{max}$ ) were similar to those reported in the literature [12,13] and equivalent between the formulations (Table 2 and 3).

In addition, the calculated 90% CI for mean  $C_{max}$ ,  $AUC_{last}$  and  $AUC_{0-inf}$  Ramipril/Triatec<sup>®</sup> and Ramiprilat/Triatec<sup>®</sup> individual ratios were within the 80-125% interval defined by the US Food and Drug Administration [14,15], thus establishing the bioequivalence of the two formulations.

The intra-subject variation (% CV) for both  $C_{max}$  and AUCs ratios were lower for the active metabolite, as expected in bioequivalence studies, confirming that the parent compounds are more discriminative to establish bioequivalence. Indeed, the FDA

requirements for measurement of the active moiety (when the metabolite is the active moiety) are only for support of the bioequivalence study.

## **CONCLUSION**

Since the 90% CI for  $C_{\max}$  and  $AUC_{\text{last}}$  ratios were all inside the 80-125% interval proposed by the US Food and Drug Administration Agency, it was concluded that ramipril formulation elaborated by Laboratórios Biosintética, Brazil is bioequivalent to Triatec<sup>®</sup> formulation for both the rate and the extent of absorption [14,15].

## REFERENCES

- 1- *Becker, R.H., Scholkens, B. A., Metzger, M., Schulze, K.J., Pharmacological properties of the new orally active angiotensin converting enzyme inhibitor 2-[N- [(S) - 1 - ethoxycarbonyl- 3- phenylpropyl] - L- alanyl] - (1S, 3S, 5S)-2-azabicyclo [3.3.0] octane-3-carboxylic acid (Hoe 498). Arzneimittelforschung. 34:1411- 6 (1984)*
- 2- *Nussberger, J., Brunner, D.B., Waeber, B., Brunner, H.R., True versus immunoreactive angiotensin II in human plasma. Hypertension.:7:11-7 (1985)*
- 3- *Campbell, D.J., Kladis, A., Duncan, A.M.,Nephrectomy, converting enzyme inhibition, and angiotensin peptides., Hypertension. 2:513-22 (1993)*
- 4- *Unger, T., Moursi, M., Ganten, D., Hermann, K., Lang, R.E.,Antihypertensive action of the converting enzyme inhibitor perindopril (S9490-3) in spontaneously hypertensive rats: comparison with enalapril (MK421) and ramipril (Hoe498). J Cardiovasc Pharmacol. 8:276-85 (1986)*
- 5- *Verho,M., Luck, C., Stelter, W.J., Rangoonwala, B.,Bender,N., Pharmacokinetics metabolism and biliary and urinary excretion of oral ramipril in man. Curr Med Res Opin.13:264-73 (1995)*
- 7- *Al-Majed, A,A., Belal, F., Abadi, A., Al-Obaid, A,M..The voltammetric study and determination of ramipril in dosage forms and biological fluids. Farmaco. 55:233-8 2000*
- 8- *Bonazzi, D.,, Gotti, R., Andrisano, V., Cavrini, V., Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). J Pharm Biomed Anal. 16:431-8 (1997)*
- 9- *Hogan, B,L., Williams, M., Idiculla, A., Veysoglu, T.,Parente, E.,Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of the related substances of ramipril in Altace capsules. J Pharm Biomed Anal. 23:637-51 ( 2000)*

- 10- *Belal, F., Al-Zaagi, I.A., Gadkariem, E, A., Abounassif, M, A.,* **A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. J Pharm Biomed Anal. 24:335-42 2001**
- 11- *Zhu, Z., Vachareau, A., Neirinck, L.,* **Liquid chromatography-mass spectrometry method for determination of ramipril and its active metabolite ramiprilat in human plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 779:297- 306 (2002)**
- 12- *Lee, I.D., Hunt, T.L., Bradley, C.R., Copp, C., Griffiths, L., Brobst-Kromer.,* **Effects on the pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly of coadministering ramipril with water, apple juice, and applesauce. J. Pharm Res.13:639-42 (1996)**
- 13- *Van, Griensven, J.M., Schoemaker, R.C., Cohen, A.F., Luus, H.G., Seibert-Grafe, M., Rothig, H.J.,* **Pharmacokinetics, pharmacodynamics and bioavailability of the ACE inhibitor ramipril. Eur J Clin Pharmacol. 47:513-8 (1995)**
- 14- *Food and Drug Administration.* **In vivo bioequivalence guidances. Pharmacopeial 19:6501-6508 (1993)**
- 15- *Food and Drug Administration.* **Bioavailability and bioequivalence requirements; abbreviated applications; proposed revisions-FDA. Proposed rule. Fed. Regist. 63: 64 222–64 228 (1998)**

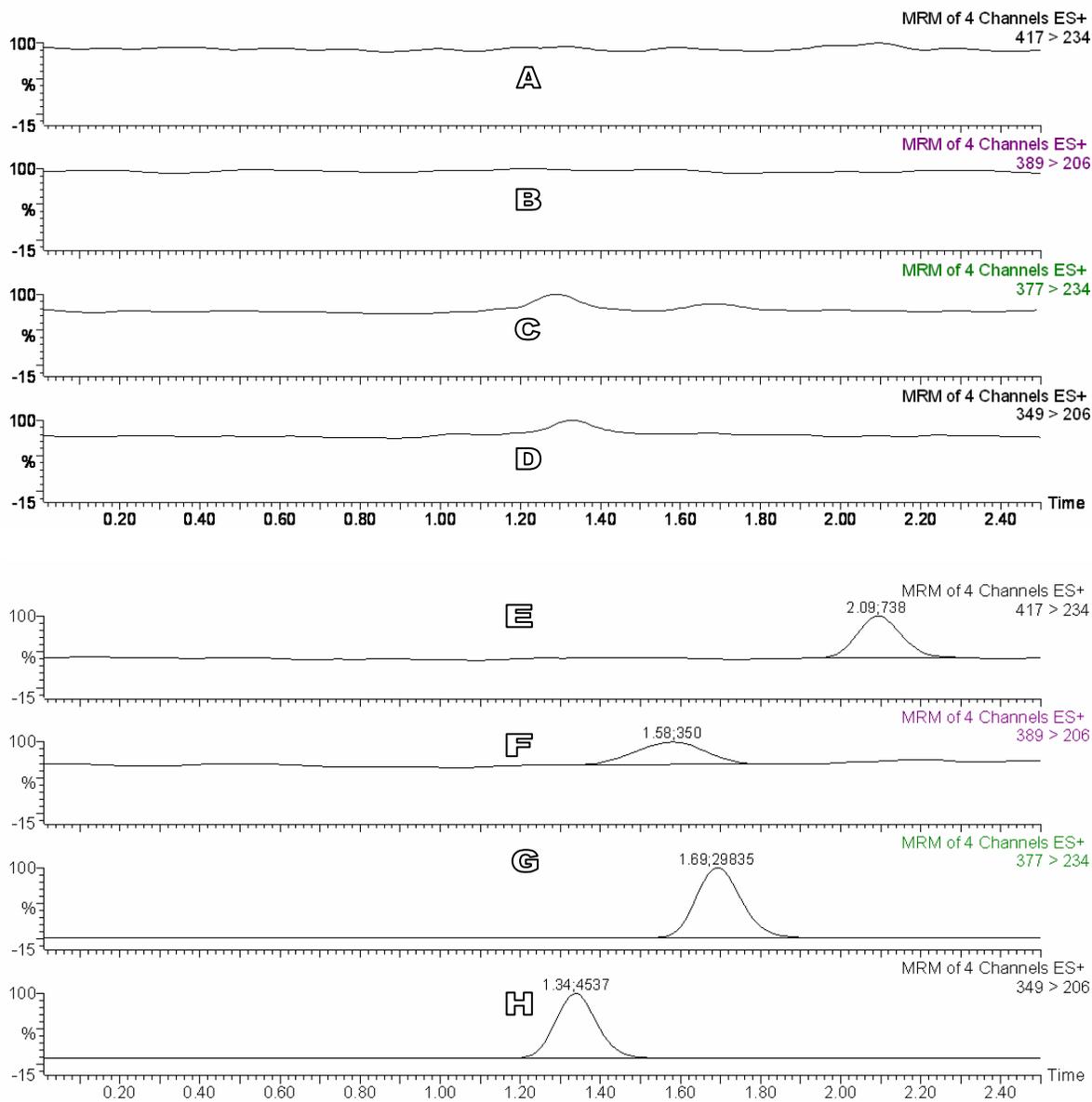
**Figure 1-** Selected ion chromatograms (MRM) of 2 channels ES+. 1A: blank human plasma for monitoring the transitions 417.00 > 234.0, 389.00 > 206.00, 377.00 > 234.0 and 349.00 > 206.0 for ramipril, ramiprilat, enalapril maleate and enalaprilat, respectively. The peaks illustrate the retention time and integrated area.

**Figure 2-** Mean concentrations vs. time curve for ramipril and ramiprilat.

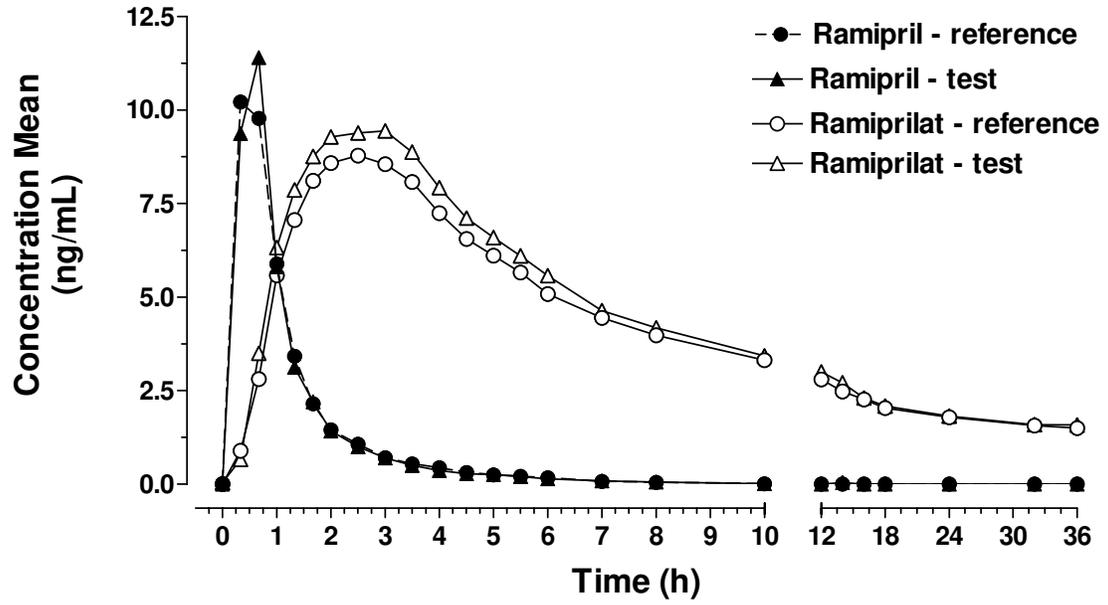
**Table 1-** Quantified concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of individual samples for intra-batch and inter-batch validation.

**Table 2-** Mean pharmacokinetic parameters obtained from volunteers after oral administration of 5 mg Ramipril tablets.

**Table 3-** Geometric mean of the individual  $C_{\text{max}}$ ,  $AUC_{\text{last}}$ ,  $AUC_{\text{inf}}$ , (test/reference formulation), the respective 90% confidence intervals (CI) and Intra-subject CV and for each gender.



**Figure 1-** MRM chromatograms of blank normal human plasma: **(A)** ramipril, **(B)** ramiprilat, **(C)** enalapril and **(D)** enalaprilat; MRM chromatogram of the LOQ: **(E)** ramipril, **(F)** ramiprilat, **(G)** enalapril and **(H)** enalaprilat.



**Figure 2-** Ramipril and ramiprilat plasma mean concentrations vs. time profile obtained after the single oral administration of 5 mg of ramipril formulation.

**Table 1-** Accuracy and precision data for ramipril and ramiprilat from the pre-study validation in human plasma.

<b>Intra-batch - Ramipril</b>				
<b>Nominal concentration (ng.mL-1)</b>	<b>0.2</b>	<b>0.6</b>	<b>4.0</b>	<b>40.0</b>
<b>Mean</b>	0.22	0.63	4.32	42.54
<b>Range</b>	0.20 - 0.24	0.57 - 0.68	4.14 - 4.41	40.50 - 45.00
<b>Accuracy (%)</b>	111.69	104.96	107.91	106.34
<b>Precision (%)</b>	5.29	5.51	2.08	3.79
<b>Inter-batch - Ramipril</b>				
<b>Nominal concentration (ng.mL-1)</b>	<b>0.2</b>	<b>0.6</b>	<b>4.0</b>	<b>40.0</b>
<b>Mean</b>	0.21	0.61	3.95	39.57
<b>Range</b>	0.18 - 0.24	0.52 - 0.68	3.45 - 4.41	32.60 - 45.00
<b>Accuracy (%)</b>	105.56	100.86	98.67	98.92
<b>Precision (%)</b>	8.33	7.00	7.48	7.30
<b>Intra-batch - Ramiprilat</b>				
<b>Nominal concentration (ng.mL-1)</b>	<b>1.0</b>	<b>3.0</b>	<b>9.0</b>	<b>16.0</b>
<b>Mean</b>	1.20	3.04	9.31	16.8
<b>Range</b>	1.15 - 1.25	2.85 - 3.21	8.83 - 9.76	16.10 - 17.50
<b>Accuracy (%)</b>	119.50	101.42	103.40	105.08
<b>Precision (%)</b>	2.79	4.22	3.24	2.47
<b>Inter-batch - Ramiprilat</b>				
<b>Nominal concentration (ng.mL-1)</b>	<b>1.0</b>	<b>3.0</b>	<b>9.0</b>	<b>16.0</b>
<b>Mean</b>	1.14	3.02	9.24	16.7
<b>Range</b>	1.02 - 1.25	2.82 - 3.21	8.52 - 9.76	15.50 - 17.60
<b>Accuracy (%)</b>	113.96	100.58	102.63	104.48
<b>Precision (%)</b>	5.38	3.78	2.72	3.56

**Table 2-** Mean pharmacokinetic parameters obtained from 26 volunteers after administration of each 5 mg ramipril tablet formulation.

		Analite									
		Triatec					Ramipril				
		Mean	S.D. ( $\pm$ )	CV (%)	Min	Max	Mean	S.D. ( $\pm$ )	CV (%)	Min	Max
<b>Tmax</b>	<b>(h)</b>	0.53	0.24	45.78	0.33	1.00	0.57	0.21	36.36	0.33	1.00
<b>Tlast</b>	<b>(h)</b>	5.88	1.77	30.20	3.00	10.00	6.42	2.44	38.02	2.00	14.00
<b>T 1/2</b>	<b>(h)</b>	1.46	0.74	50.83	0.54	3.61	1.83	1.35	73.99	0.29	5.18
<b>Ke</b>	<b>(1/h)</b>	0.60	0.30	49.18	0.19	1.29	0.61	0.49	80.91	0.13	2.40
<b>Cmax</b>	<b>(ng/mL)</b>	12.82	5.87	45.84	4.68	26.60	13.00	4.99	38.40	5.22	22.40
<b>Clast</b>	<b>(ng/mL)</b>	0.28	0.08	30.12	0.21	0.53	0.29	0.16	56.48	0.20	0.99
<b>AUClast</b>	<b>(ng*h/mL)</b>	12.77	5.09	39.83	5.35	22.25	12.84	4.58	35.70	4.27	26.31
<b>AUCall</b>	<b>(ng*h/mL)</b>	13.16	5.20	39.54	5.57	22.89	13.28	4.69	35.33	4.53	27.20
<b>AUCinf</b>	<b>(ng*h/mL)</b>	13.33	5.15	38.60	6.53	23.07	13.17	5.44	41.30	0.00	27.13
		Metabolite									
		Triatec					Ramipril				
		Mean	S.D. ( $\pm$ )	CV (%)	Min	Max	Mean	S.D. ( $\pm$ )	CV (%)	Min	Max
<b>Tmax</b>	<b>(h)</b>	3.35	2.00	59.77	1.33	10.00	3.05	1.11	36.37	1.33	6.00
<b>Tlast</b>	<b>(h)</b>	35.84	0.81	2.25	32.05	36.03	36.00	0.00	0.01	36.00	36.02
<b>T 1/2</b>	<b>(h)</b>	36.59	14.34	39.18	13.30	80.64	32.09	16.08	50.11	11.65	75.66
<b>Ke</b>	<b>(1/h)</b>	0.02	0.01	45.30	0.01	0.05	0.03	0.01	50.17	0.01	0.06
<b>Cmax</b>	<b>(ng/mL)</b>	9.81	6.34	64.62	2.29	33.60	10.45	5.80	55.49	3.71	28.60
<b>Clast</b>	<b>(ng/mL)</b>	1.54	0.22	14.47	1.07	2.01	1.58	0.21	13.08	1.15	2.00
<b>AUClast</b>	<b>(ng*h/mL)</b>	105.95	25.22	23.80	60.10	195.96	112.18	21.70	19.34	76.78	179.00
<b>AUCall</b>	<b>(ng*h/mL)</b>	106.21	25.28	23.80	60.14	196.35	112.38	21.76	19.36	76.96	179.32
<b>AUCinf</b>	<b>(ng*h/mL)</b>	187.02	42.78	22.87	122.74	308.56	184.48	39.56	21.44	114.52	252.57

**Table 3-** Geometric mean of the individual  $AUC_{last}$ ,  $AUC_{inf}$ , and  $C_{max}$  ratios (test/reference formulation), the respective 90% confidence intervals (CI) and CV.

Triatec®/Ramipril 5 mg (n = 24)	Ramipril			Ramiprilat		
	Parametric			Parametric		
	Geom. Mean	90% CI	Intra subject CV%	Geom. Mean	90% CI	Intra subject CV%
$AUC_{last}$	102.49	92.76 – 113.25	19.57	105.88	101.56 – 110.39	7.92
$AUC_{inf}$	103.60	93.56 – 114.73	19.79	97.30	90.17 – 104.99	15.71
$C_{max}$	104.69	93.21 – 117.59	22.31	108.48	98.86 – 119.04	17.21
Triatec®/Ramipril 5 mg (Man; n = 11)	Ramipril			Ramiprilat		
	Parametric			Parametric		
	Geom. Mean	90% CI	Intra subject CV%	Geom. Mean	90% CI	Intra subject CV%
$AUC_{last}$	114.39	95.43 - 137.12	19.50	104.39	98.85 - 110.26	6.43
$AUC_{inf}$	116.44	96.85 - 139.99	19.47	96.17	84.17 - 109.89	17.05
$C_{max}$	116.55	97.75 - 138.98	18.58	110.90	98.72 - 124.58	12.91
Triatec®/Ramipril 5 mg (Woman; n = 13)	Ramipril			Ramiprilat		
	Parametric			Parametric		
	Geom. Mean	90% CI	Intra subject CV%	Geom. Mean	90% CI	Intra subject CV%
$AUC_{last}$	93.06	82.74 - 104.67	17.88	105.63	98.99 - 112.7	8.69
$AUC_{inf}$	93.60	83.04 - 105.50	18.10	98.52	88.21 - 110.04	15.88
$C_{max}$	96.22	80.79 - 114.61	25.71	103.86	89.48 - 120.54	20.30