

DANIEL ROSSI DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO IN VITRO – IN VIVO DE DUAS
FORMULAÇÕES DE PANTOPRAZOL:
estudos farmacocinéticos e perfis de dissolução
em meios biorelevantes**

CAMPINAS

Unicamp

2008

DANIEL ROSSI DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO IN VITRO – IN VIVO DE DUAS
FORMULAÇÕES DE PANTOPRAZOL:
estudos farmacocinéticos e perfis de dissolução
em meios biorelevantes**

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

Orientador: Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C157a Campos, Daniel Rossi de
Avaliação in vitro – in vivo de duas formulações de pantoprazol:
estudos farmacocinéticos e perfis de dissolução em meios
biorelevantes / Daniel Rossi de Campos. Campinas, SP : [s.n.],
2008.

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

1. Bioequivalência. 2. Biodisponibilidade. 3. Pesquisa médica. I.
Pedrazzoli Júnior, José. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : “In vitro – in vivo evaluation of two pantoprazole
formulations: pharmacokinetic studies and dissolution profiles in
biorelevant media”**

Keywords: • Bioequivalence
• Biodisponibility
• Biomedical research

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

**Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior
Prof. Dr. Silvia Storpirtis
Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Piccinini
Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno**

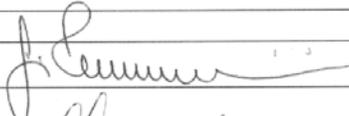
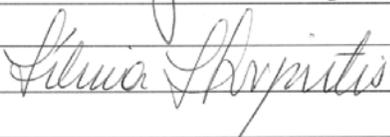
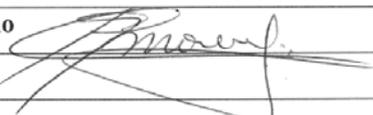
Data da defesa: 04-12-2008

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Daniel Rossi de Campos

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). José Pedrazzoli Júnior



Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Rosângela Gonçalves Piccinini	
Professor (a) Doutor (a) Silvia Storpirtis	
Professor (a) Doutor (a) Carmen Silvia Bertuzzo	
Professor (a) Doutor (a) Ronilson Agnaldo Moreno	

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 04/12/2008

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus pais, **Euclides e Abigail**, que sempre me apoiaram e incentivaram para a conquista dessa titulação e a **Karina**, minha namorada, que completa a minha vida e me faz feliz.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof **Dr José Pedrazzoli Júnior**, pela orientação e confiança depositada à minha pessoa para a condução desse trabalho.

Ào Prof **Dr Ronilson Moreno e a Prof Dra Carmen Bertuzzo**, pelo valioso apoio e comentários no Exame de Qualificação.

À Prof **Dra Sandra Klein**, pela condução dos ensaios no aparato 3 e pela co-orientação na condução dos estudos *in vitro*.

À Profa **Dra Silvia Storpirtis**, por ter me conduzido para os caminhos da Biofarmácia e pela oportunidade de trabalho na ANVISA.

À Profa **Dra Rosângela G. Peccinini**, minha eterna mentora na área de Farmacocinética.

Aos professores da Pós-Graduação em Farmacologia, pela oportunidade de aprimoramento.

Aos amigos Marco, Tagliane, Nelson, Paula, Gilberto e Edvaldo pelas risadas e apoio nas horas difíceis.

Aos funcionários da UNIFAG – USF pela ajuda da condução desse estudo.

Aos meus amigos de São Carlos pela amizade e companheirismo.

Aos voluntários que gentilmente participaram desse estudo.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

“O único lugar em que o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”.

(Albert Einstein)

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxiii</i>
ABSTRACT	xxxvii
1- INTRODUÇÃO	41
1.1- Equivalência Terapêutica	44
1.1.1- Etapa Biofarmacêutica.....	45
1.1.2- Etapa Farmacocinética.....	47
1.1.3- Etapa Farmacodinâmica.....	49
1.2- Registro de Medicamentos Genéricos	51
1.2.1- Equivalência Farmacêutica e Perfil de Dissolução.....	52
1.2.2- Estudo de Bioequivalência.....	57
1.3- Classificação Biofarmacêutica	60
1.4- Correlação In Vitro – In Vivo (IVIVR)	65
1.5- Pantoprazol	67
1.5.1- Farmacocinética.....	68
1.5.2- Farmacodinâmica.....	69
1.5.3- Estudos Biofarmacêuticos.....	71
2- OBJETIVOS	73
3- MATERIAL E MÉTODOS	77
3.1- Material	79
3.1.1- Formulações.....	79
3.1.2- Ensaio de Dissolução.....	79
3.1.3- Estudos de Bioequivalência.....	80

3.2- Métodos	80
3.2.1- Ensaio de Dissolução.....	80
3.2.2- Estudos de Bioequivalência.....	82
3.2.2.1- Etapa Clínica.....	82
3.2.2.1.1- Estudos de Bioequivalência em jejum.....	82
3.2.2.1.2- Estudos de Bioequivalência pós-prandial..	84
3.2.2.2- Etapa Analítica.....	85
3.2.2.3- Etapa Estatística.....	86
3.2.3- Classificação Biofarmacêutica Provisional.....	87
3.2.4- Relação In Vitro – In Vivo (IVIVR).....	88
4- RESULTADOS	89
4.1- Estudos de Dissolução	91
4.1.1- Perfis de Dissolução em meios biorelevantes empregando aparato 2 (USP).....	91
4.1.2- Perfis de Dissolução em meios biorelevantes empregando aparato 3 (USP).....	92
4.2- Estudos de Bioequivalência	97
4.2.1- Estudos de Bioequivalência em jejum.....	97
4.2.2- Estudos de Bioequivalência pós-prandial.....	99
4.3- Relação In Vitro – In Vivo (IVIVR)	101
4.4- Classificação Biofarmacêutica Provisional	105
5- DISCUSSÃO	109
6- CONCLUSÃO	123
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
8- ANEXOS	141

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

IVIVR	Relação in vitro – in vivo
IVIVC	Correlação in vitro – in vivo
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em série
FaSSIF	Fasted State Simulated Intestinal Fluid
FeSSIF	Fed State Simulated Intestinal Fluid
USP	Farmacopéia Americana
Log P	Lipossolubilidade
Fa	Fração absorvida
Fd	Fração dissolvida
C_{max}	Concentração Máxima
T_{max}	Tempo necessário para atingir a concentração máxima
t_{1/2}	Tempo de meia-vida de eliminação
AUC_{0-t}	Área sob a curva de zero a t
AUC_{0-inf}	Área sob a curva de zero ao infinito
FDA	Food and Drug Administration
EMA	European Medicines Agency
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
rpm	Rotações por minuto
IC 90%	Intervalo de confiança 90%
f2	Fator de similaridade
f1	Fator de diferença

BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
CV	Coeficiente de variação
Do	Número de dose
F	Biodisponibilidade
CaCo-2	Células de adenocarcinoma de colón humano
Peff	Permeabilidade

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Valores de pH gástricos e das diferentes regiões anatômicas do intestino delgado em jejum e pós-prandial.....	47
Tabela 2- Composição dos meios biorrelevantes FaSSIF e FESSIF.....	55
Tabela 3- Equações modelo dependentes de primeira ordem, Weibull e Higuchi.....	82
Tabela 4- Composição da dieta hipercalórica utilizada no estudo de bioequivalência pós-prandial.....	85
Tabela 5- Parâmetros de similaridade (f2) e diferença (f1) obtidos após comparação dos perfis de dissolução das formulações teste e referência em meios biorrelevantes (FaSSIF e FeSSIF) no aparato 2 (USP).....	92
Tabela 6- Modelagem dos perfis de dissolução obtidos em meios biorrelevantes (FaSSIF e FeSSIF) em aparato 3 (USP) para a formulação referência. Foram empregados modelos dependentes de Primeira Ordem, Weibull e Higuchi.....	94
Tabela 7- Modelagem dos perfis de dissolução obtidos em meios biorrelevantes (FaSSIF e FeSSIF) em aparato 3 (USP) para a formulação teste. Foram empregados modelos dependentes de Primeira Ordem, Weibull e Higuchi.....	94
Tabela 8- Parâmetros farmacocinéticos do fármaco pantoprazol (formulações referência e teste) após administração em dose única em jejum.....	98

Tabela 9-	Análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos médios obtidos dos 28 voluntários para as formulações referência e teste de pantoprazol após administração em dose única em jejum.....	99
Tabela 10-	Parâmetros farmacocinéticos do fármaco pantoprazol (formulações referência e teste) após administração em dose única pós-prandial.....	100
Tabela 11-	Análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos médios obtidos dos 70 voluntários para as formulações referência e teste de pantoprazol após administração em dose única pós-prandial.....	101
Tabela 12-	Parâmetros físico-químicos e biofarmacêuticos para os fármacos pantoprazol (classe 3 – provisional) e metoprolol (classe 1).....	105

	PÁG.
Figura 1- Representação esquemática dos diversos aspectos da disponibilização do fármaco para efeito sistêmico. ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção.....	44
Figura 2- Principais equações empregadas para a análise do comportamento do fármaco e determinação dos parâmetros farmacocinéticos após administração intravascular.....	48
Figura 3- Principais equações empregadas para a análise do comportamento do fármaco e determinação dos parâmetros farmacocinéticos após administração extravascular.....	49
Figura 4- Concentração plasmática versus tempo de duas formulações contendo digoxina (0.25 ug). Formulação digoxina e cremophor (■) e formulação padrão de digoxina (♣).....	50
Figura 5- Prolongamento do período PR do eletrocardiograma. Formulação digoxina e cremophor (■) e formulação padrão de digoxina (♣).....	51
Figura 6- Principais aparatos farmacopéicos. Aparato 2 (pá) e Aparato 1 (cesto).....	53
Figura 7- Dissolutor com 8 cubas apresentando o aparato 2 (pá).....	53
Figura 8- Perfil de dissolução entre duas formulações denominadas referência e teste.....	54

Figura 9-	Dissolutor com 42 cubas denominado aparato 3 – Bio Dis.....	56
Figura 10-	Classes de fármacos de acordo com a Classificação Biofarmacêutica – BCS.....	61
Figura 11-	Correlação entre valores de Log P e permeabilidade (Peff) para diferentes fármacos.....	64
Figura 12-	Correlação in vitro – in vivo linear do nível A.....	66
Figura 13-	Correlação in vitro – in vivo não-linear do nível A.....	67
Figura 14-	Estrutura química do fármaco pantoprazol.....	68
Figura 15-	Mecanismo de ação do Pantoprazol.....	70
Figura 16-	Perfil de Dissolução entre as formulações referência e teste de pantoprazol em meio biorrelevante (FaSSIF) empregando-se o aparato 2 (USP).....	91
Figura 17-	Perfil de Dissolução entre as formulações referência e teste de pantoprazol em meio biorrelevante (FeSSIF) empregando-se o aparato 2 (USP).....	92
Figura 18-	Perfil de Dissolução entre as formulações referência e teste de pantoprazol em meio biorrelevante (FaSSIF) empregando-se o aparato 3 (USP).....	93
Figura 19-	Perfil de Dissolução entre as formulações referência e teste de pantoprazol em meio biorrelevante (FeSSIF) empregando-se o aparato 3 (USP).....	93
Figura 20-	Perfil de Dissolução da formulação referência em meio biorrelevante (FaSSIF) empregando-se o aparato 3 (observado) e curvas de modelagens empregando-se Weibull, Primeira Ordem e Higuchi.....	95

Figura 21-	Perfil de Dissolução da formulação referência em meio biorrelevante (FeSSIF) empregando-se o aparato 3 (observado) e curvas de modelagens empregando-se Weibull, Primeira Ordem e Higuchi.....	96
Figura 22-	Perfil de Dissolução da formulação teste em meio biorrelevante (FaSSIF) empregando-se o aparato 3 (observado) e curvas de modelagens empregando-se Weibull, Primeira Ordem e Higuchi.....	96
Figura 23-	Perfil de Dissolução da formulação teste em meio biorrelevante (FeSSIF) empregando-se o aparato 3 (observado) e curvas de modelagens empregando-se Weibull, Primeira Ordem e Higuchi.....	97
Figura 24-	Concentração plasmática versus tempo das formulações referência e teste de pantoprazol após administração em dose única em jejum.....	98
Figura 25-	Concentração plasmática versus tempo das formulações referência e teste de pantoprazol após administração em dose única pós-prandial.....	100
Figura 26-	Fração absorvida versus tempo obtida por meio de deconvolução por Wagner Nelson após administração das formulações teste e referência em jejum.....	101
Figura 27-	Fração absorvida versus tempo obtida por meio de deconvolução por Loo Riegelman após administração das formulações teste e referência pós-prandial.....	102
Figura 28-	Frações absorvidas versus tempo da formulação teste após administração em jejum e pós-prandial.....	102
Figura 29-	Frações absorvidas versus tempo da formulação referência após administração em jejum e pós-prandial.	103

Figura 30-	Relação In Vitro – In Vivo (IVIVR) das formulações de pantoprazol em jejum.....	104
Figura 31-	Relação In Vitro – In Vivo (IVIVR) das formulações de pantoprazol pós-prandial.....	104
Figura 32-	Correlações entre os dados de permeabilidade (P_{eff}) e lipossolubilidade ($\log P$) para os fármacos pantoprazol (Classe 3), cimetidina (classe 3) e metoprolol (Classe 1).....	106
Figura 33-	Correlações entre os dados de fração absorvida (F_a) e lipossolubilidade ($\log P$) para os fármacos pantoprazol (Classe 3), cimetidina (Classe 3) e metoprolol (Classe 1).....	107

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi comparar o comportamento *in vivo* e *in vitro* de duas formulações de pantoprazol. Além disso, foi proposta a classificação biofarmacêutica provisional do fármaco, bem como uma correlação *in vitro* – *in vivo* não linear (IVIVR).

Os estudos *in vivo* foram conduzidos em dose única em jejum (n=28) e pós-prandial (n=62) com desenho cruzado e randomizado. As concentrações plasmáticas de pantoprazol foram determinadas por LC-MS/MS. Os parâmetros farmacocinéticos e a deconvolução dos dados de concentração plasmática versus tempo foram obtidos empregando-se o programa WinNonlin 5.2 – IVIVC toolkit (Pharsight, EUA). Os perfis de dissolução foram avaliados em meios biorelevantes (FaSSIF e FeSSIF) nos aparatos USP 2 e 3 e as curvas de dissolução foram comparadas considerando os cálculos de f2 ou modelos dependentes. Os valores da solubilidade, Log P e cLog P do pantoprazol foram obtidos do Merck Index (Whitehouse Station, EUA) e do programa ChemDraw Ultra 10.0 (Cambridgesoft, EUA). Os dados de permeabilidade do pantoprazol foram obtidos do programa ADMET Predictor (Simulations Plus, EUA). A classificação biofarmacêutica provisional do pantoprazol foi proposta considerando o fármaco metoprolol como referência. A IVIVR foi estabelecida entre as frações dissolvidas (F_d), dos ensaios no aparato 2, com as frações absorvidas dos estudos *in vivo*.

Para o estudo em jejum os valores dos intervalos de confiança 90% para os parâmetros C_{max} (0.94-1.03) e ASC_{0-t} (0.89-0.99) apresentaram-se dentro dos limites de confiança (0.8-1.25). Entretanto, os intervalos de confiança do estudo pós-prandial não se apresentaram dentro dos limites de confiança. Os perfis de dissolução nos aparatos USP 2 e 3 demonstraram a mesma disposição das formulações nos meios FaSSIF e FeSSIF, considerando o modelos de f2 e Weibull.

Os valores de solubilidade, Log P e permeabilidade para o fármaco pantoprazol obtidos *in silico* permitiram a classificação do fármaco como de alta solubilidade e baixa permeabilidade. A IVIVR não linear obtida para as formulações de pantoprazol indicaram que a permeabilidade é fator limitante para a absorção.

Enfim, os perfis de dissolução no meio biorelevante FaSSIF, nos aparatos USP 2 e 3, puderam ser empregados para prever o comportamento *in vivo* das formulações. O pantoprazol foi classificado como um fármaco classe III e a IVIVR não-linear obtida confirma a classificação biofarmacêutica provisional. Além disso, pôde-se sugerir a bioisenção para formulações de pantoprazol com base nos resultados dos estudos de dissolução em meios biorelevantes e na conhecida segurança e tolerabilidade desse fármaco.

Palavras-chave: pantoprazol, bioequivalência, meios biorelevantes, classificação biofarmacêutica, correlação *in vitro* – *in vivo*.

ABSTRACT

The purpose of the study was to compare the *in vivo* and *in vitro* behaviour of pantoprazole formulations. Moreover, a provisional biopharmaceutical classification of the drug (BCS) was proposed as well as a non-linear *in vitro* – *in vivo* relationship (IVIVR).

The *in vivo* studies were conducted under single dose in fasting (n=28) and fed conditions (n=62) and randomized crossover design. Plasma concentrations of pantoprazole were determined by LC-MS/MS. Pharmacokinetic parameters and deconvolution data were calculated from the observed plasma-concentration time profiles by WinNonlin 5.2 - IVIVC toolkit (Pharsight, USA). Dissolution profiles were evaluated in biorelevant media (FaSSIF and FeSSIF) in USP apparatus 2 and 3 and the dissolution curves were compared to either f_2 values or model-independent approach. The solubility, Log P and cLogP data of pantoprazole were obtained from Merck Index (Whitehouse Station, USA) and ChemDraw Ultra 10.0 (Cambridgesoft, USA). The permeability data of pantoprazole were calculated by ADMET Predictor (Simulations Plus, USA). The provisional biopharmaceutical classification of pantoprazole was proposed considering metoprolol as a reference drug. The IVIVR analysis was evaluated considering the dissolved drug fraction (F_d) from apparatus 2 and the absorbed drug fraction (F_a) from the *in vivo* studies.

Under fasting condition the 90% C.I for C_{max} (0.94-1.03) and AUC_{0-t} (0.89-0.99) were within the range of bioequivalence (0.8-1.25). However, the results of the fed study were not within the BE range. The dissolution profiles in USP apparatus 2 and 3 demonstrated a similar disposition of both formulations in FaSSIF and FeSSIF media considering f_2 and Weibull's models.

The solubility, Log P and permeability values of pantoprazole obtained by *in silico* evaluation allowed the classification of pantoprazole as a highly soluble and low permeability drug. The non-linear IVIVR obtained for the pantoprazole formulations indicated that absorption of pantoprazole is limited by permeability.

In conclusion, the dissolution profiles in the biorelevant medium (FaSSIF) on both USP apparatus 2 and 3 may be used as a tool to predict the *in vivo* disposition of the formulations. Pantoprazole was classified as a class III drug (BCS)

corroborated by the non-linear IVIVR study to support this provisional classification. Furthermore, biowaiver may be granted for pantoprazole formulations on the basis of in vitro dissolution results in biorelevant media and the data available in the literature concerning high tolerability and safety of the drug.

Key words: pantoprazole, bioequivalence, biorelevant media, biopharmaceutical classification system, *in vitro* – *in vivo* correlation.

1- INTRODUÇÃO

A melhoria da qualidade de vida é o objetivo maior de ações governamentais e de ordem privada que visam garantir o maior acesso da população a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade. Tal prerrogativa é apresentada pelo conceito de Política de Medicamentos preconizada pela Organização Mundial da Saúde desde 1975, na 28ª Conferência Mundial de Saúde. A partir da promulgação da lei 8080/90, o Brasil estabeleceu a necessidade da criação de uma Política Nacional de Medicamentos, a qual foi efetivada pela portaria 3.916 de 1998 (DIAS, 2003).

Assim, dando continuidade as diretrizes de promoção de uso racional de medicamentos foi estabelecida a Política de Medicamentos Genéricos pela Lei 9.787, de 10 de fevereiro de 1999 (BRASIL, 1999a). Tal normativa representou um importante avanço sanitário visto que permitiu o estabelecimento de aspectos técnicos para a realização de estudos *in vitro* (equivalência farmacêutica) e *in vivo* (bioequivalência) que garantissem a equivalência terapêutica de formulações farmacêuticas registradas, a partir de então, como medicamentos genéricos (BRASIL, 1999b).

Desta forma, buscando a melhoria de aspectos técnicos que permitissem ao Brasil apresentar regulamentações comparáveis com as estabelecidas pela Food and Drug Administration (FDA), União Européia (EMEA) e Health Canadá para o registro de medicamentos genéricos, as resoluções foram constantemente revisadas. Na atualidade, a normativa que regulamenta os aspectos técnicos para o registro de medicamentos genéricos é a RDC 16, de 2 de março de 2007 (BRASIL, 2007a). Além disso, a partir de 2003, com a publicação das resoluções 133 (atualmente RDC 17, de 2 de março de 2008), 134 e 135 (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2003b), os conceitos técnicos aplicados aos medicamentos genéricos foram ampliados para o registro (ou renovação de registro) de, respectivamente, medicamentos similares e medicamentos novos.

Nos últimos anos, a busca de maneiras mais econômicas e que, principalmente, envolvam menor inclusão de voluntários ou pacientes para a avaliação do desempenho de novos fármacos e/ou novas formulações vem

crescendo impulsionadas pelo Conceito da Classificação Biofarmacêutica (AMIDON et al, 1995; FDA, 2000). A avaliação de formulações por meio de estudos *in vitro* (solubilidade, permeabilidade e perfil de dissolução) permitiria ainda mais a diminuição nos custos de desenvolvimento de medicamentos genéricos, similares e novos, e desta forma o acesso da população a medicamentos com o mesmo padrão de qualidade e segurança dos assegurados pelos estudos atuais (*in vivo*).

1.1- Equivalência Terapêutica

As respostas terapêuticas, determinadas por um fármaco administrado pela via gastrointestinal, dependem de componentes da formulação, de características físico-químicas do fármaco, da concentração plasmática gerada e pela ligação do fármaco ao receptor. Tais componentes são resumidos pelas etapas biofarmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica (Figura 1)

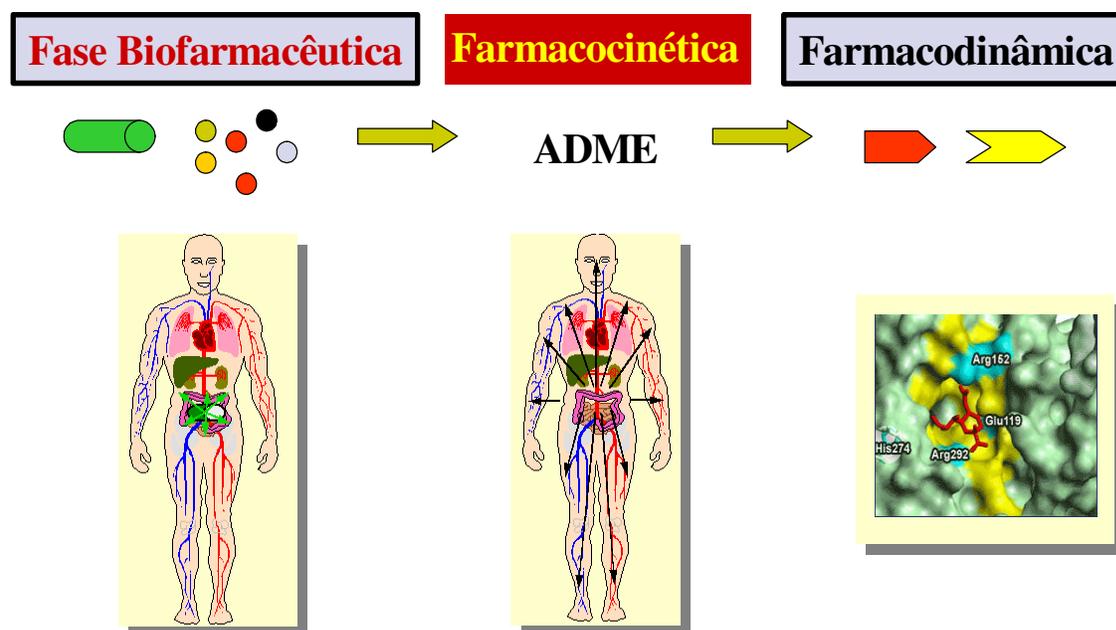


Figura 1- Representação esquemática dos diversos aspectos da disponibilidade do fármaco para efeito sistêmico. ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

Assim, para que duas formulações sejam definidas como equivalentes terapêuticas de acordo com a RDC 16, de 2 de março de 2007 (BRASIL, 2007a), essas devem apresentar os mesmos efeitos em relação a eficácia e segurança após a administração da mesma dose molar, sendo que tais efeitos são avaliados por meio de estudos de bioequivalência, ensaios farmacodinâmicos, ensaios clínicos e/ou estudos *in vitro*. Além disso, as formulações devem ser equivalentes farmacêuticas.

1.1.1- Etapa Biofarmacêutica

A etapa biofarmacêutica corresponde à liberação do fármaco da forma farmacêutica. Essa etapa disponibiliza o fármaco para a absorção (STORPIRTIS et al, 1999). A absorção de fármacos depende basicamente de fatores associados à forma farmacêutica e aos parâmetros físico-químicos do princípio ativo.

Em relação à forma farmacêutica, essa pode garantir a eficácia terapêutica de um determinado fármaco por liberá-lo em área anatômica específica do sistema digestivo como é o caso das formulações com revestimento gastro-resistentes utilizados para fármacos como omeprazol e pantoprazol, lábeis ao pH ácido do estômago (JUNGNICKEL, 2000). Além disso, revestimentos de formulações contendo o fármaco mesalazina são utilizados para permitir a liberação do fármaco somente no intestino grosso, tecido alvo para o tratamento da colite ulcerativa e/ou doença de Crohn (KLEIN et al, 2005).

Formulações de liberação modificada permitem que fármacos de meia-vida de eliminação curta possam ser administrados uma vez ao dia, já que determinam a liberação do fármaco da forma farmacêutica por meio de cinética de ordem zero, como é o caso do Adalat Oros[®] (SAKURAI et al, 2008). Além disso, formulações de liberação modificada podem determinar melhor tolerância à medicação, como é o caso do Efexor XR[®], que contém o fármaco venlafaxina, o qual se absorvido rapidamente, determina náuseas e vômitos (THASE, 1997).

Características físico-químicas dos fármacos como solubilidade e permeabilidade também são fatores determinantes para uma resposta terapêutica adequada. A absorção de um determinado fármaco depende de um balanço entre suas características de solubilidade e permeabilidade. Geralmente, na literatura internacional a lipossolubilidade é representada pelo parâmetro Log P (KASIM et al, 2006). Fármacos muito hidrossolúveis apresentam dificuldades para atravessar membranas biológicas e deste modo apresentam uma absorção incompleta, como é o caso do atenolol, metformina e alendronato (VOGELPOEL et al, 2004; ATANASOVA et al, 2003; APOSTOLOU et al, 2007). Entretanto, fármacos muito lipossolúveis também podem apresentar dificuldades para serem absorvidos já que apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, como é o caso da griseofulvina e glibenclamida (FUJIOKA et al, 2008; WEI et al, 2006). Além disso, tais fármacos também podem sofrer extenso metabolismo hepático, fato esse que pode comprometer a sua disponibilidade sistêmica, como é o caso do propranolol (VOGELPOEL et al, 2004).

Além dos dados relacionados à formulação e as características físico-químicas dos fármacos, as condições fisiológicas que determinam a absorção de uma determinada substância também devem ser consideradas. Após a administração oral, uma determinada formulação atinge primeiramente o estômago, o qual possui pH ao redor 2.0 em jejum e pH de 4.5 a 5.5 em situação pós-prandial (DRESSMAN et al, 1990). O tempo médio de esvaziamento gástrico em jejum é de 20 a 100 minutos e pós-prandial de até 300 minutos (DAVIS, 1986).

Após o esvaziamento gástrico a formulação atinge o intestino delgado, o principal tecido envolvido na absorção de fármacos. O intestino delgado apresenta uma área superficial de aproximadamente 200 m² (KLEIN, 2005). O intestino delgado é dividido em duodeno, jejuno e íleo. O duodeno tem comprimento de 20 a 30 cm (pH = 5.5 – 6.0), o jejuno de 150 a 250 cm (pH = 6.5) e o íleo de 200 a 350 cm (pH = 7.0). Assim, o processo de absorção de fármacos depende, além de processos fisiológicos (permeabilidade), das características de solubilidade da substância no sistema gastrointestinal. As características de

solubilidade principalmente de fármacos pouco solúveis podem ser alteradas devido ao pH do meio. Os trabalhos de FORD et al (2005) e YEH et al (1998) discutem o efeito da alteração do pH estomacal na absorção dos fármacos fosamprenavir e indinavir. Tais fármacos (bases fracas) apresentaram uma menor absorção após a administração de fármacos anti-ácidos, já o aumento do pH estomacal determinou a diminuição da solubilidade em água dessas substâncias. Os valores de pH do sistema gastrointestinal em jejum e pós-prandial são apresentados na Tabela 1 (DRESSMAN et al, 1998).

Tabela 1- Valores de pH gástricos e das diferentes regiões anatômicas do intestino delgado em jejum e pós-prandial de acordo com DRESSMAN et al (1998).

Local Anatômico	Jejum	Pós-prandial
Estômago	1.4 – 2.1	3.0 – 7.0
Duodeno	4.9 – 6.4	5.1 – 5.2
Jejuno	4.4 – 6.5	5.2 – 6.2
Íleo	6.5 – 8.0	6.8 – 8.0

1.1.2- Etapa Farmacocinética

A etapa farmacocinética descreve aspectos relacionados com a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco. A análise farmacocinética de uma curva de concentração plasmática versus tempo pode ser realizada por meio de modelo compartimental e não compartimental. A aplicação de modelos mono, bi e tri-compartimentais têm como objetivo a análise global do comportamento do fármaco *in vivo*. Assim, após a determinação da equação que descreve o comportamento do fármaco, são obtidos os parâmetros volume de distribuição (V_d), clearance (CL), meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$), constante de eliminação (k_{el}) e área sob a curva (AUC_{0-t} e AUC_{0-inf}). Caso, o fármaco tenha sido administrado pela via gastrointestinal (extravasular) também poderão ser obtidos os parâmetros constante de absorção (k_a), meia-vida de absorção ($t_{1/2a}$), concentração máxima (C_{max}) e tempo necessário para atingir a concentração

máxima (T_{max}). Além disso, caso o fármaco seja descrito por um modelo multi-compartimental também seriam calculados os parâmetros meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$) e meia-vida de eliminação terminal ($t_{1/2\gamma}$) (LE-BLANC et al, 1997).

Porém, quando o objetivo é apenas a análise dos parâmetros concentração máxima (C_{max}) e área sob a curva (AUC) pode-se empregar o modelo não-compartimental. Esse tipo de modelo é sugerido para a análise de dados obtidos de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência (BRASIL, 2006). As figuras 2 e 3 apresentam, respectivamente, as principais equações para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos após a administração intra e extravascular de um determinado fármaco.

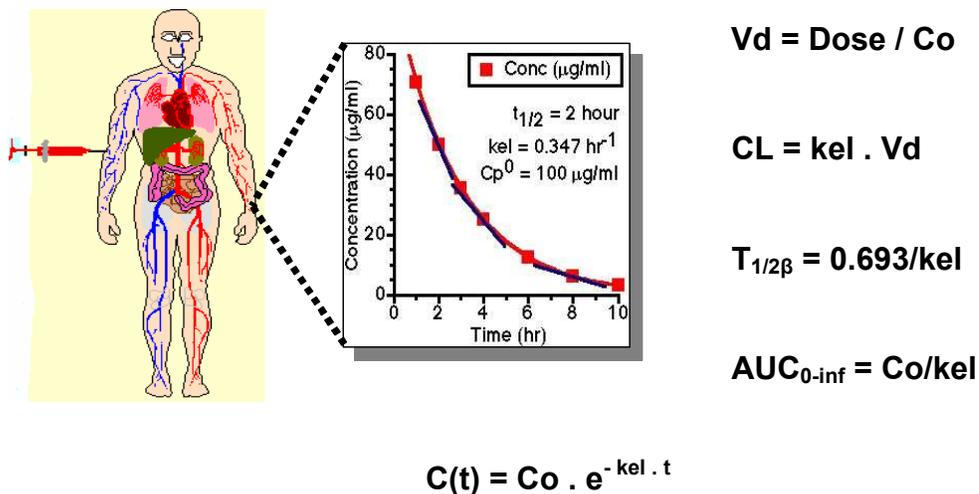
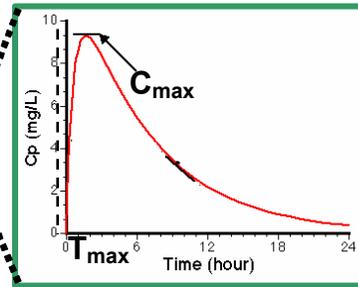
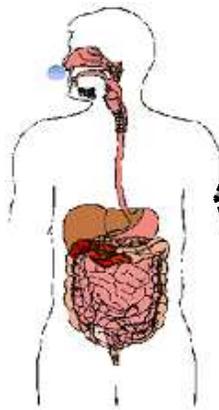


Figura 2- Principais equações empregadas para a análise do comportamento do fármaco e determinação dos parâmetros farmacocinéticos após administração intravascular. Sendo: Vd – volume de distribuição, CL – clearance, $T_{1/2}$ – meia-vida de eliminação, AUC – área sob a curva.



$$Vd = F \cdot \text{Dose} / AUC \cdot kel$$

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

$$T_{1/2\beta} = 0.693 / kel$$

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_f / kel$$

$$C(t) = \frac{ka \cdot F \cdot \text{Dose}}{Vd (ka - kel)} (e^{-kel \cdot t} - e^{-ka \cdot t})$$

Figura 3- Principais equações empregadas para a análise do comportamento do fármaco e determinação dos parâmetros farmacocinéticos após administração extravascular. Sendo: Vd – volume de distribuição, CL – clearance, $T_{1/2}$ – meia-vida de eliminação, AUC – área sob a curva.

1.1.3- Etapa Farmacodinâmica

A etapa farmacodinâmica corresponde ao resultado da interação de um princípio ativo com um receptor. Essa etapa refere-se a componente final responsável pela resposta terapêutica (FIGURA 1). Assim, alterações nas etapas biofarmacêutica e/ou farmacocinética podem determinar alterações na resposta farmacológica, tornando-a ineficaz ou tóxica (LE-BLANC et al, 1997).

O trabalho de TAYROUZ et al (2003) descreve a implicação das etapas biofarmacêutica e farmacocinética na resposta farmacodinâmica de 2 formulações contendo a mesma dosagem de digoxina. Uma das formulações continha como excipiente o tensoativo *cremophor* e a outra formulação não apresentava tal surfactante. A formulação com o tensoativo permitiu o aumento da solubilidade da digoxina e conseqüentemente rápida absorção, com concentração máxima acima

da faixa terapêutica (1-2 ng/mL) (GOODMAN, 2001). Assim, observou-se o prolongamento do período PR do eletrocardiograma, fato esse que caracteriza a possibilidade de uma intoxicação digitalica. As figuras 4 e 5 apresentam o resultado de tal excipiente na disposição cinética e na resposta farmacodinâmica da digoxina.

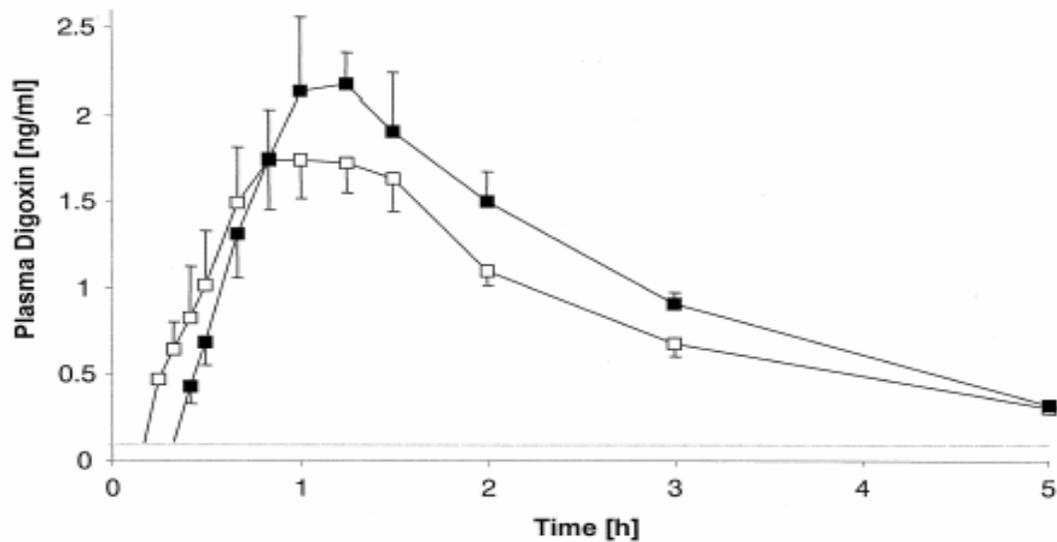


Figura 4- Concentração plasmática versus tempo de duas formulações contendo digoxina (0.25 ug). Formulação digoxina e cremophor (■) e formulação padrão de digoxina (□). As barras representam o erro padrão da média (TAYROUZ et al, 2003).

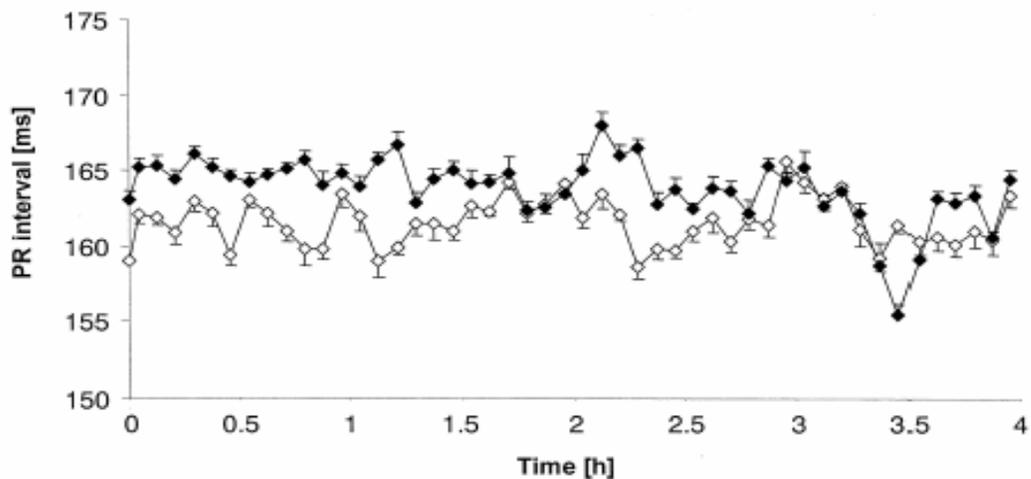


Figura 5- Prolongamento do período PR do eletrocardiograma. Formulação digoxina e cremophor (■) e formulação padrão de digoxina (◻). As barras representam o erro padrão da média (TAYROUZ et al, 2003).

1.2- Registro de Medicamentos Genéricos

De acordo com a Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999 (BRASIL, 1999a) o medicamento genérico é aquele similar a um produto de referência ou inovador, que pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela denominação comum brasileira ou, na sua ausência, pela denominação comum internacional.

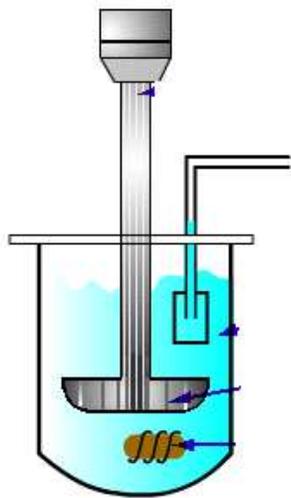
Assim, os aspectos de eficácia e segurança de um medicamento genérico são avaliados por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*, denominados equivalência farmacêutica e bioequivalência, como apresentado na definição de equivalência terapêutica pela RDC 16, de 02 de março de 2007 (BRASIL, 2007a). A qualidade do produto, entretanto, é garantida pelas boas práticas de fabricação.

Os aspectos técnicos relacionados aos estudos de equivalência farmacêutica e bioequivalência são apresentados pelas resoluções RE 310, de 01 de setembro de 2004 (BRASIL, 2004) e RE 1170, de 19 de abril de 2006 (BRASIL, 2006).

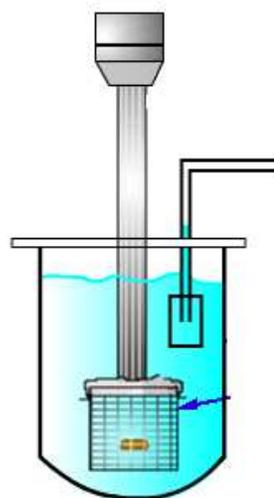
1.2.1- Equivalência Farmacêutica e Perfil de Dissolução

Os ensaios de equivalência farmacêutica são realizados para garantir que duas formulações cumpram com os requisitos farmacopéicos descritos na Farmacopéia Brasileira ou de outro código autorizado pela autoridade sanitária. Na falta de monografia farmacopéica oficial, os ensaios devem ser conduzidos utilizando-se método fornecido pela empresa (BRASIL, 2004).

Os principais ensaios descritos em monografias farmacopéicas são: peso médio, dureza, friabilidade, desintegração, dissolução (considerando tolerância – Q), teor e uniformidade de conteúdo. Além disso, referente ao estudo de dissolução, geralmente é descrito o aparato recomendado, agitação, meio de dissolução e volume. O equipamento onde os ensaios são realizados é denominado dissolutor, o qual acopla sistemas de agitação denominados pá ou cesto. O sistema com pá é denominado aparato 2 e o sistema com cesto, aparato 1 (Figuras 6 e 7). A agitação do sistema geralmente é de 50 rpm para o aparato 2 e 75 rpm para o aparato 1 (MARQUES, 2002). Além disso, os meios de dissolução empregados são tampões ou simulado gástrico e intestinal, esses últimos com e sem adição de enzimas.



Aparato 2 – Pá



Aparato 1 – Cesto

Figura 6- Principais aparatos farmacopéicos. Aparato 2 (pá) e Aparato 1 (cesto).



Figura 7- Dissolutor com 8 cubas apresentando o aparato 2 (pá) (disponível em: www.ganalab.com.br).

Os ensaios de dissolução, denominados perfis de dissolução, têm como objetivo avaliar o comportamento de dois produtos *in vitro*. Em tais ensaios são realizadas várias amostragens seriadas que permitem descrever a porcentagem dissolvida do fármaco em função do tempo (FIGURA 8).



Figura 8- Perfil de dissolução entre duas formulações denominadas referência e teste (disponível em: www.dissolutiontech.com).

A diferença e a semelhança entre as curvas obtidas são analisadas empregando-se modelos independentes (BRASIL, 2004) e/ou dependentes. O modelo independente é aquele que emprega os fatores de diferença (f1) e de semelhança (f2). Os critérios para que os perfis sejam considerados semelhantes são valores de f1 entre 0 e 15 e valores de f2 entre 50 e 100. Desta forma, garante-se que a diferença entre as curvas não é superior a 10% (SHAH et al, 1998). As equações que descrevem tais fatores estão apresentadas abaixo:

$$f1 = \{[\sum (Rt - Tt)] / [\sum (Rt)]\}$$

$$f2 = 50 \log \{[1 + 1/n \sum (Rt - Tt)^2]^{-0,5} \times 100\}$$

Onde: n - número de tempos de coletas; Rt – valor de porcentagem dissolvida no tempo t para o medicamento referência; Tt - valor de porcentagem dissolvida no tempo t para o medicamento teste.

Os modelos dependentes são aqueles descritos como de ordem zero, primeira ordem, Weibull, Higuchi entre outros. O artigo de YUKSEL et al (2000) descreve detalhadamente as características de cada um desses modelos.

Os trabalhos científicos do grupo da Dra Jennifer Dressman da Universidade Johann Wolfgang Goethe (Frankfurt – Alemanha) apresentam ensaios empregando meios que mimetizam as características do estômago e intestino delgado em jejum e pós-prandial. O trabalho de GALIA et al (1998) é o primeiro a descrever os meios FaSSIF (*fasted state intestinal fluid*) e FeSSIF (*fed state intestinal fluid*). Tais meios empregam pH semelhantes ao do intestino delgado em jejum e pós-prandial, bem como sais biliares, como lecitina e taucorolato. Os conteúdos de tais meios estão descritos na Tabela 2 (MARQUES, 2004). O trabalho de KLEIN et al (2004) é também o primeiro a avaliar um meio de dissolução que mimetize as características estomacais pós-prandial.

Tabela 2- Composição dos meios biorrelevantes FaSSIF e FESSIF (Marques, 2004)

FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid)	FeSSIF (Fed State Simulated Intestinal Fluid)
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O ... 1.977g	Ácido Acético ... 8.65g
Lecitina ... 0.75 mM	Lecitina ... 3.75 mM
Taucorolato ... 3 mM	Taucorolato ... 15 mM
NaOH ... 0.174g	NaOH ... 4.04 g
NaCl ... 3.093g	NaCl ... 11.874g
Água desmineralizada q.s.p ... 1000 mL	Água desmineralizada q.s.p ... 1000 mL
pH = 6.5	pH = 5.0

A Farmacopéia Americana (USP) descreve, além dos aparatos 1 e 2, outros aparatos de dissolução que podem ser empregados para caracterizar o comportamento *in vitro* de outros tipos de formulações, como implantes, produtos transdérmicos e mastigáveis (KLEIN, 2005). Dentre esses aparatos, se destaca o

aparato 3, denominado Bio-Dis (FIGURA 9), que permite que a formulação seja exposta a diferentes valores de pH, mimetizando o trânsito gastrointestinal (KLEIN et al, 2008). Em tal aparato a forma farmacêutica é inserida por determinado tempo em cubas com meios que possuem diferentes valores de pH. Os trabalhos de YU et al (2002) e CACACE et al (2004) avaliaram o comportamento de formulações de liberação imediata no aparato 2 e 3. Além disso, o trabalho de YU et al (2002) estabeleceu condições que permitiu a correlação de dados de dissolução no aparato 2 com os dados do Bio-Dis. Assim, agitações de 50 e 75 rpm no aparato 2 são compatíveis, respectivamente, com oscilações de 5 e 10 dpm no aparato 3.

Nos últimos anos, o aparato 3 vem se apresentado como uma ferramenta importante para a avaliação de formulações de liberação modificada e também de formulações de liberação imediata que contenham fármacos de baixa solubilidade de acordo com KLEIN et al (2008).



Figura 9- Dissolutor com 36 cubas denominado aparato 3 – Bio Dis (disponível em: www.varianinc.com).

1.2.2- Estudo de Bioequivalência

O ensaio farmacocinético conduzido com o objetivo de determinar o comportamento de diferentes formulações *in vivo* é definido como biodisponibilidade relativa. De acordo com a RDC 17, de 02 de março de 2007 (ANVISA, 2007b) biodisponibilidade relativa é definida como o quociente da quantidade e velocidade de princípio ativo que chega a circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um preparado e a quantidade e velocidade de princípio ativo que chega a circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um produto de referência que contenha o mesmo princípio ativo. Entretanto, o termo bioequivalência é utilizado com exclusividade para a denominação de estudos de biodisponibilidade relativa para o registro de medicamentos genéricos. Os conceitos de quantidade e velocidade da absorção apresentados na definição acima, estão relacionados, respectivamente, aos parâmetros farmacocinéticos AUC e C_{max} .

Os estudos de bioequivalência são conduzidos por meio de 3 etapas, denominadas clínica, analítica e estatística. A etapa clínica, conduzida de acordo com critérios éticos definidos pela lei 196/96 (BRASIL, 1996a) e critérios técnicos pela RE 1170/06 (BRASIL, 2006b), visa o recrutamento de voluntários sadios de acordo com critérios de inclusão e exclusão (após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE), bem como a definição do número de coletas de amostras biológicas, considerando um período de 4 a 5 vezes a meia-vida de eliminação e o valor de T_{max} . Além disso, a determinação da substância a ser avaliada, isto é, fármaco inalterado ou metabólito deve ser definida de acordo com a Lista - 2 (ANVISA) e a administrado em jejum e/ou pós-prandial de acordo com a Lista – 1 (ANVISA). A administração da medicação deve ser em dose única, porém a condução de estudos em doses múltiplas pode ser necessária caso a concentração plasmática em dose única seja muito baixa, o fármaco apresente alta variabilidade ou nos casos em que o estudo deva ser conduzido em pacientes. Todos esses parâmetros devem estar definidos no protocolo do estudo confeccionado de acordo com a RE 894/03 (BRASIL, 2003c).

A etapa analítica, delineada a partir dos critérios apresentados pela RE 899/03 (BRASIL, 2003d), corresponde à etapa relacionada com a quantificação do fármaco em amostras biológicas. A RE 899/03 (BRASIL, 2003d) determina as orientações para a validação de método bioanalítico considerando a avaliação dos seguintes parâmetros: especificidade, seletividade, linearidade, exatidão, precisão e estabilidade de curta e longa duração. Tal legislação também determina os critérios para a aceitação das corridas analíticas (análise das amostras dos voluntários).

A etapa estatística, conduzida de acordo com a RE 898/03 (BRASIL, 2003e), determina o número de voluntários que devem ser inseridos no estudo, a realização de estudos cruzados ou replicados, bem como a tabela de randomização. Além disso, a RE 898/03 (BRASIL, 2003e) determina os critérios para a condução dos ensaios de variância (ANOVA) e para a construção dos intervalos de confiança (IC 90%), considerando os limites de 80 a 125% (para os dados log transformados).

Os relatórios finais dos estudos, incluindo os dados das etapas clínica, analítica e estatística, são preparados de acordo com a RE 895/03 (BRASIL, 2003f).

De acordo com a RE 897/03 (BRASIL, 2003g) os estudos de bioequivalência devem ser conduzidos com a maior dosagem disponível do fármaco no mercado. As formulações de menores dosagens são bioisentas, caso as formulações sejam proporcionais e apresentem perfis de dissolução comparáveis por meio do cálculo de f_2 . Além disso, os seguintes medicamentos são isentos de estudos de bioequivalência:

- medicamentos administrados por via parenteral (intravenosa, intramuscular, subcutânea ou intratecal), como soluções aquosas que contêm o mesmo fármaco, na mesma concentração em relação ao medicamento referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis;

- soluções de uso oral que contêm o mesmo fármaco, na mesma concentração em relação ao medicamento referência e que não contém excipientes que afetem a motilidade gastrintestinal ou a absorção do fármaco;
- pós para reconstituição que resultem em solução;
- gases;
- soluções aquosas otológicas e oftálmicas que contêm o mesmo fármaco, nas mesmas concentrações em relação ao medicamento referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis;
- medicamentos de uso tópico, não destinados a efeito sistêmico, contendo o mesmo fármaco, na mesma concentração em relação ao medicamento referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis, destinados ao uso otológico e oftálmico, que se apresentem na forma de suspensão, devem ser apresentados os resultados de estudos farmacodinâmicos que fundamentem a equivalência terapêutica, sendo que o modelo de estudo farmacodinâmico deve ser aprovado previamente pela ANVISA;
- medicamentos inalatórios ou sprays nasais administrados com ou sem dispositivo, apresentados sob forma de solução aquosa e contendo o mesmo fármaco, na mesma concentração em relação ao medicamento referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis;
- medicamentos de uso oral cujos fármacos não sejam absorvidos no trato gastrintestinal.

A partir de 2000, com a publicação do guia de Bioisenção do FDA (FDA, 2000) surge no panorama internacional a possibilidade dos estudos de bioequivalência *in vivo* serem conduzidos *in vitro*, considerando ensaios de solubilidade, permeabilidade e perfis de dissolução para fármacos classe I de acordo com o conceito da Classificação Biofarmacêutica (AMIDON et al, 1995). Entretanto, apesar dos ensaios propostos por AMIDON et al (1995) e FDA (2000) serem definidos como bioisenção (*biowaiver*), tal denominação não significa que as formulações serão isentas de estudos de bioequivalência, mas que o ensaio comparativo será realizado, exclusivamente, *in vitro* (POLLI, 2008).

1.3- Classificação Biofarmacêutica (BCS)

O conceito da classificação biofarmacêutica estabelecida por AMIDON et al (1995) permitiu a correlação entre dados de dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* de formulações farmacêuticas de liberação imediata, baseando-se em critérios de solubilidade e permeabilidade do fármaco. A partir desse conceito, os parâmetros solubilidade e permeabilidade apresentaram-se como fatores que controlam a extensão e a velocidade de absorção de fármacos.

Considerando a teoria proposta por AMIDON et al (1995) para a absorção de fármacos, a seguinte equação foi estabelecida:

$$J_w = P_w \cdot C_w$$

Sendo: J_w – fluxo do fármaco através da parede intestinal em qualquer posição anatômica e tempo (massa/área/tempo), P_w – permeabilidade, C_w – concentração do fármaco no lúmen intestinal.

Assim, de acordo com a equação acima, a permeabilidade será máxima quando o parâmetro C_w for igual a solubilidade do fármaco. Além disso, as condições *sink* fisiológicas determinariam a rápida absorção do fármaco (de acordo com a Primeira de Lei de Fick) desde que a concentração do fármaco

no plasma seja infinitamente menor que a concentração do fármaco no lúmen intestinal (AMIDON et al, 1995).

O conceito da classificação biofarmacêutica estabeleceu 4 classes de fármacos de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade. Os fármacos classe I são aqueles que apresentam alta solubilidade e permeabilidade, os classe II apresentam baixa solubilidade e alta permeabilidade, os classe III alta solubilidade e baixa permeabilidade e os classe IV baixa solubilidade e permeabilidade. A Figura 10 apresenta a classificação de fármacos de acordo com a BCS.

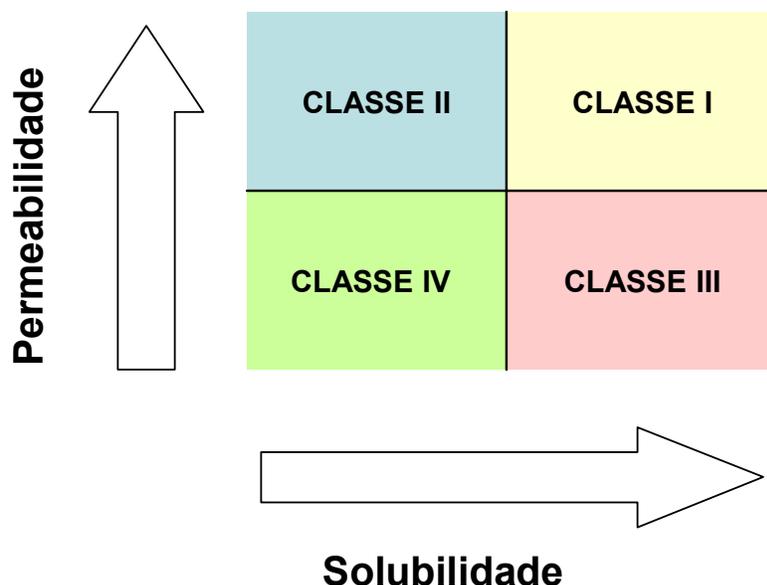


FIGURA 10- Classes de fármacos de acordo com a Classificação Biofarmacêutica – BCS (adaptado de AMIDON et al, 1995).

Os ensaios de solubilidade são conduzidos de acordo com o guia de bioisenção do FDA (2000) que preconiza que a maior dosagem do fármaco seja solúvel em 250 mL de tampões cujos pH sejam de 1 a 7.5. KHAN et al (2004) realizou ensaios de solubilidade para o fármaco loratadina empregando meios cujos pH foram 1.2, 2.0, 2.5, 3.0, 4.5, 6.5 e 7.5. Como o fármaco é uma base

fraca, tal substância apresentou alta solubilidade (4.59 mg/mL) em pH = 1.2 e baixa solubilidade (0.0004 mg/mL) em pH 6.5 e 7.5.

Desta forma, a loratadina é classificada como um fármaco de baixa solubilidade. Outros trabalhos de KHAN et al (2004) e OKUMU et al (2008) realizaram o mesmo procedimento para a avaliação da solubilidade de toseramida e montelukaste, os quais foram classificados, respectivamente, como alta e baixa solubilidade. Recentemente, um documento emitido por pesquisadores reunidos no evento Bio-International 2005 (MIDHA et al, 2007) sugeriu a realização do perfil de solubilidade do fármaco em pH de 1.2 a 6.8. Tal faixa de pH também é preconizada pelo guia de bioisecção da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005).

Os ensaios de permeabilidade sugeridos pelo guia do FDA (2000) são os realizados em cultura de células ou *in vivo* por meio de ensaios de biodisponibilidade absoluta ou balanço de massas. Além disso, o mesmo guia considera fármacos que apresentem valores de biodisponibilidade (F) acima de 90%, como de alta permeabilidade.

Os ensaios de permeabilidade, geralmente, são conduzidos empregando células CaCo-2 (células de adenocarcinoma de cólon humano) ou MDCK (células de rim canino – “Madin-Darby”). O estudo de KHAN et al (2004) avaliou a permeabilidade da loratadina em células CaCo-2, sendo que o fármaco apresentou valor de, aproximadamente, $4.8 \cdot 10^{-5}$ cm/s, o que permite a classificação desse fármaco como de alta permeabilidade. Outros estudos de KHAN et al (2006) e OKUMU et al (2008) realizaram a classificação da permeabilidade dos fármacos toseramida e montelukaste (baixa permeabilidade), respectivamente, por meio de ensaios de biodisponibilidade absoluta e simulações empregando o software GastroPlus (Simulations Plus, USA). MIDHA et al (2007) sugeriram que fármacos que apresentassem valores de F acima de 85% também poderiam ser considerados de alta permeabilidade. Esse valor de biodisponibilidade também é preconizado pelo guia de bioisecção da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005).

Além dos ensaios apresentados acima, a permeabilidade de fármacos também pode ser avaliada *in situ* ou *in vitro* empregando segmentos intestinais ou porções invertidas do intestino de animais. SOUSA et al (2007) apresenta uma revisão dos modelos *in vitro* para a avaliação da permeabilidade de fármacos.

Devido ao custo elevado dos ensaios *in vitro* para a avaliação da permeabilidade de fármacos, KASIM et al (2004) e, posteriormente, TAKAGI et al (2006) propuseram a classificação provisional empregando dados físico-químicos de fármacos e/ou simulações computacionais. Desta forma, a avaliação *in silico* é apresentada como uma nova ferramenta para a classificação biofarmacêutica de fármacos.

A classificação provisional é realizada considerando-se, basicamente, os parâmetros número de dose (Do) e coeficientes de partição (Log P e/ou cLogP) do princípio ativo.

O parâmetro número de dose (Do) é calculado empregando-se a equação abaixo (KASIM et al, 2004):

$$Do = \frac{Mo/Vo}{Cs}$$

Sendo: Mo – maior dosagem do fármaco, Vo – 250mL, Cs – solubilidade do fármaco (mg/mL).

Os valores de solubilidade (Cs) são obtidos do Merck Index ou de monografias da Farmacopéia Americana (USP). Quando não há valores definidos (mg/mL), mas apenas informações descritivas, são empregados os dados da Tabela de solubilidade apresentada pela USP 29 (2006).

Os valores dos coeficientes de partição (Log P e/ou cLog P) são calculados empregando-se programas como o ChemDraw Ultra (CambridgeSoft, USA) a partir de estruturas químicas dos fármacos obtidas do Merck Index (KASIM et al, 2004). Os valores de LogP e/ou cLog P são relacionados com os valores de permeabilidade (P_{eff}) do fármaco *in vivo* tendo como referência os

valores de permeabilidade e coeficiente de partição do fármaco metoprolol. Assim, todo fármaco que apresentar valores de Log P e/ou cLogP superiores ao do metoprolol são considerados fármacos de alta permeabilidade. A Figura 11 mostra a correlação entre valores de coeficiente de partição e permeabilidade para diferentes fármacos (KASIM et al, 2004).

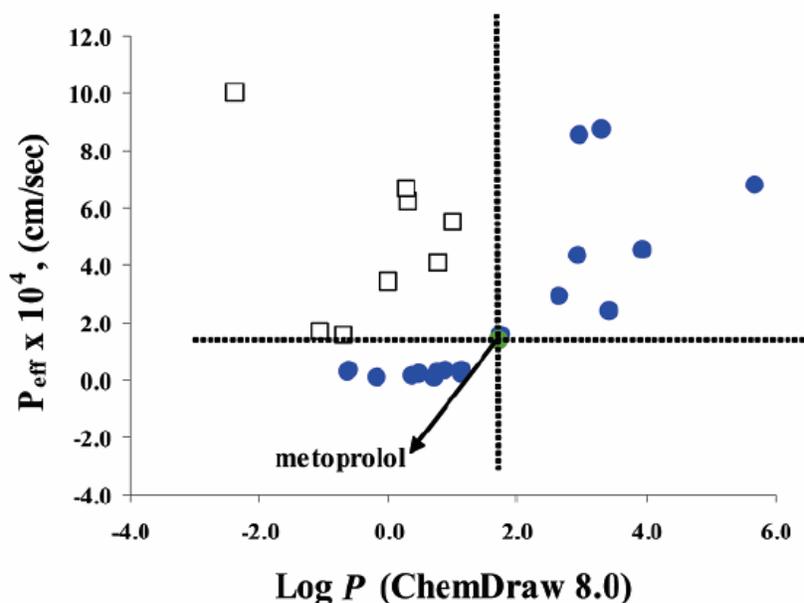


Figura 11- Correlação entre valores de Log P e permeabilidade (P_{eff}) para diferentes fármacos (●) (TAKAGI et al, 2006). Os fármacos denominados falsos negativos (□) são aqueles que são absorvidos por transporte ativo (antipirina, cefalexina, glicose, enalapril, levodopa, fenilalanina e valaciclovir).

Empregando-se os procedimentos de avaliação *in silico*, KASIM et al (2004) e TAKAGI et al (2006), propuseram a classificação provisional dos fármacos essenciais da WHO e dos 200 fármacos mais vendidos nos Estados Unidos, Inglaterra, Espanha e Japão. A partir dos dados obtidos nesses ensaios provisionais, sugere-se que 55% desses fármacos seriam classificados como de classe I ou III e, desta forma, poderiam ser objeto de avaliação *in vitro*

(bioisenção). O guia do FDA (2000) propõe a bioisenção apenas para fármacos classe I, desde que a formulação apresente alta solubilidade (acima de 85% em até 30 minutos) em meios de pH 1.2, 4.5 e 6.8 (aparato 1 – 100 rpm ou aparato 2 – 50 rpm em 900mL de meio) e as formulações possam ser comparadas com por meio do cálculo de f_2 ($f_2 > 50$ nos três meios). Porém o guia da WHO (2005) amplia tal conceito para fármacos classe II e III e o guia da Comunidade Européia (EMA, 2008) apenas para fármacos classe III, considerando também critérios para os ensaios de dissolução (acima de 85% em até 15 minutos).

1.4- Correlação In Vitro – In Vivo

O conceito de correlação In Vitro – In Vivo (IVIVC) é definido como um modelo matemático preditivo para descrever a relação entre uma propriedade *in vitro* e uma resposta *in vivo* de uma forma farmacêutica (FDA, 2001; USP, 2008). De acordo com a RE 482/02 (BRASIL, 2002) as propriedades *in vivo* mais utilizadas são os parâmetros farmacocinéticos C_{max} ou AUC e as propriedades *in vitro* as porcentagens dissolvidas do fármaco em função do tempo.

A IVIVC, geralmente, é estabelecida para fármacos cuja solubilidade é fator limitante para a absorção (Classe II – BCS) e para formulações de liberação modificada. Assim, as correlações estabelecidas são lineares e definidas como de nível A, B ou C (EMAMI, 2006).

A correlação nível A representa uma relação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* e a fração do fármaco absorvido *in vivo*. O cálculo da fração do fármaco absorvido é obtido por deconvolução dos dados de concentração plasmática versus tempo empregando-se o método de Wagner-Nelson ou Loo-Riegelman. Esse é o nível de correlação considerado de maior categoria e aceito por órgãos regulatórios para subsidiar alterações pós-registro (BRASIL, 2002; EMAMI, 2006). A Figura 12 apresenta uma correlação linear do nível A.

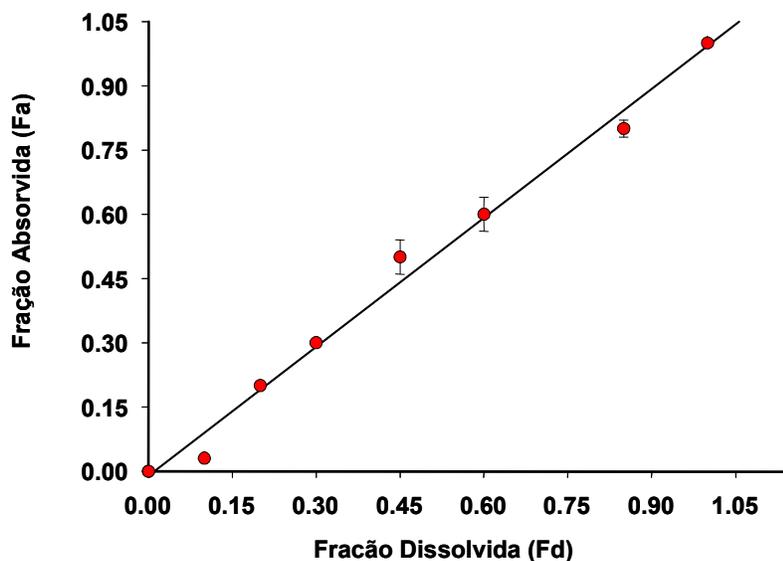


Figura 12- Correlação in vitro – in vivo linear do nível A

O nível de correlação B utiliza os princípios da análise de momento estatístico. Assim, o tempo de residência médio (TRM) *in vivo* é comparado com o tempo médio de dissolução (TMD) *in vitro* e o nível de correlação C relaciona um ponto de dissolução ($t_{50\%}$ ou $t_{90\%}$) a um parâmetro farmacocinético (C_{max} , AUC ou T_{max}) (ANVISA, 2002). Geralmente, são empregadas 3 formulações que apresentem diferentes velocidades de dissolução para a construção dos níveis de correlação A, B ou C (EMANI, 2006).

CORRIGAN et al (2003) realizaram um estudo de correlação in vitro – in vivo (nível A) com o fármaco cetoprofeno (classe II – BCS) empregando meios de dissolução cujos valores de pH eram de 6.8 e 7.5, além do meio biorelevante FaSSIF. As correlações estabelecidas apresentaram um comportamento não-linear já que tais meios determinaram a rápida dissolução do fármaco, visto que o cetoprofeno é um ácido fraco. Os resultados obtidos no estudo de CORRIGAN et al (2003) corroboraram com o conceito de correlação não-linear estabelecido por Polli et al (1996). De acordo, com esse trabalho (Polli et al, 1996) a correlação não-linear apresenta-se como uma ferramenta de

avaliação do comportamento de formulações que contenham fármacos de alta solubilidade (classe I ou III – BCS). Além disso, a correlação não linear demonstra que a permeabilidade é fator limitante para a absorção de fármacos. Recentemente, o estudo de JANTRATID et al (2006) estabeleceu correlações não-lineares com diferentes formulações contendo o fármaco cimetidina (classe III – BCS). A Figura 13 apresenta uma correlação nível A não-linear.

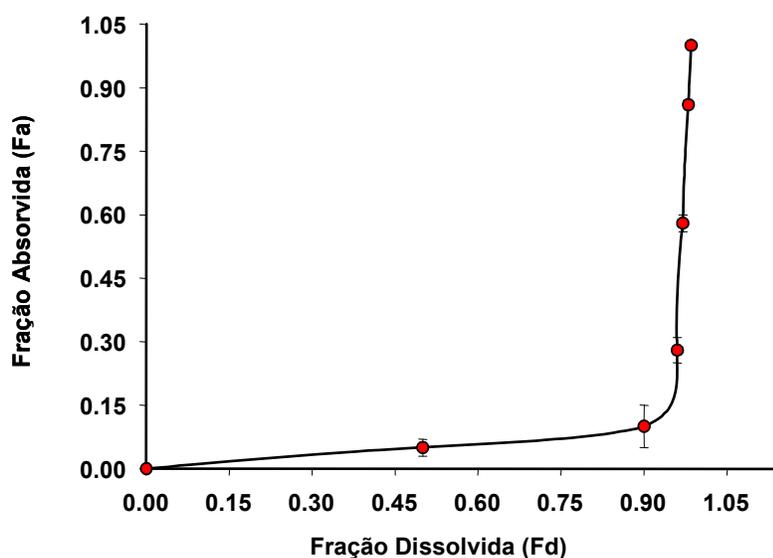


Figura 13- Correlação in vitro – in vivo não-linear do nível A

1.5- Pantoprazol

O pantoprazol é um fármaco derivado benzoimidazólico utilizado no tratamento de distúrbios de acidez gástrica, como úlcera duodenal, refluxo esofágico e síndrome de Zollinger-Ellison. O pantoprazol é ainda indicado no tratamento de úlceras resistentes aos antagonistas de receptores de histamina do tipo H₂, nas lesões gastroduodenais induzidas por antiinflamatórios não esteroidais e na terapia para erradicação de *Helicobacter pylori*, em combinação com agentes antimicrobianos (CHEER et al, 2003; RAFFIN et al, 2006).

O pantoprazol é uma base fraca cujo pka é igual a 4 (JOHNSON, 2005). Além disso, o fármaco possui peso molecular de 383 u, log P de 0.5 e solubilidade de 0.49 mg/mL (DrugBank, 2008). A Figura 14 apresenta a estrutura química do pantoprazol.

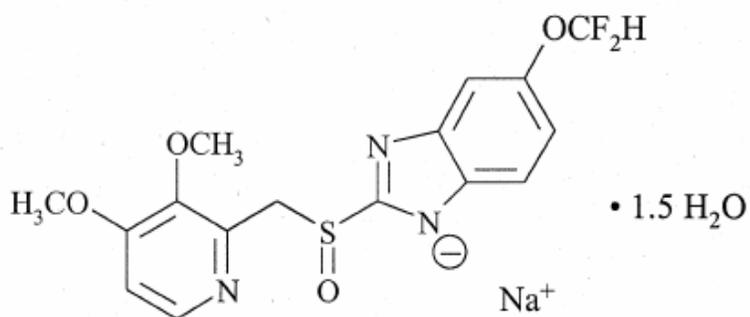


Figura 14- Estrutura química do fármaco pantoprazol (DrugBank, 2008).

O pantoprazol apresenta-se no mercado nacional em dosagens de 20 e 40mg em comprimidos gastroresistentes e pó liofilizado para administração intravascular (DEF, 2006).

1.5.1- Farmacocinética

O fármaco é rapidamente absorvido após administração oral, atingindo picos plasmáticos (C_{max}) de 1,1 a 3,1mg/L após 2 a 4 horas (t_{max}) da ingestão de comprimidos de 40mg com revestimento entérico. O fármaco é extensamente metabolizado pelo tecido hepático e apresenta uma biodisponibilidade de 77%. A ingestão concomitante com alimento não exerce influencia sobre a biodisponibilidade, mas apenas um possível retardo na absorção do fármaco. As concentrações plasmáticas decaem monofasicamente após a administração oral, com um valor de meia-vida de eliminação terminal ($t_{1/2 \beta}$) de 0,9 a 1,9 horas. Entretanto, apesar da curta meia-vida do pantoprazol, uma vez estabelecida a

inibição da secreção ácida o efeito é duradouro, persistindo mesmo após a depuração do fármaco da corrente sanguínea. Dessa forma, a cinética do pantoprazol tem pouca influência em sua farmacodinâmica. Corroborando com essa afirmação, a farmacocinética do pantoprazol após 7 dias de administração oral (20 e 40mg/dia) não apresentou diferenças significativas quando comparado com a administração única, sugerindo que não há acúmulo do fármaco. O pantoprazol se liga extensivamente as proteínas plasmáticas (98%), e tem um baixo volume de distribuição (valor médio de 0,16 L/kg no estado de equilíbrio), o que sugere uma distribuição tecidual limitada (CHEER et al, 2003; MICROMEDEX).

O pantoprazol é metabolizado, via oxidação, pelo citocromo CYP2C19, seguida pela conjugação por sulfato (FURUTA et al, 2005). A eliminação é predominantemente renal, com aproximadamente 80% da dose oral sendo excretada como metabólitos na urina, e o restante nas fezes proveniente de secreção biliar (CHEER et al, 2003).

1.5.2- Farmacodinâmica

O pantoprazol inibe irreversivelmente a bomba de prótons ($H^+ /K^+ /ATPase$) das células parietais da mucosa gástrica (FIGURA15). O desenvolvimento de um fármaco inibidor de bomba de prótons deve prever estabilidade química em pH neutro (para excluir outros alvos que não a $H^+ /K^+ /ATPase$ das células parietais, e dessa forma aumentar sua seletividade), ativação em meios fortemente ácidos e relativa estabilidade em condições fracamente ácidas (para evitar a ativação em outros compartimentos celulares ou organelas). Como uma base fraca, o pantoprazol é altamente ionizado em pH baixo e tem a propriedade de acumular-se no lúmen de células parietais estimuladas, nas quais o pH é fortemente ácido. Nesse microambiente ácido, o pantoprazol é rapidamente convertido em um intermediário reativo que forma ligações covalentes com os resíduos de cisteína da superfície luminal da bomba

$H^+ / K^+ / ATPase$, provocando uma inibição irreversível da função enzimática. A bomba de prótons representa o passo final do processo secretório, e portanto a inibição dessa enzima suprime a secreção ácida gástrica independentemente do estímulo primário. A ativação induzida por meio ácido é uma característica comum dos benzimidazóis, inibidores da bomba de prótons, e confere seletividade para sua ação sobre a $H^+ / K^+ / ATPase$ gástrica. Embora esses compostos sejam rapidamente ativados em condições fortemente ácidas ($pH \leq 3$), o pantoprazol é mais estável que o omeprazol ou lansoprazol em tais meios. A inibição da secreção ácida ocorre com doses de 40mg ao dia de pantoprazol, a qual é mais efetiva que 300mg ao dia de ranitidina ou 20mg ao dia de omeprazol. Entretanto, o uso de 40mg ao dia de pantoprazol determina eficácia clínica semelhante ao uso de 40mg ao dia de omeprazol ou 30mg ao dia de lansoprazol, ou ainda, 40mg ao dia de esomeprazol (CHEER et al, 2003).

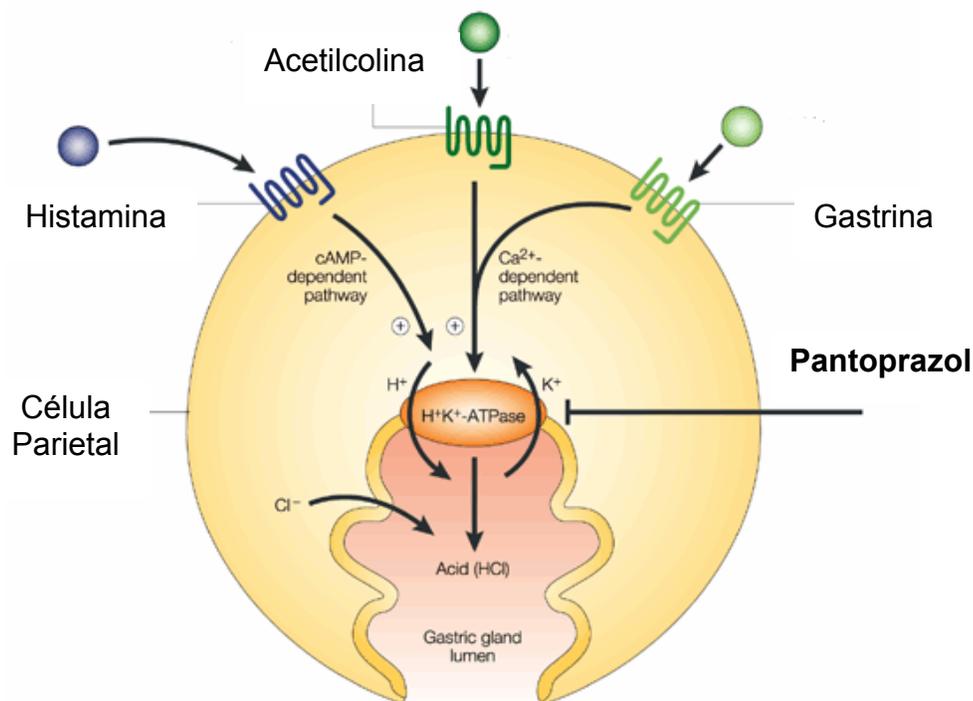


Figura 15- Mecanismo de ação do Pantoprazol (OLBE et al, 2003)

1.5.3- Estudos Biofarmacêuticos

Considerando a base de dados Pubmed, apenas os trabalhos de CAMPOS et al (2007), MENDES et al (2008) e FILIPE et al (2008), publicados no periódico *Arzneimittelforschung*, apresentam dados de estudos de bioequivalência empregando o fármaco pantoprazol. Entretanto, estudos que apresentassem dados de avaliações *in vitro* de formulações de pantoprazol e que permitissem a classificação biofarmacêutica definitiva ou provisional do fármaco pantoprazol não estavam disponíveis na base de dados Pubmed até a publicação de CAMPOS et al (2007). Estudos que propõem a classificação biofarmacêutica de fármacos, como os de KASIM et al (2004) e TAKAGI et al (2006), são geralmente utilizados como subsídios para a solicitação de bioisenção de produtos candidatos a medicamentos genéricos e que contenham fármacos de alta solubilidade (classe I e III) em agências regulatórias internacionais.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar o comportamento *in vitro* e *in vivo* de duas formulações de pantoprazol por meio de estudos de bioequivalência e perfis de dissolução em meios biorelevantes

2.2- Objetivos Específicos

Realizar a classificação provisional do fármaco pantoprazol de acordo com o conceito da Classificação Biofarmacêutica;

Propor uma correlação *in vitro* – *in vivo* para as formulações de pantoprazol avaliadas nesse estudo.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

3.1.1- Formulações

Os ensaios de dissolução e os estudos de bioequivalência foram realizados com as seguintes formulações:

- Formulação Referência: Pantoc – comprimido revestido produzido pela Altana Pharma Ltda.
- Formulação Teste: Pantoprazol – comprimido revestido produzido pela Medley S/A Indústria Farmacêutica.

3.1.2- Ensaio de Dissolução

Para os ensaios de dissolução foram empregados os seguintes equipamentos, reagentes e materiais:

- Dissolutor Nova Ética (Nova Ética, Brasil) modelo: 299/06 empregando o aparato USP 2 (pá) e equipado com 06 cubas;
- Coluna C18 Nova Pak (3.9 x 150 mm), 5 µm (Waters, EUA);
- Filtro 0.45 µm (Milipore, EUA)
- Dissolutor Bio-Dis[®] RRT 8 – aparato USP 3 (Caleva Ltd, Dorset, Inglaterra) e equipado com 36 cubas;
- Meios Biorrelevantes FaSSIF e FeSSIF modificado (pH = 6.0) cujas descrições são apresentadas por MARQUES (2004).
- Padrão secundário de pantoprazol sódico (lote FM 4030) fornecido pela Medley

- Taucorolato de sódio 98% obtido da Prodotti Chimici e Alimentari S.P.A (Basaluzzo, Itália)
- Lecitina 99,1% obtido da Lipoid (Ludwigshafen, Alemanha).

3.1.3- Estudos de Bioequivalência

Para a validação do método bioanalítico e análise das amostras dos voluntários foram empregados os seguintes equipamentos, reagentes e materiais:

- Cromatógrafo Líquido acoplado a espectrômetro de Massas no modo MS/MS (Quatro Micro Micromass, Reino Unido);
- Coluna C18 Polaris (50 x 3 mm), 3 μ m;
- Acetonitrila, dietiléter, diclorometano e ácido fórmico obtidos da Merck (Alemanha)
- Padrão secundário de pantoprazol sódico (lote FM 4030) fornecido pela Medley
- Padrão primário de lansoprazol (lote FOB 310) obtido da United States Pharmacopeia (USP, EUA)

3.2- Métodos

3.2.1- Ensaio de Dissolução

Os ensaios de dissolução foram realizados em aparato USP 2 e aparato USP 3 empregando meios biorrelevantes.

Devido ao revestimento gastro-resistente das formulações Teste e Referência, essas foram previamente avaliadas em simulado gástrico sem pepsina (pH = 1.8) por 60 minutos de acordo com o especificado pela USP 31 (USP, 2006).

Os ensaios no aparato USP 2 foram conduzidos no dissolutor Nova Ética (modelo 299/06) com rotação de 50 rpm (pá) em 900mL dos meios FaSSIF (pH = 6.5) ou FeSSIF (pH = 6.0). Os meios foram mantidos a temperatura de 37±0.5 °C. Em todos os experimentos, 5 mL do meio de dissolução foram amostrados nos seguintes tempos: 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos. Foram empregados 12 amostras das formulações Teste e Referência.

A determinação das porcentagens dissolvidas a cada tempo de coleta foi realizada empregando-se método analítico previamente validado pela Medley S/A Indústria Farmacêutica de acordo com a RE 899/2003 (ANVISA, 2003). O método apresentou linearidade de 1 a 45 µg/mL.

A porcentagem de fármaco dissolvida foi plotada em função do tempo. A comparação dos perfis de dissolução foi realizada por meio do cálculo do fator de similaridade (f2) e do fator de diferença (f1). Os perfis foram considerados semelhantes quando o valor de f2 apresentou-se superior a 50 e o valor de f1 inferior a 15. Além disso, foram considerados os seguintes requisitos: empregou-se, no mínimo, 5 pontos de coletas, um único ponto acima de 85% de dissolução para ambos os produtos, variação máxima de 20% nos primeiros pontos e 10% nos demais pontos e, no caso de dissolução acima de 85% em até 15 minutos, o modelo não foi aplicado. As equações utilizadas para o cálculo de f1 e f2 estão apresentadas abaixo (RE 310/03):

$$f1 = \{[\sum (Rt - Tt)] / [\sum (Rt)]\}$$

$$f2 = 50 \log \{[1+1/n \sum (Rt - Tt)^2]^{0,5} \times 100\}$$

Os ensaios no aparato USP 3 foram conduzidos no dissolutor Bio-Dis[®] RRT 8 com 10 oscilações por minuto (dpm) em 200mL dos meios FaSSIF (pH = 6.5) ou FeSSIF (pH = 6.0). Os meios foram mantidos a temperatura de 37±0.5 °C. Em todos os experimentos, 5 mL do meio de dissolução foram amostrados nos seguintes tempos: 30, 60, 70, 80, 90, 100, 105 e 120 minutos (FaSSIF) e 60, 120, 130, 140, 150, 160, 165 e 180 minutos (FeSSIF). Foram

empregados 03 amostras das formulações Teste e Referência. A determinação das porcentagens dissolvidas a cada tempo de coleta foi realizada empregando-se método analítico previamente validado pelo Instituto de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Johann Wolfgang Goethe (Frankfurt, Alemanha). O método apresentou linearidade de 0.02 a 0.22 µg/mL.

A porcentagem de fármaco dissolvida foi plotada em função do tempo. A comparação dos perfis de dissolução foi realizada por meio de modelos dependentes de Primeira Ordem, Higuchi e Weibull. A Tabela 3 apresenta as equações empregadas para a análise dos perfis de dissolução.

Tabela 3- Equações modelo dependentes de primeira ordem, Weibull e Higuchi.

Modelos Dependentes	
Primeira Ordem	% Dissolvida = $100.[1-\exp^{-kd.t}]$
Weibull	% Dissolvida = $100.[1-\exp^{-(t - T_i)\beta/a}]$
Higuchi	% Dissolvida = $kd.t^{0.5}$

Sendo: kd – constante de velocidade de dissolução, t – tempo, T_i – tempo de latência, β – parâmetro de forma, a – tempo decorrido de ensaio.

Para a definição do melhor modelo que descreveu o comportamento das formulações no aparato 3 foram empregados os parâmetros: Erro Residual Médio (RMS), Fator de Akaike (AIC) e Coeficiente de Determinação (r^2).

3.2.2- Estudos de Bioequivalência

3.2.2.1- Etapa Clínica

3.2.2.1.1- Estudo de Bioequivalência em jejum

O estudo foi conduzido com 28 voluntários sadios, adultos de ambos os sexos com idade entre 18 e 50 anos, com índice de massa corpórea maior do que 19 e menor do que 30 (HHS, 2005). Quanto ao grupo étnico, não foram incluídos

no estudo voluntários de descendência asiática, devido à grande porcentagem (12-25%) de metabolizadores lentos nesta população. A etapa clínica somente teve início após a aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética da Universidade São Francisco (Anexo 1) e a assinatura dos termos de consentimentos (TCLE) de acordo com o preconizado pela Resolução 196/96 (CNS, 1996) e RE 1170/06 (ANVISA, 2006). Todos os voluntários foram submetidos a exames clínicos e laboratoriais em momentos pré e pós-estudo. Além disso, não foram incluídos no estudo indivíduos com anormalidades clinicamente significantes nos exames bioquímicos, hematológicos e de urina I, presença de doença gastrointestinal, cardiovascular, hepática, hematopoiética, renal ou respiratória ou, ainda, história de alergia ao fármaco pantoprazol. Outros critérios de exclusão foram: exposição recente (menos do que 3 meses) a fármacos experimentais ou não, ingestão recente ou história de abuso de álcool ou de drogas ilícitas, fumantes, doação recente (menos do que 3 meses) de sangue, sorologia positiva para HIV e hepatites B e C.

O estudo apresentou desenho cruzado, aberto e randomizado. A formulação foi administrada em dose única (40mg) e em jejum, em cada um dos períodos de internação, com um copo de água potável (240 ml), seguindo a randomização apresentada no Anexo 2. O período de wash-out considerado no estudo foi de, no mínimo, 06 dias.

Os tempos de coletas empregados no estudo foram: 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2; 2.25; 2.5; 2.75; 3.0; 3.5; 4.0; 4.5; 5.0; 6.0; 8.0; 10.0; 12.0 h.

Logo após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Imediatamente após a centrifugação, o plasma foi retirado e armazenado em frasco adequado, igualmente identificado, a temperatura de no mínimo -70 °C em freezer específico para a armazenagem de amostras biológicas localizado na própria Unidade Clínica (UNIFAG).

3.2.2.1.2- Estudo de Bioequivalência pós-prandial

O estudo foi conduzido com 62 voluntários sadios, adultos de ambos os sexos com idade entre 18 e 50 anos, com índice de massa corpórea maior do que 19 e menor do que 30 (HHS, 2005). Quanto ao grupo étnico, não foram incluídos no estudo voluntários de descendência asiática, devido à grande porcentagem (12-25%) de metabolizadores lentos nesta população. A etapa clínica somente teve início após a aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética da Universidade São Francisco (Anexo 1) e a assinatura dos termos de consentimentos de acordo com o preconizado pela Resolução 196/96 (CNS, 1996) e RE 1170/06 (ANVISA, 2006). Todos os voluntários foram submetidos a exames clínicos e laboratoriais em momentos pré e pós-estudo. Além disso, não foram incluídos no estudo indivíduos com anormalidades clinicamente significantes nos exames bioquímicos, hematológicos e de urina I, presença de doença gastrointestinal, cardiovascular, hepática, hematopoiética, renal ou respiratória ou, ainda, história de alergia ao fármaco pantoprazol. Outros critérios de exclusão foram: exposição recente (menos do que 3 meses) a fármacos experimentais ou não, ingestão recente ou história de abuso de álcool ou de drogas ilícitas, fumantes, doação recente (menos do que 3 meses) de sangue, sorologia positiva para HIV e hepatites B e C.

O estudo apresentou desenho cruzado, aberto e randomizado. A formulação foi administrada em dose única (40mg) após dieta hipercalórica, em cada um dos períodos de internação, com um copo de água potável (240 ml), seguindo a randomização apresentada no Anexo 2. O período de wash-out considerado no estudo foi de, no mínimo, 06 dias.

A dieta utilizada no estudo apresenta, aproximadamente, 800 – 1000 calorias. A Tabela 4 apresenta a composição dessa dieta hipercalórica.

Tabela 4- Composição da dieta hipercalórica utilizada no estudo de bioequivalência pós-prandial (n=62)

	kcal	gordura (g)
Croissant (50g)	206,5	12,2
Queijo Prato (20g) 2 fatias	142,8	10,6
Presunto cozido com capa (20g) 2 fatias	136,6	11,6
Margarina (10g)	72	8,1
Bolo (Bauducco branco, recheio de morango) 40 g	160	8
Leite Integral (240 ml)	146,4	7,2
Açúcar (2 colheres de chá)	40	0
Total	904,3	57,7

Os tempos de coletas empregados no estudo foram: 0, 1; 2; 2.5; 3; 3.5; 4; 4.5 ; 5; 5.5; 6; 6.5; 7; 8; 10; 12; 16; 18; 20; 24 h.

Logo após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Imediatamente após a centrifugação, o plasma foi retirado e armazenado em frasco adequado, igualmente identificado, a temperatura de no mínimo -70 °C em freezer específico para armazenagem de amostras biológicas localizado na própria Unidade Clínica (UNIFAG).

3.2.2.2- Etapa Analítica

A quantificação das amostras dos estudos de bioequivalência em jejum e pós-prandial foram realizadas por meio de método bionalítico previamente validado pela UNIFAG. O desenvolvimento do método ocorreu anteriormente à execução desse estudo e teve como base o artigo de PERES et al (2004). O método apresentou limite de quantificação (LQ) de 10 ng/mL e linearidade de 10 – 5000 ng/mL (CAMPOS et al, 2007). Os valores obtidos de precisão e exatidão intra e inter-ensaios, recuperação e estabilidade contemplaram plenamente os requisitos da RE 899/2003 (ANVISA, 2003).

3.2.2.3- Etapa Estatística

As análises estatísticas dos dados foram conduzidas após a transformação logarítmica de todos os valores de ASC_{0-t} e C_{max} . O t_{max} foi estatisticamente avaliado utilizando a diferença individual, construindo um intervalo de confiança de 90%, através de teste não-paramétrico. Os parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} , ASC_{0-inf} e $t_{1/2}$ foram calculados a partir das equações apresentadas na Figura 4. Os parâmetros C_{max} e T_{max} foram obtidos diretamente das curvas de concentração plasmática versus tempo. O parâmetro kel foi estimado pelo coeficiente angular da reta de regressão linear, calculada pelo método dos mínimos quadrados, do logaritmo natural da concentração plasmática versus tempo. A razão de ASC_{0-t}/ASC_{0-inf} deve apresentar valores acima de 80% de acordo com a RE 1170/06 (ANVISA, 2006).

Foi empregada análise de variância (ANOVA) apropriada para o modelo de 2 períodos cruzados, sob os dados de $\ln ASC_{0-t}$ e $\ln C_{max}$, levando em consideração os efeitos de seqüência, voluntário dentro da seqüência, tratamento e período. Foram calculados os pontos paramétricos e estimativas dos intervalos da razão T/R (formulação teste/formulação referência) para os valores ASC_{0-t} e C_{max} . A biodisponibilidade relativa da formulação teste *versus* a formulação referência foi avaliada pelas razões das médias geométricas. O intervalo de confiança (IC) estipulado para a razão das médias geométricas entre R e T foi de 90 % e determinado por análises paramétricas (dois testes *t* unicaudais – $p=0.05$). A construção do intervalo de confiança foi baseada no quadrado médio residual da ANOVA. As formulações foram consideradas bioequivalentes quando o IC acima mencionado (IC 90 %) para os parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} e C_{max} estivessem dentro dos limites de 80 a 125 %, aceito pela ANVISA (ANVISA, 2006).

A análise farmacocinética foi realizada com o apoio dos seguintes programas: Microsoft Excel Version 7.0; *WinNonLin Professional Network Edition*, versão 1.5; *Bioequivalence Program for Two-Period Crossover Studies* – versão 3.4., por *Jerman P Wijnand*; ou posterior e *Graph Pad Prism* versão 3.02. A

entrada de dados e seu processamento inicial foram realizados através de arquivos MS Excel, com base nos dados derivados dos equipamentos de análise.

3.2.3- Classificação Biofarmacêutica Provisional

A classificação provisional do fármaco pantoprazol foi realizada considerando o cálculo dos parâmetros biofarmacêuticos, número de dose (Do), Permeabilidade (Peff) e fração absorvida. Para o cálculo do número de dose empregou-se a equação (AMIDON et al, 1995):

$$\text{Do} = \text{dose} / \text{solubilidade} / 250\text{mL}$$

Sendo: Do – dose; Cs – solubilidade; 250mL – volume de água em que o fármaco deve estar solúvel.

Valores inferiores a 1 demonstram que o fármaco é de alta solubilidade (KASIM et al, 2004). O valor de solubilidade do fármaco foi obtido do software ADMET Predictor™ Version 1.0 (Simulations Plus, USA) e a dose utilizada foi de 40mg.

Os dados referentes a permeabilidade, também, foram obtidos empregando-se o software ADMET Predictor™ Version 1.0 (Simulations Plus, USA). O cálculo da fração absorvida (Fa) foi realizado empregando-se a equação (AMIDON et al, 1988, 1995; KRISHNA et al, 2008) :

$$\text{Fa} = 1 - \exp [-2/R \cdot \text{Peff} \cdot \text{Tres}]$$

Sendo: Fa – fração absorvida, R – raio do intestino delgado (R – 1.75cm), Peff – permeabilidade e Tres – tempo de residência no intestino delgado (Tres – 3h).

Os valores de Log P e CLog P para o fármaco pantoprazol foram obtidos empregando-se o programa ChemDraw Ultra 10.0 (Cambridgesoft, USA). Os dados de log P e Fa foram comparados aos do fármaco padrão, metoprolol. Os dados referentes ao metoprolol foram obtidos do artigo de TAKAGI et al (2006).

3.2.4- Relação In Vitro – In Vivo (IVIVR)

Foi estabelecida uma relação in vitro – in vivo entre as frações absorvidas (Fa) das formulações Teste e Referência dos estudos de bioequivalência em jejum e pós-prandial com as porcentagens dissolvidas (Fd) nos meios FaSSIF e FeSSIF (aparato 2).

As frações absorvidas (Fa) foram obtidas das curvas de concentração plasmática versus tempo empregando o modelo de Loo-Riegelman para os estudos em jejum e pós-prandial. A equação que descreve o modelo de deconvolução está apresentada abaixo (EMAMI, 2006):

$$\text{Loo-Riegelman: } F_t = \frac{C_t + K_{10} \cdot \int_0^t C dt + (X_p)t / V_c}{K_{10} \cdot \int_0^\infty C dt}$$

Sendo: C_t - concentração plasmática no tempo t , $\int_0^t C dt$ – integral da concentração plasmática de 0 a t , $\int_0^\infty C dt$ – integral da concentração plasmática de 0 ao infinito, $(X_p)t$ – quantidade de fármaco no compartimento periférico ($X_{pt} = k_{12} \cdot e^{-k_{21} \cdot t} \cdot \int_0^t C dt \cdot e^{k_{21} \cdot t} \cdot \delta t$) (BERMEJO, 2004), V_c – volume aparente do compartimento central, k_{10} – constante de eliminação do compartimento central.

Os cálculos das micro-constantes (k_{12} , k_{21} e k_{10}) foram realizados empregando-se as concentrações plasmáticas do estudo em jejum (referência), a partir do C_{max} , de acordo com LOBENBERG et al (2000). Para os cálculos foi empregado o programa *WinNonlin 5.2 with IVIVC toolkit* (Pharsight, USA).

O modelo de relação in vitro – in vivo não-linear obtido foi descrito pela equação abaixo (POLLI et al, 1996):

$$F_a(t) = 1/f_a [1 - \alpha / \alpha - 1 (1 - F_d) + 1 / \alpha - 1 (1 - F_d)^\alpha]$$

Sendo: $F_a(t)$ – fração absorvida no tempo t ; $\alpha = k_p / k_d$ (k_p – constante de permeabilidade e k_d - constante de dissolução); f_a - fração absorvida no tempo infinito; F_d – fração dissolvida no tempo t .

4- RESULTADOS

4.1- Estudos de Dissolução

4.1.1- Perfis de Dissolução em meios biorrelevantes empregando o aparato 2 (USP)

As Figuras 16 e 17 apresentam os perfis de dissolução das formulações teste e referência em meios biorelevantes no aparato 2. No meio FaSSIF (pH = 6.8) as formulações apresentaram porcentagens dissolvidas acima de 85% em, aproximadamente, 60 minutos. A porcentagem máxima de fármaco dissolvida no meio FaSSIF (pH = 6.0) foi de 70%. As formulações apresentaram comportamentos semelhantes nos meios FaSSIF e FeSSIF com valores de f_2 , respectivamente, de 78.87 e 58.25 (Tabela 5).

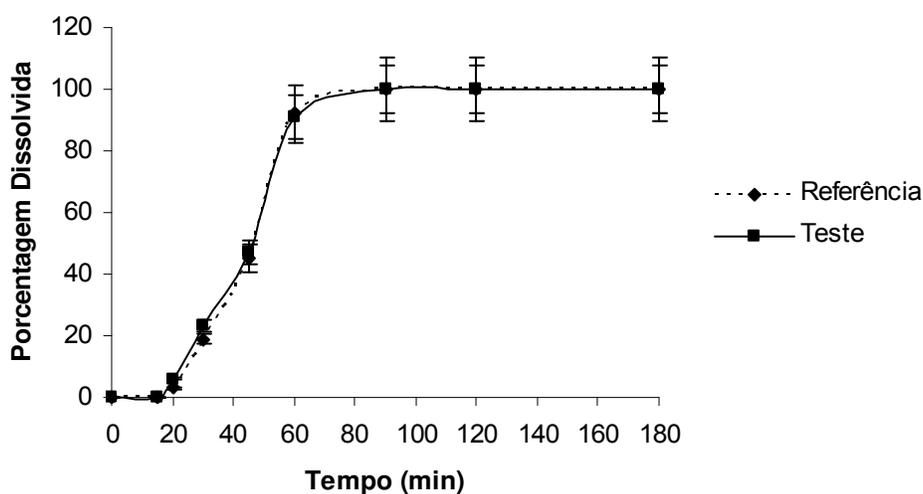


Figura 16- Perfil de Dissolução entre as formulações referência e teste de pantoprazol em meio biorrelevante (FaSSIF) empregando-se o aparato 2 (USP). O valor de f_2 calculado foi de 78.87.

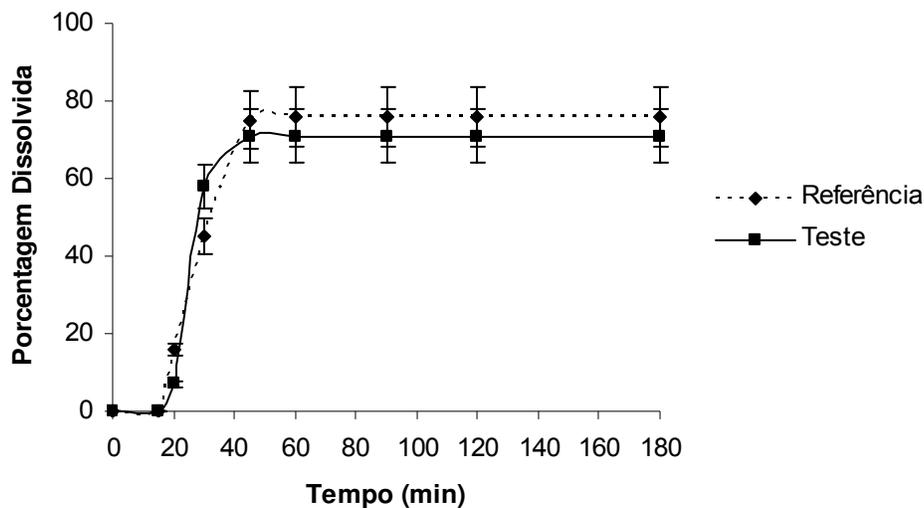


Figura 17- Perfil de Dissolução entre as formulações referência e teste de pantoprazol em meio biorrelevante (FeSSIF) empregando-se o aparato 2 (USP). O valor de f2 calculado foi de 58.25.

Tabela 5- Parâmetros de similaridade (f2) e diferença (f1) obtidos após comparação dos perfis de dissolução das formulações teste e referência em meios biorrelevantes (FaSSIF e FeSSIF) no aparato 2 (USP)

Meios Biorrelevantes	Modelos Independentes	
	f1	f2
FaSSIF	6.29	78.87
FeSSIF	10.45	58.25

4.1.2- Perfis de Dissolução em meios biorelevantes empregando o aparato 3 (USP)

As Figuras 18 e 19 apresentam as porcentagens dissolvidas versus tempo das formulações teste e referência em meios biorelevantes no aparato 3. Nos meios FaSSIF (pH = 6.8) e FeSSIF (pH = 6.0) as formulações apresentaram porcentagens máximas dissolvidas em, aproximadamente, 40 minutos. Além

disso, as formulações foram previamente avaliadas, respectivamente, por 60 e 120 minutos em pH = 1.2. As formulações apresentaram comportamentos semelhantes nos meios biorelevantes e as cinéticas de dissolução puderam ser descritas pelo modelo de Weibull (Tabelas 6 e 7).

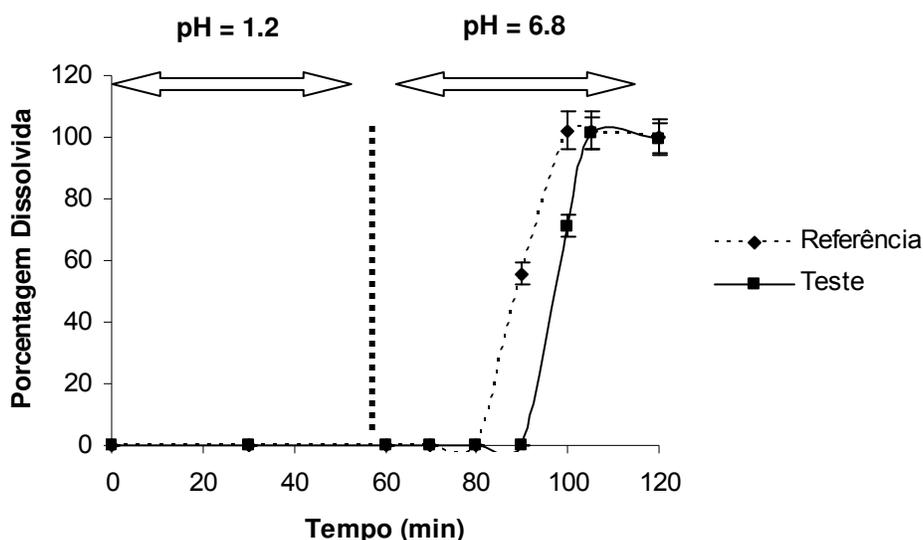


Figura 18- Perfil de Dissolução entre as formulações referência e teste de pantoprazol em meio biorrelevante (FaSSIF) empregando-se o aparato 3 (USP).

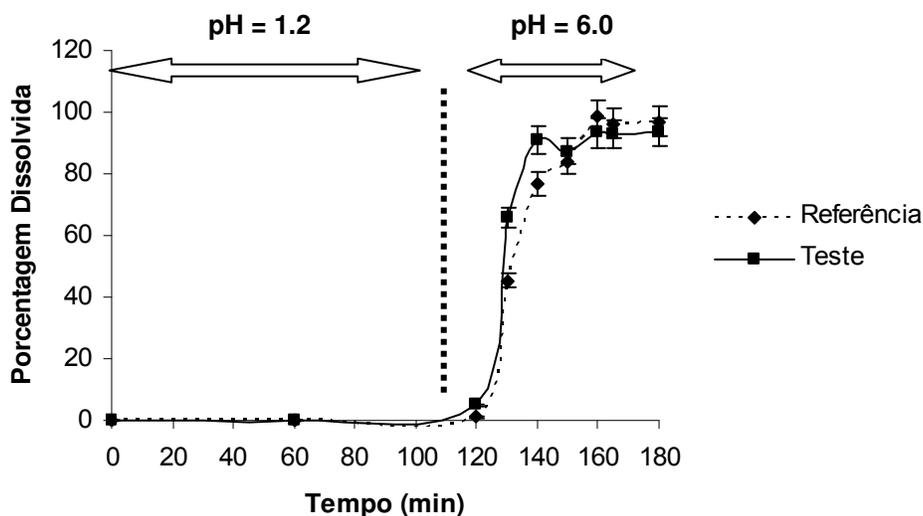


Figura 19- Perfil de Dissolução entre as formulações referência e teste de pantoprazol em meio biorrelevante (FeSSIF) empregando-se o aparato 3 (USP).

Tabela 6- Modelagem dos perfis de dissolução obtidos em meios biorrelevantes (FaSSIF e FeSSIF) em aparato 3 (USP) para a formulação referência. Foram empregados modelos dependentes de Primeira Ordem, Weibull e Higuchi.

Meios Biorrelevantes	Estatística	Modelos Dependentes		
		1° Ordem	Weibull	Higuchi
Referência				
FaSSIF	r^2	0.8807	0.9996	0.8427
	ERM	0.4562	0.0015	0.5402
	Akaike	-3.49	-41.29	-2.30
FeSSIF	r^2	0.9974	0.9980	0.9755
	ERM	0.0042	0.0030	0.0420
	Akaike	-36.30	-36.51	-20.17

Tabela 7- Modelagem dos perfis de dissolução obtidos em meios biorrelevantes (FaSSIF e FeSSIF) em aparato 3 (USP) para a formulação teste. Foram empregados modelos dependentes de Primeira Ordem, Weibull e Higuchi.

Meios Biorrelevantes	Estatística	Modelos Dependentes		
		1° Ordem	Weibull	Higuchi
Teste				
FaSSIF	r^2	0.8151	0.9995	0.7548
	ERM	0.6237	0.0018	0.7536
	Akaike	-1.30	-40.02	0.02
FeSSIF	r^2	0.9928	0.9937	0.9167
	ERM	0.01835	0.0089	0.1509
	Akaike	-25.98	-28.99	-11.23

As Figuras 20 a 23 apresentam os resultados dos modelos de primeira ordem, Higuchi e Weibull na descrição da cinética de dissolução das formulações em meios biorelevantes no aparato 3.

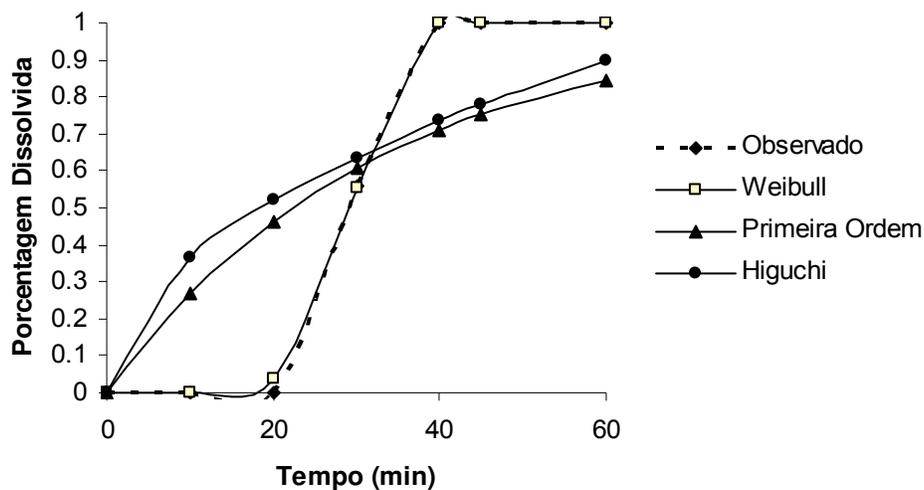


Figura 20- Perfil de Dissolução da formulação referência em meio biorelevante (FaSSIF) empregando-se o aparato 3 (observado) e curvas de modelagens empregando-se Weibull, Primeira Ordem e Higuchi.

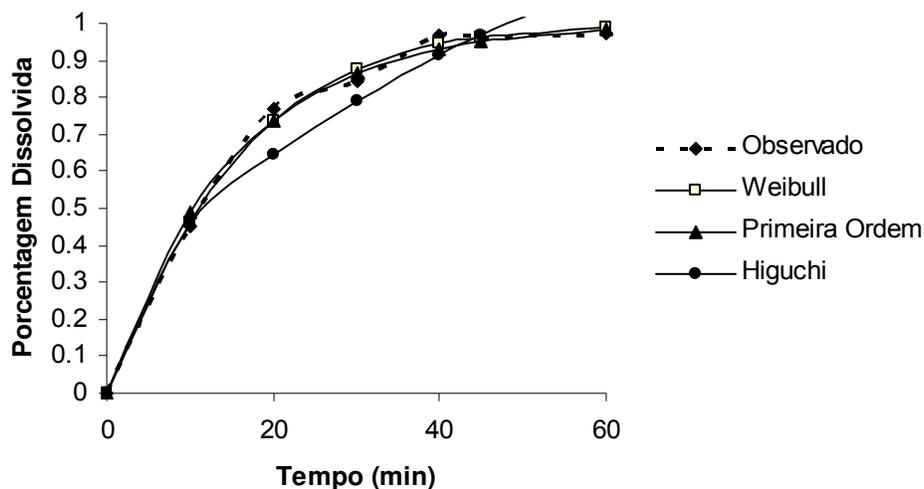


Figura 21- Perfil de Dissolução da formulação referência em meio biorelevante (FeSSIF) empregando-se o aparato 3 (observado) e curvas de modelagens empregando-se Weibull, Primeira Ordem e Higuchi.

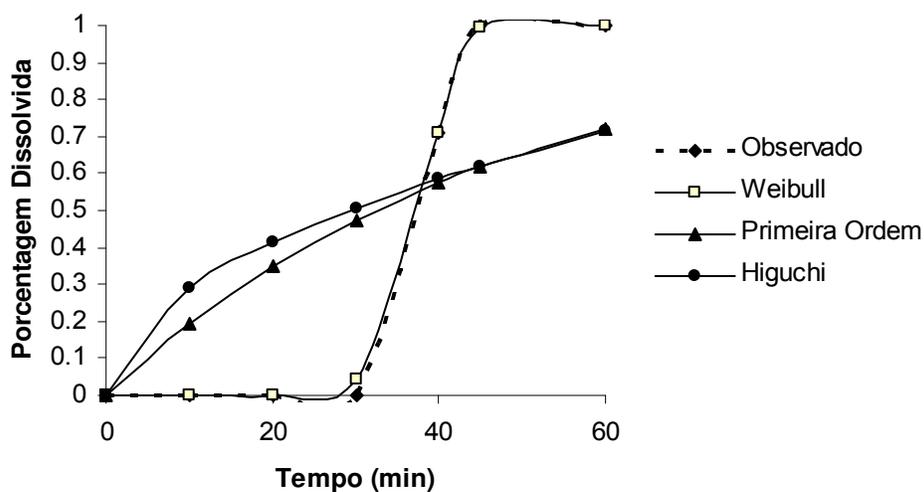


Figura 22- Perfil de Dissolução da formulação teste em meio biorelevante (FaSSIF) empregando-se o aparato 3 (observado) e curvas de modelagens empregando-se Weibull, Primeira Ordem e Higuchi.

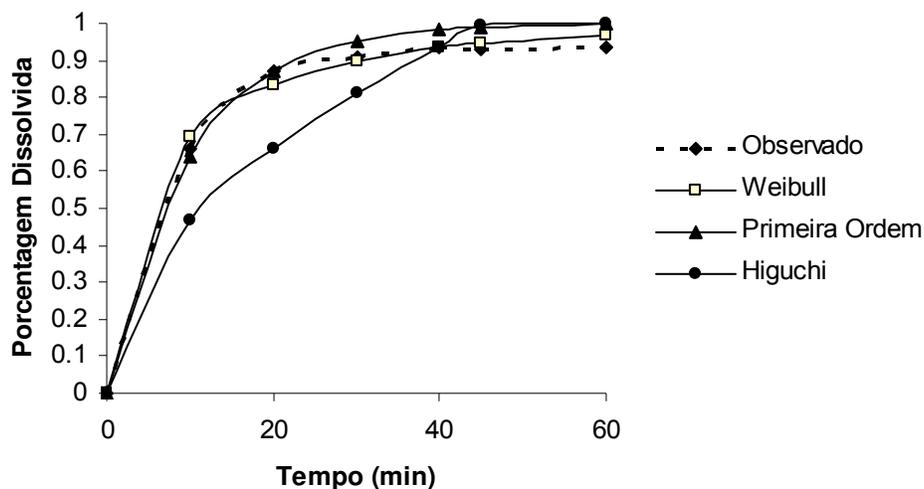


Figura 23- Perfil de Dissolução da formulação teste em meio biorelevante (FeSSIF) empregando-se o aparato 3 (observado) e curvas de modelagens empregando-se Weibull, Primeira Ordem e Higuchi.

4.2- Estudos de Bioequivalência

4.2.1- Estudo de Bioequivalência em Jejum

A Figura 24 apresenta a disposição cinética do fármaco pantoprazol após administração, em dose única e em jejum, das formulações teste e referência. A Tabela 8 apresenta dos dados farmacocinéticos obtidos por meio da aplicação do modelo não-compartimental. A Tabela 9 apresenta a média geométrica e os intervalos de confiança 90% (IC 90%) para os parâmetros ASC_{0-t} , ASC_{0-inf} e C_{max} . Como os valores dos IC 90% se apresentaram dentro dos limites de confiança de 80-125% as formulações foram consideradas bioequivalentes. Os valores dos CV intra-individuais apresentam valores ao redor de 10% para os parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} , ASC_{0-inf} e C_{max} .

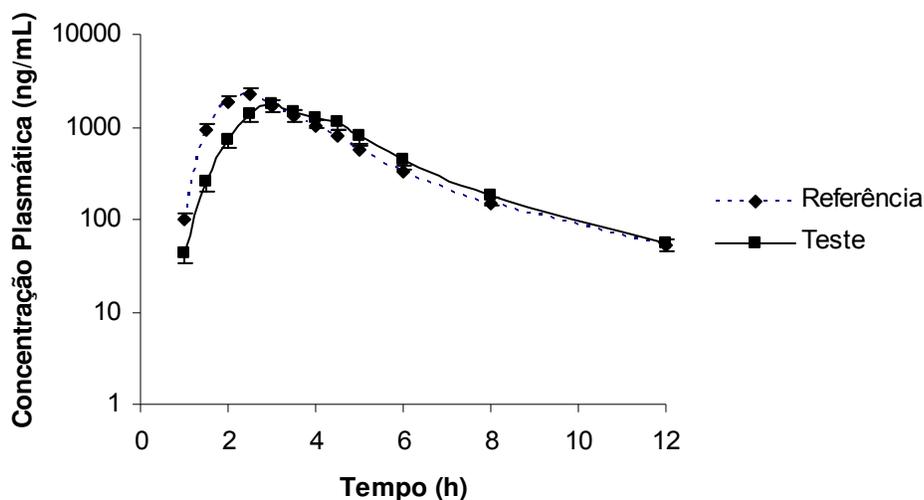


Figura 24- Concentração plasmática versus tempo das formulações referência e teste de pantoprazol após administração em dose única em jejum (n = 28 voluntários).

Tabela 8- Parâmetros farmacocinéticos do fármaco pantoprazol (formulações referência e teste) após administração em dose única em jejum (n = 28 voluntários). Média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Referência	Teste
AUC _{0-t} (ng.h/mL)	6500.040 \pm 4947.879	5981.824 \pm 4180.115
AUC _{0-inf} (ng.h/mL)	6899.408 \pm 6565.435	6347.065 \pm 5668.867
C _{max} (ng/mL)	2840.065 \pm 946.983	2818.368 \pm 975.475
T _{max} (h)	2.268 \pm 0.518	2.94 \pm 0.843
t _{1/2} (h)	1.45 \pm 1.269	1.325 \pm 0.988

Tabela 9- Análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos médios obtidos dos 28 voluntários para as formulações referência e teste de pantoprazol após administração em dose única em jejum.

Parâmetros	Teste/Referência		
	Média Geométrica	Intervalo de Confiança 90%	CV intra (%)
$\ln AUC_{0-t}$ (ng.h/mL)	94.31	0.89-0.99	11.23
$\ln AUC_{0-inf}$ (ng.h/mL)	94.36	0.89-0.99	11.16
$\ln C_{max}$ (ng/mL)	98.76	0.94-1.03	10.16
t_{max} (h)	0.68	0.35-1.00	

4.2.2- Estudo de Bioequivalência Pós-Prandial

A Figura 25 apresenta a disposição cinética do fármaco pantoprazol após administração, em dose única e pós-prandial, das formulações teste e referência. A Tabela 10 apresenta dos dados farmacocinéticos obtidos por meio da aplicação do modelo não-compartimental. A Tabela 11 apresenta a média geométrica e os intervalos de confiança 90% (IC 90%) para os parâmetros ASC_{0-t} , ASC_{0-inf} e C_{max} . Como os valores dos IC 90% se apresentaram fora dos limites de confiança de 80-125% as formulações não foram consideradas bioequivalentes. Os valores dos CV intra-individuais apresentam valores ao redor de 72% para C_{max} , 28% para ASC_{0-inf} e 48% para ASC_{0-t} .

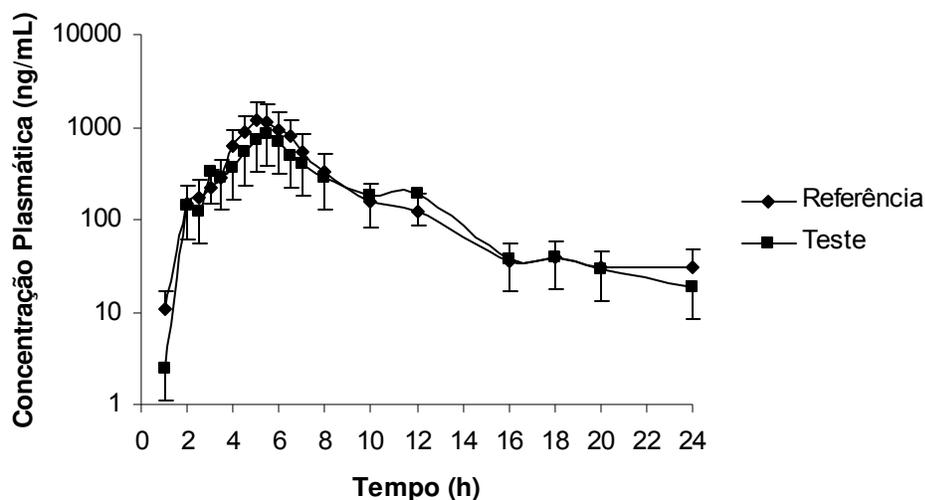


Figura 25- Concentração plasmática versus tempo das formulações referência e teste de pantoprazol após administração em dose única pós-prandial (n = 62 voluntários).

Tabela 10- Parâmetros farmacocinéticos do fármaco pantoprazol (formulações referência e teste) após administração em dose única pós-prandial (n = 62 voluntários). Média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Referência	Teste
AUC _{0-t} (ng.h/mL)	5474.642 \pm 3398.351	4464.870 \pm 2876.136
AUC _{0-inf} (ng.h/mL)	5704.341 \pm 3383.767	4753.255 \pm 2810.712
C _{max} (ng/mL)	2971.134 \pm 1286.779	2173.750 \pm 1270.610
T _{max} (h)	6.287 \pm 4.413	8.025 \pm 5.443
t _{1/2} (h)	1.228 \pm 0.615	1.456 \pm 0.930

Tabela 11- Análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos médios obtidos dos 62 voluntários para as formulações referência e teste de pantoprazol após administração em dose única pós-prandial.

Parâmetros	Teste/Referência		
	Media Geométrica	Intervalo de Confiança 90%	CV intra (%)
$\ln AUC_{0-t}$ (ng.h/mL)	78.96	0.68-0.90	48.67
$\ln AUC_{0-inf}$ (ng.h/mL)	86.50	0.79-0.94	28.46
$\ln C_{max}$ (ng/mL)	62.85	0.51-0.76	72.92
t_{max} (h)	1.74	0.58-2.90	

4.3- Relação In Vitro – In Vivo (IVIVR)

As Figuras 26 e 27 apresentam as frações absorvidas em função do tempo das formulações teste e referência após a administração, respectivamente, em jejum e pós-prandial. A deconvolução dos dados de concentração plasmática versus tempo foi realizada aplicando-se o modelo de Loo-Riegelman para os estudos em jejum e pós-prandial.

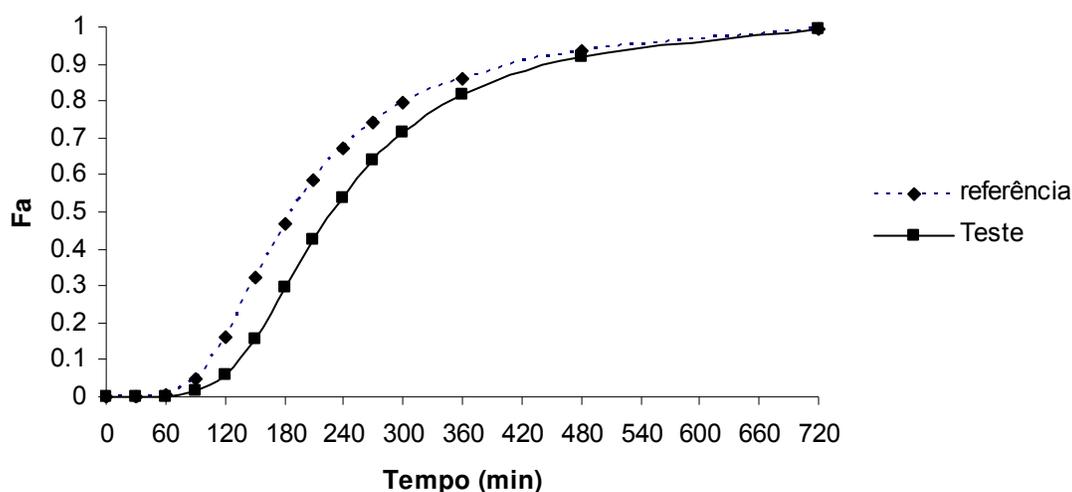


Figura 26- Fração absorvida versus tempo obtida por meio de deconvolução por Loo-Riegelman após administração das formulações teste e referência em jejum.

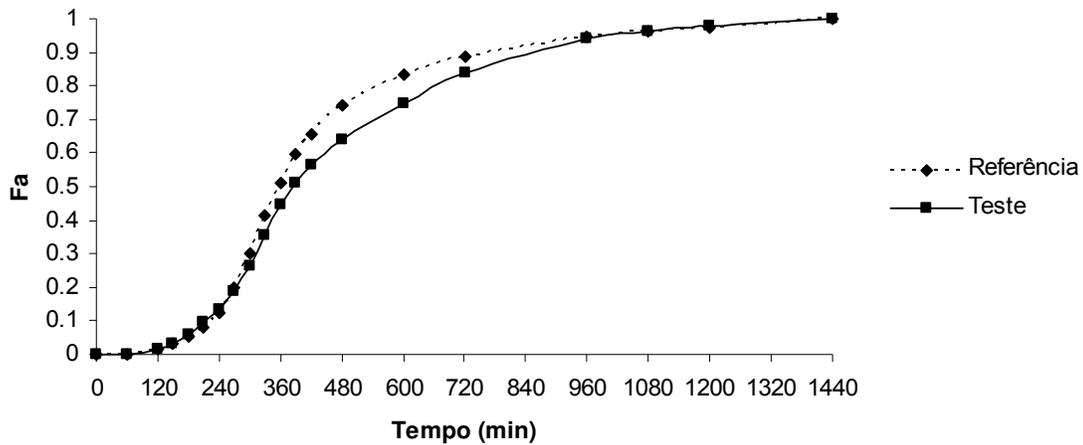


Figura 27- Fração absorvida versus tempo obtida por meio de deconvolução por Loo-Riegelman após administração das formulações teste e referência pós-prandial.

As Figuras 28 e 29 apresentam as frações absorvidas em função do tempo das formulações teste e referência após a administração em jejum e pós-prandial. Os gráficos demonstram que a absorção dos fármacos, após a administração de alimentos, apresenta-se mais lenta.

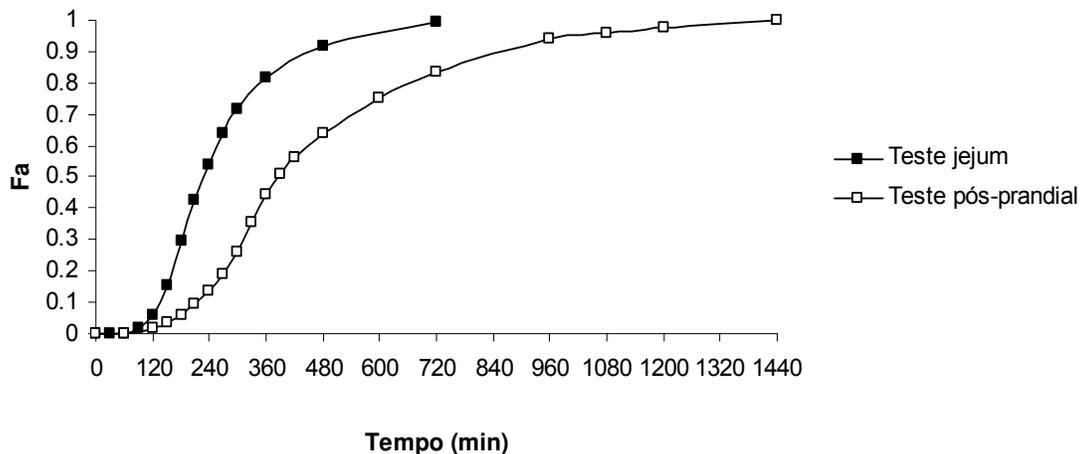


Figura 28- Frações absorvidas versus tempo da formulação teste após administração em jejum e pós-prandial.

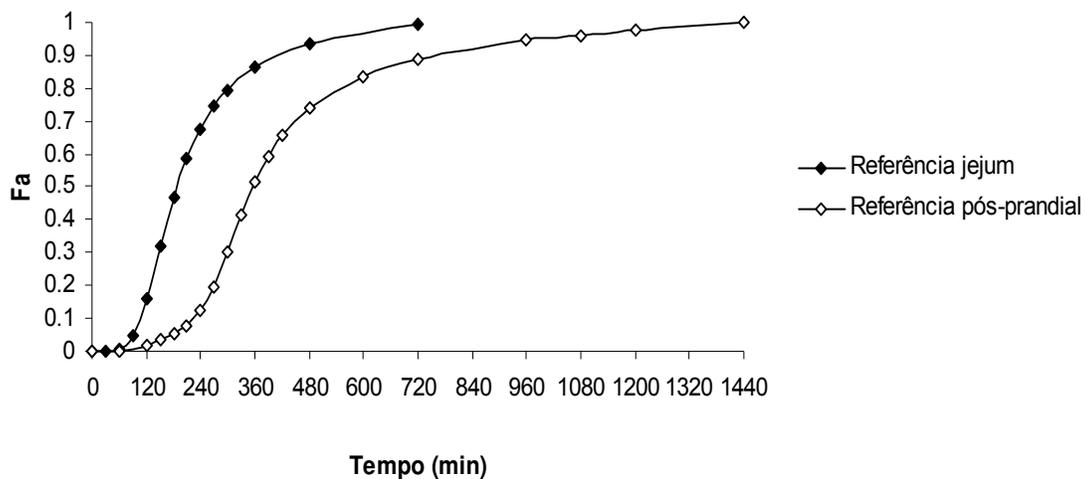


Figura 29- Frações absorvidas versus tempo da formulação referência após administração em jejum e pós-prandial.

As Figuras 30 e 31 apresentam a relação *in vitro* – *in vivo* (IVIVR) para as formulações teste e referência em jejum e pós-prandial. A fração absorvida (F_a) foi obtida dos dados de concentração plasmática versus tempo *in vivo* (deconvolução) e a fração dissolvida (F_d) diretamente dos perfis de dissolução *in vitro* (aparato 2). A equação de Polli et al (1996) foi empregada para descrever o comportamento das formulações. Os valores do parâmetro α , para as formulações teste e referência no estudo em jejum, foram de 0.039 e 0.048, respectivamente. Para a IVIVR com os dados pós-prandiais, os valores do parâmetro α , para as formulações teste e referência, foram de 0.35 e 0.44, respectivamente.

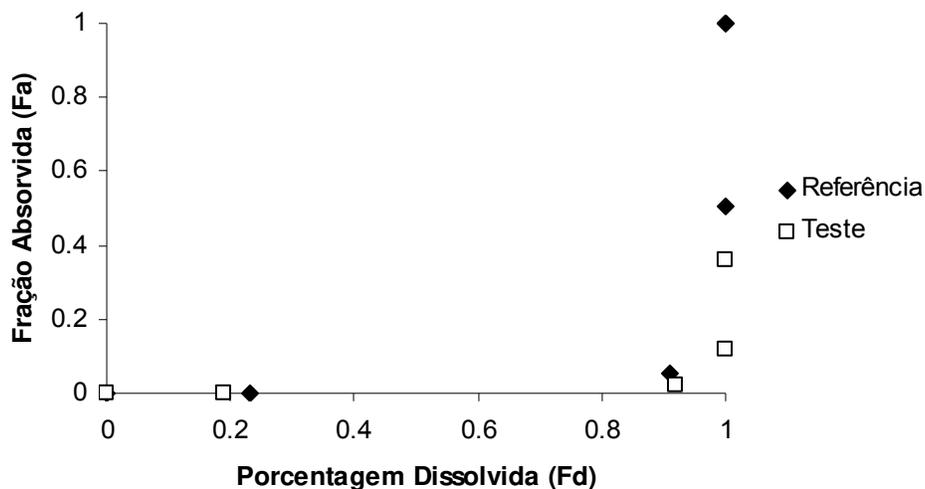


Figura 30- Relação In Vitro – In Vivo (IVIVR) das formulações de pantoprazol em jejum. Valores de alfa para referência e teste, respectivamente, 0.039 e 0.048.

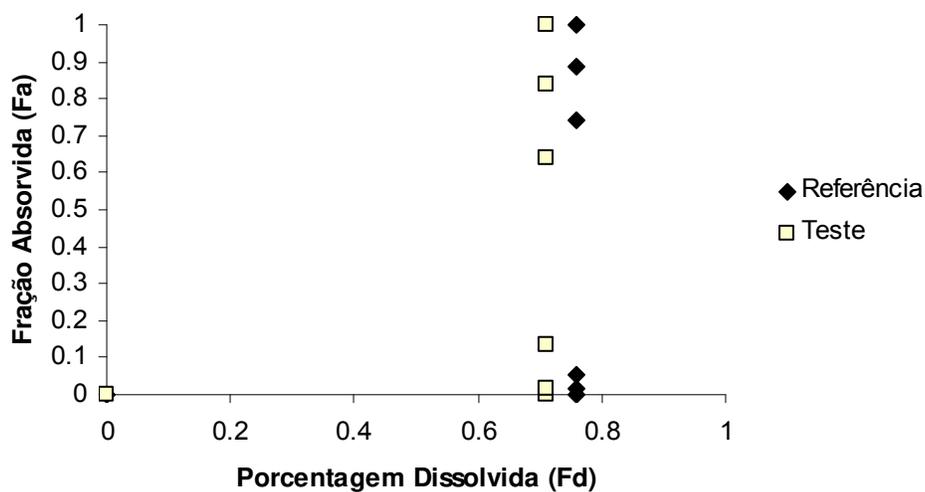


Figura 31- Relação In Vitro – In Vivo (IVIVR) das formulações de pantoprazol pós-prandial. Valores de alfa para referência e teste, respectivamente, 0.35 e 0.44.

4.4- Classificação Biofarmacêutica Provisional (BCS)

A Tabela 12 apresenta dos dados físico-químicos e biofarmacêuticos empregados para a classificação provisional do fármaco pantoprazol de acordo com a Classificação Biofarmacêutica. O fármaco referência foi o metoprolol. Os softwares empregados estão descritos no item 3.2.3. O cálculo da fração absorvida (fa) foi realizada empregando a equação descrita por AMIDON et al (1995).

Tabela 12- Parâmetros físico-químicos e biofarmacêuticos para os fármacos pantoprazol (classe 3 – provisional) e metoprolol (classe 1).

Parâmetros	Pantoprazol	Metoprolol
Solubilidade (mg/mL)	0.2 (pH = 6.8)	1000
Número de dose (Do)	0.8	0.0004
Log P (ChemDraw)	1.77	2.18
Log P (TAKAGI et al, 2006)	---	1.72
cLog P (ChemDraw)	2.11	1.486
cLog P (TAKAGI et al, 2006)	---	1.485
Permeabilidade (cm/seg)	$0.47 \cdot 10^{-4}$	$1.34 \cdot 10^{-4}$
Fração absorvida (Fa)	0.44	1
Classificação - BCS	Classe 3	Classe 1

Sendo: dose - pantoprazol = 40mg; dose - metoprolol = 100mg

A Figura 32 apresenta as correlações entre os dados de permeabilidade (Peff) e lipossolubilidade (log P) para os fármacos pantoprazol (Classe 3 – Peff = $0.47 \cdot 10^{-4}$ cm/seg), cimetidina (classe 3 – Peff = $0.26 \cdot 10^{-4}$ cm/seg) e metoprolol (Classe 1 – Peff = $1.34 \cdot 10^{-4}$ cm/seg). Os dados de permeabilidade e lipossolubilidade para os fármacos cimetidina e metoprolol foram obtidos do artigo de TAKAGI et al (2006). O dado de permeabilidade do fármaco pantoprazol foi obtido do programa Predictor Version 1.0 (Simulations Plus, USA) e a lipossolubilidade do programa ChemDraw Ultra 10.0 (Cambridgesoft, USA).

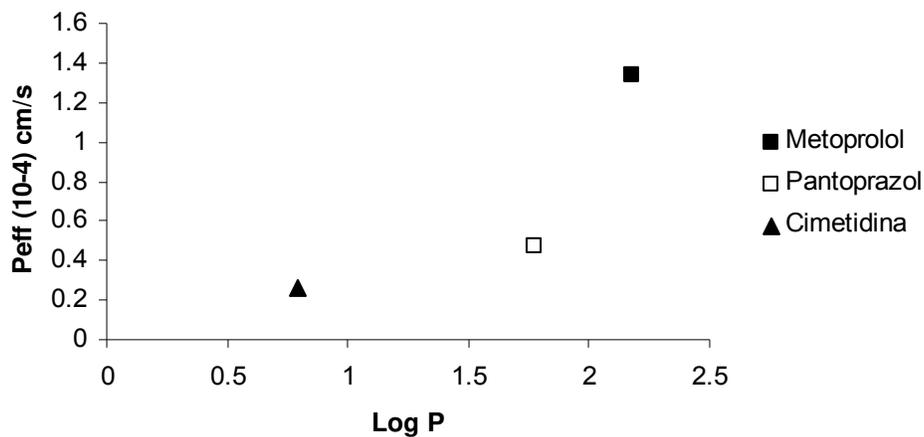


Figura 32- Correlações entre os dados de permeabilidade (P_{eff}) e lipossolubilidade ($\log P$) para os fármacos pantoprazol (Classe 3), cimetidina (classe 3) e metoprolol (Classe 1).

A Figura 33 apresenta as correlações entre os dados de fração absorvida (F_a) e lipossolubilidade ($\log P$) para os fármacos pantoprazol (Classe 3 – $F_a = 0.44$), cimetidina (classe 3 – $F_a = 0.5$) e metoprolol (Classe 1 – $F_a = 1$). Os dados de fração absorvida para o fármaco pantoprazol foi obtido empregando-se Loo-Riegelman. O dado de fração absorvida para o fármaco cimetidina foi obtido do artigo de JANTRATID et al (2006) e para o metoprolol do artigo de AMIDON et al (1995). Os dados de lipossolubilidade para os fármacos cimetidina e metoprolol foram obtidos do artigo de TAKAGI et al (2006). O dado de lipossolubilidade para o fármaco pantoprazol foi obtido do programa ChemDraw Ultra 10.0 (Cambridgesoft, USA).

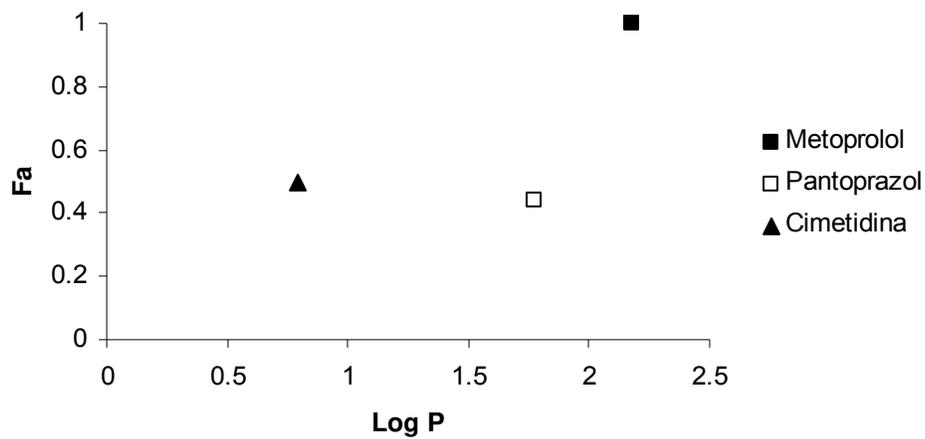


Figura 33- Correlações entre os dados de fração absorvida (Fa) e lipossolubilidade (log P) para os fármacos pantoprazol (Classe 3), cimetidina (Classe 3) e metoprolol (Classe 1).

5- DISCUSSÃO

Os ensaios *in vitro* (dissolução), *in vivo* (bioequivalência) e *in silico* (solubilidade e permeabilidade) realizados nesse trabalho empregando-se o fármaco pantoprazol permitiram uma completa avaliação biofarmacêutica desse fármaco de acordo com os conceitos da classificação biofarmacêutica – BCS (AMIDON et al, 1995; KASIM et al, 2004; TAKAGI et al, 2006), meios biorelevantes (GALIA et al, 1998; KLEIN et al, 2008) e correlação *in vitro* - *in vivo* (POLLI et al, 1996; EMAMI, 2006). Assim, os ensaios *in vitro* e *in silico* foram conduzidos considerando-se as características do fármaco e das formulações com o objetivo de se estabelecer critérios que permitissem prever o comportamento de formulações contendo o fármaco pantoprazol *in vivo*.

Os ensaios de dissolução empregando o aparato 2 em meios biorelevantes (FaSSIF e FeSSIF) demonstraram que os perfis de dissolução das formulações teste e referência apresentaram comportamentos semelhantes *in vitro* ($f_2 > 50$). Os perfis foram avaliados empregando-se o modelo independente (SHAH et al, 1998), visto que esse método é o mais empregado na literatura internacional para a comparação de curvas de porcentagens dissolvidas em função do tempo, bem como é o único recomendado pela RE 310/04 (BRASIL, 2004). O ensaio em meio FaSSIF demonstrou porcentagens dissolvidas acima de 85% em 60 minutos (considerando um *lag time* de 20 minutos) e no meio FeSSIF a porcentagem máxima dissolvida foi de 70%, após 40 minutos (considerando um *lag time* de 15 minutos). O meio FeSSIF permitiu uma maior velocidade de dissolução para o pantoprazol, visto que apresentou maior quantidade de lecitina e taucorolato (tensoativos) em comparação com o meio FaSSIF. Porém, a maior solubilidade nesse meio, determinou também uma maior instabilidade para o fármaco, o que é representado pela porcentagem máxima dissolvida de 70% (Figura 17).

Os ensaios empregando os meios biorelevantes no aparato 2 foram conduzidos considerando o tempo de trânsito gastrointestinal e as características fisiológicas do sistema digestivo. Assim, o período de coleta empregado no ensaio (180 minutos) teve como objetivo mimetizar o tempo de trânsito das formulações

no intestino delgado. De acordo com DAVIS (1986) o tempo de trânsito de formulações no intestino delgado é de aproximadamente 3 a 4 horas. Os ensaios de dissolução demonstraram que no máximo em 60 minutos todo o fármaco contido nas formulações estaria disponível para a absorção. Além disso, os valores de pH utilizados nos ensaios com os meios FaSSIF (pH = 6.8) e FeSSIF (pH = 6.0) foram definidos de acordo com os dados apresentados por MARQUES (2004). Entretanto, o pH de 6.0 utilizado no meio FeSSIF apresentou-se superior ao estipulado pela literatura (pH = 5.0) (GALIA et al, 1998) devido a instabilidade do fármaco em meios ácidos, como previamente demonstrado por BRANDSTROM et al (1989) e EKPE et al (1999) e nos resultados dos perfis de dissolução no meio FeSSIF (Figura 17).

O volume de meio utilizado para os ensaios em meios biorelevantes foi de 900mL, apesar de MARQUES (2004) recomendar o uso de 500mL para o meio FaSSIF. Entretanto, como o pantoprazol é um fármaco de alta solubilidade ($D_0 = 0.8$), o uso do volume padrão (900mL) não comprometeu o resultado dos ensaios, já que as condições *sink* não foram alteradas. Recentemente, os trabalhos de OKUMU et al (2008) e SCHELLEKENS et al (2007) propuseram ensaios em meios FaSSIF com volumes de 900mL.

O método também empregou agitação de 50 rpm, já que essa velocidade é usualmente empregada para ensaios em aparato 2 (MARQUES, 2002), bem como reflete as características do sistema gastrointestinal de acordo com KATORI et al (1995). Entretanto, a partir de 2006, o FDA (FDA, 2006) passou a recomendar a agitação de 100 rpm para ensaios com o fármaco pantoprazol. Contudo, essa agitação, geralmente é empregada para o aparato 1 (cesta) de acordo com MARQUES (2002).

Os ensaios no aparato 3 demonstraram uma rápida dissolução das formulações teste e referência e, desta forma, não foi possível empregar o modelo independente (f2) para a comparação das curvas de porcentagens dissolvidas versus tempo. Assim, foram empregados os modelos dependentes, para a comparação da cinética de dissolução de formulações (YUKSEL et al, 2000), isto

é, os modelos de primeira-ordem, Weibull e Higuchi. Como a cinética de dissolução das formulações nos meios FaSSIF e FeSSIF apresentaram uma disposição sigmoïdal, o modelo que melhor descreveu os dados foi o de Weibull. Entretanto, a curva de dissolução do medicamento referência no meio FeSSIF também poderia ter sido descrita empregando-se o modelo de primeira-ordem. Tal fato permite inferir que a cinética de dissolução das formulações teste e referência seguiram diferentes modelos de dissolução nos meios FaSSIF e FeSSIF. Os parâmetros erro residual médio, o fator de Akaike e coeficiente de determinação foram empregados para a definição do modelo que melhor descreveu cada perfil de dissolução, já que são os parâmetros rotineiramente empregados na avaliação de cinéticas de dissolução de novas formulações (YUKSEL et al, 2000; OKUMU et al, 2008).

A definição dos pontos de coletas empregados nos ensaios no aparato 3 também foi realizada considerando o tempo de trânsito gastrintestinal e as características fisiológicas do sistema digestivo. Assim, as coletas tiveram duração de 60 minutos (em pH básico), considerando a liberação do fármaco na primeira porção do intestino delgado (duodeno). O tempo de residência gástrica foi de 60 minutos no ensaio em FaSSIF (Figura 18) e de 120 minutos no FeSSIF (Figura 19), já que, nesse último caso, foi considerado o retardo no esvaziamento gástrico em situação pós-prandial. Os tempos de exposição da formulação aos diferentes pH gastrintestinais foram definidos de acordo com estudos de KLEIN et al (2002) e DAVIS et al (1984; 1986), bem como considerando os dados dos ensaios no aparato 2.

Os ensaios no aparato 3 foram conduzidos empregando-se uma velocidade de oscilações de 10 dpm, o que determinou uma intensa agitação ao sistema, já que ROHRS e colaboradores (1995) demonstraram que uma agitação de 5 dpm no aparato 3 corresponde a 50 rpm no aparato 2. Assim, podemos inferir que a agitação de 10 dpm apresentou-se como um dos fatores que determinou uma maior velocidade de dissolução para o pantoprazol no aparato 3, tanto nos meios FaSSIF quanto no FeSSIF. Tal observação corrobora com os dados

apresentados por Yu e colaboradores (2002) para formulações de liberação imediata contendo o fármaco de alta solubilidade ranitidina, o qual apresentou fração dissolvida acima de 85% em até 15 minutos quando avaliado no aparato 3 e uma dissolução mais lenta quando avaliado no aparato 2. Desta forma, pode-se inferir que para fármacos de alta solubilidade como o pantoprazol, o aparato 2 (a 50 rpm) permite um processo de dissolução mais lento e conseqüentemente mais discriminativo.

Os ensaios de dissolução nos aparatos 2 e 3 permitiram rápidas liberações do pantoprazol das formas farmacêuticas e também elevadas velocidades de dissolução. O fármaco apresentou-se completamente dissolvido nos meios biorelevantes em até 60 minutos, fato esse compatível com o tempo de trânsito de formulações no intestino delgado de acordo com DAVIS et al (1986). Conseqüentemente, pôde-se concluir que as formulações teste e referência apresentaram a mesma velocidade de dissolução *in vivo*. Desta forma, considerando o conceito da classificação biofarmacêutica (AMIDON et al, 1995), tais formulações supostamente deveriam apresentar a mesma disposição cinética *in vivo* e serem denominadas bioequivalentes. Entretanto, as formulações apresentaram a mesma disposição cinética apenas no estudo de bioequivalência conduzido em jejum.

O estudo de bioequivalência em jejum foi conduzido com 28 voluntários já que estudos anteriormente realizados pela UNIFAG (Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia – USF) demonstraram que o pantoprazol não era um fármaco de alta variabilidade (CV_{intra-individual} ≤ 20%). O cronograma utilizado para descrever a farmacocinética do pantoprazol apresentou 17 pontos de coletas e teve como último ponto, o tempo de 12 horas, com o objetivo de caracterizar as etapas de absorção, distribuição e eliminação do fármaco. Dados do artigo de CHEER et al (2003) e da base de dados MICROMEDEX (2008) que demonstram que o pantoprazol apresenta T_{max} igual a 2 – 3 horas e meia-vida de eliminação de 0.8 a 4.8 horas (média de 2.8 horas) também foram utilizados para a definição dos tempos de coletas. A variabilidade dos valores t_{1/2} apresentados

na literatura para o pantoprazol pode ser explicada pelo fato do fármaco ser metabolizado pela isoenzima CYP2C19, a qual apresenta polimorfismo genético (FURUTA et al, 2005). Desta forma, o cronograma apresentou coletas sucessivas ao redor de 2 a 3 horas com o objetivo de permitir a determinação do parâmetro C_{max} e coletas até 12h considerando: o valor da meia-vida média (2.8 horas), a exigência de coletas que contemplem de 4 a 5 vezes a meia-vida de eliminação de acordo com a RE 1170/06 (BRASIL, 2006) e o limite de quantificação do método bionalítico (LQ = 10ng/mL), previamente desenvolvido e validado pela UNIFAG.

Os resultados do estudo em jejum demonstraram que as formulações eram bioequivalentes tanto para a velocidade quanto para a extensão de absorção (Tabela 9). Assim, os valores das médias geométricas e dos intervalos de confiança (IC90%) para os parâmetros C_{max} e AUC apresentaram-se dentro dos limites de confiança, de 80 – 125%, estabelecidos pela RE 898/03 (BRASIL, 2003e). Além disso, o estudo não apresentou efeitos de período e seqüência, já que o ensaio foi conduzido de forma aleatória (randomização) e com um período de wash-out de 15 dias, período esse superior a 7 – 10 vezes a meia-vida de eliminação do fármaco, de acordo com o estabelecido pela RE 1170/06 (BRASIL, 2006).

O estudo de bioequivalência pós-prandial foi conduzido com 62 voluntários, já que estudos pilotos realizados anteriormente demonstraram que o fármaco apresentava alta variabilidade (CV intra-individual com valor superior a 30%) (UNIFAG – dados não publicados). Entretanto, foram recrutados 72 voluntários (Anexo 2), porém 2 não compareceram a uma das internações (drop-outs) e 8 não apresentaram concentrações plasmáticas acima do LQ em todos os tempos de coletas. Além disso, nesse estudo o cronograma de coletas apresentou-se mais extenso, com último tempo de coleta de 24 horas, já que dados da literatura (MICROMEDEX, 2008; BENET et al, 1994) demonstraram que após a ingestão de alimentos, o T_{max} de formulações contendo o fármaco pantoprazol apresentou valores ao redor de 4 – 5 horas, devido ao retardo no esvaziamento gástrico. Assim, o cronograma apresentou coletas sucessivas de 3

a 6 horas com o objetivo de determinar de forma precisa e exata o parâmetro C_{max}. Entretanto, dados de BENET et al (1994) demonstram que, após a administração em dose única do fármaco pantoprazol em condições pós-prandiais, alguns voluntários apresentaram valores de T_{max} após 8 horas.

Os resultados do estudo pós-prandial demonstraram que as formulações não foram bioequivalentes para a velocidade e a extensão da absorção. Além disso, os dados de coeficiente de variação intra-individuais apresentaram valores superiores a 30% (Tabela 11), fato esse que corrobora com as informações disponibilizadas por DILIBERTI (2004). Até a publicação do artigo de CAMPOS et al (2007), a apresentação de DILIBERTI (2004) era o único documento disponível que afirmava que o fármaco pantoprazol apresentava alta variabilidade em ensaios pós-prandiais.

A alta variabilidade apresentada pelo fármaco pantoprazol em condição pós-prandial (EMAMI, 2006) pode ser explicada a partir do conceito da classificação biofarmacêutica - BCS (AMIDON, 1995) e também pelo recente conceito da classificação biofarmacêutica da disposição de fármacos - BDDCS (BENET et al, 2005; CUSTODIO et al, 2008).

Considerando o conceito da classificação biofarmacêutica - BCS, FLEISHER et al (1999) afirmam que a alimentação determina uma alta variabilidade na absorção de fármacos classe III, simplesmente por atuar como uma barreira física, diminuindo a difusão do fármaco pela membrana intestinal. Fármacos como captopril e alendronato (classe III) apresentam redução na absorção após a administração pós-prandial (FLEISHER et al, 1999; CUSTODIO et al, 2008). Desta forma, a partir dos resultados do estudo de bioequivalência pós-prandial, cujo CV intra-individual apresentou-se acima de 30%, inferiu-se que o fármaco pantoprazol poderia ser classificado como classe III (BCS).

Para a classificação provisional (KASIM et al, 2004; TAKAGI et al, 2006) do pantoprazol foram considerados os parâmetros número de dose (Do) para caracterizar a solubilidade, bem como os valores de log P e cLog P (lipossolubilidade) para caracterizar a permeabilidade do fármaco. O valor obtido

do número de dose foi inferior a 1 (Tabela 12), permitindo classificar o pantoprazol como de alta solubilidade (TAKAGI et al, 2006). Entretanto, os dados de log P e clog P obtidos do programa ChemDraw não permitiram uma definitiva classificação o fármaco pantoprazol como de baixa ou alta permeabilidade, já que tais valores apresentaram-se, respectivamente, inferiores e superiores aos do fármaco metoprolol (Tabela 12). O metoprolol é empregado como referência, pois é um fármaco classe I, isto é, de alta solubilidade e permeabilidade ($P_{eff} = 1.34 \cdot 10^{-4}$ cm/s; $f_a = 1$) de acordo com TAKAGI et al (2006). Assim, a permeabilidade ($P_{eff} = 0.47 \cdot 10^{-4}$ cm/s) do fármaco pantoprazol foi calculada empregando-se o programa ADME Predictor (Simulations Plus, USA). A partir desse dado, também foi calculada a fração absorvida ($f_a = 0.44$), o que permitiu a classificação do fármaco pantoprazol como de baixa permeabilidade. Desta forma, considerando os dados obtidos de solubilidade e permeabilidade, pôde-se classificar o fármaco pantoprazol como classe III (BCS) (Tabela 12). Estudos anteriormente publicados (JANTRATID et al, 2006; TAKAGI et al, 2006) demonstram que fármacos classe III, como cimetidina, atenolol e ranitidina, apresentaram valores de permeabilidade ($P_{eff} = 0.35, 0.2$ e $0.27 \cdot 10^{-4}$ cm/s) semelhantes ao obtido para o pantoprazol nesse estudo.

Considerando o conceito da classificação biofarmacêutica da disposição de fármacos – BDDCS (BENET et al, 2005; CUSTODIO et al, 2008), o pantoprazol também seria classificado como classe III, já que apresenta extenso metabolismo hepático (MICROMEDEX, 2008) e alta solubilidade em água (MERCK INDEX, 2006).

O conceito de classificação biofarmacêutica apresentado por AMIDON et al (1995) e, posteriormente, oficializada pelo FDA (2000) não considera apenas a classificação do fármaco, mas também da formulação, já que excipientes podem afetar a permeabilidade e a solubilidade do princípio ativo (REGE et al, 2001).

Recentemente, os trabalhos de ROSSI et al (2007) e ROUINI et al (2008) demonstraram que formulações que contenham fármacos classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) e excipientes que não alterem a solubilidade

do fármaco apresentam correlação *in vitro* – *in vivo* (IVIVC) linear, visto que nesse caso a solubilidade apresenta-se como fator limitante para a absorção. Porém, no caso de fármacos classe III, cuja permeabilidade é fator limitante para a absorção, a correlação *in vitro* – *in vivo* estabelecida, geralmente, é não-linear. Contudo, tal correlação pode tender a linearidade caso algum fator ligado à formulação altere a solubilidade ou a velocidade de dissolução do fármaco (JANTRATID et al, 2006). Assim, para avaliar o comportamento das formulações teste e referência, os dados de dissolução das formulações *in vitro* foram correlacionados com as frações absorvidas *in vivo*.

As porcentagens dissolvidas em função do tempo obtidas dos ensaios no aparato 2 foram eleitas para a construção da correlação já que nesse aparato os tempos de coletas foram mais extensos (até 180 minutos) e as formulações apresentaram menores velocidades de dissolução, permitindo a comparação dos perfis por meio do cálculo de f_2 (Figura 16 e Tabela 5).

As frações absorvidas em função do tempo, obtidas a partir dos gráficos de concentrações plasmáticas versus tempo, para as formulações teste e referência dos estudos em jejum e pós-prandial foram calculadas por meio de deconvolução (Figuras 26 e 27). O modelo de Loo-Riegelman foi aplicado aos dados dos estudos em jejum e pós-prandial, visto que a farmacocinética do pantoprazol, quando aplicada à análise compartimental, pôde ser descrita utilizando-se um modelo bi-compartimental (Figuras 24 e 25). A caracterização da absorção por Loo-Riegelman exige a utilização de dados farmacocinéticos (micro-constantes) obtidos após a administração intravenosa do fármaco (LEBLANC, 1997). Assim, de acordo com procedimentos adotados por LOBENBERG et al (2000), os dados plasmáticos da administração em jejum do fármaco pantoprazol (formulação referência), a partir do valor de C_{max} , foram empregados para o cálculo das micro-constantes do modelo intravenoso.

As relações *in vitro* – *in vivo* (IVIVR) obtidas para as formulações teste e referências foram não-lineares (Figuras 30 e 31), demonstrando que as formulações também se comportaram como classe III, isto é, nenhum dos

excipientes utilizados em tais formas farmacêuticas orais alterou as características biofarmacêuticas do pantoprazol. O estudo de JANTRATID et al (2006) demonstrou que modificações no revestimento de formulações contendo fármaco classe III podem determinar a alteração de comportamentos *in vitro* não-lineares para lineares, já que tais revestimentos podem modular a liberação do fármaco da forma farmacêutica. CORRIGAN et al (2003) também demonstraram que o comportamento *in vitro* de formulações contendo fármacos classe II, em especial ácidos fracos, tende a uma IVIVR não linear quando tais formulações são avaliadas em meio básico (pH=6.8).

Além do comportamento não-linear observado nas Figuras 30 e 31, a aplicação da equação que descreve tal modelo (Polli et al, 1996) permitiu a determinação de valores de alfa ($\alpha < 1$) que confirmaram que a permeabilidade é fator limitante para a absorção do fármaco pantoprazol. O parâmetro alfa ($\alpha = k_p/k_d$) para os estudos em jejum e pós-prandial apresentaram, respectivamente, valores ao redor de 0.05 e 0.5. Os valores superiores de alfa no estudo pós-prandial caracterizam a influência da alimentação na permeabilidade e conseqüentemente absorção do pantoprazol (Figuras 28 e 29). A Figura 31 que descreve a IVIVR para as formulações em situação pós-prandial apresenta fração máxima dissolvida ao redor de 70% devido a instabilidade do pantoprazol no meio cujo pH foi igual a 6.0.

Assim, como o fármaco pantoprazol foi classificado provisionalmente como de classe III, formulações que contenham tal substância poderiam ser avaliadas por meio de estudos de bioequivalência *in vitro*, desde que fossem considerados os guias de bioisenção da WHO (WHO, 2005) e EMEA (EMEA, 2008). Entretanto, no Brasil até o momento não há resoluções que norteiem o registro de tais formulações empregando-se o conceito da classificação biofarmacêutica. Além disso, o fato de as formulações avaliadas nesse estudo apresentarem frações dissolvidas acima de 85% em 40 – 60 minutos também poderia comprometer a aprovação da bioisenção por parte do órgão regulatório. Entretanto, deve-se considerar que o conceito de porcentagem dissolvida acima

de 85% em até 15 ou 30 minutos aplica-se, exclusivamente, a formulações de liberação imediata (GUPTA et al, 2006). A formulação de pantoprazol avaliada nesse estudo apresentou revestimento gastro-resistente e dessa forma liberação retardada. As Figuras 16 e 17 (aparato 2) demonstram que as formulações apresentaram um *lag time* de aproximadamente 15 - 20 minutos. Assim, não se pode ignorar a possibilidade de bioisenção para formulações contendo o fármaco pantoprazol, desde que os perfis de dissolução (em pH 6.8) demonstrem rápida liberação do fármaco da forma farmacêutica e que sejam comprovadas experimentalmente a alta solubilidade e permeabilidade do princípio ativo. Além disso, o pantoprazol é um fármaco de ampla faixa terapêutica, bem tolerado, seguro e cuja disposição cinética não se correlaciona de forma temporal com a resposta terapêutica (JUNGNICKEL et al, 2000).

Finalmente, a aplicação do conceito de bioisenção para fármacos classe I (FDA e EMEA), amplamente aceita nos Estados Unidos e na Comunidade Européia, e a possibilidade futura de bioisenção para fármacos classe II (WHO, 2005) e/ou classe III (WHO, 2005; EMEA, 2008), devem ser considerados por países em desenvolvimento como o Brasil, já que podem determinar benefícios econômicos, éticos e sociais. Os benefícios econômicos podem ser entendidos como os menores custos relativos à condução de estudos de dissolução, solubilidade e permeabilidade em comparação aos estudos de bioequivalência. Os benefícios éticos estariam relacionados a não realização de ensaios que avaliassem o comportamento *in vivo* de formulações e os benefícios sociais relacionados a maior acessibilidade da população aos medicamentos, devido ao menor custo para a produção do produto acabado.

Entretanto, a afirmação acima não deseja desvalorizar o histórico da realização de estudos de bioequivalência *in vivo* no Brasil, mas simplesmente fomentar a discussão sobre a possibilidade de realização de estudos *in vitro* para o registro de medicamentos genéricos e similares. Essa afirmação considera as constantes discussões internacionais sobre o assunto que, recentemente, culminaram no lançamento de uma consulta pública pela EMEA (EMEA, 2008)

sobre a bioisenção para fármacos classe I e III e de resoluções pelo Instituto de Saúde Pública do Chile (ISPCH) que nortearão o registro de medicamentos genéricos naquele país a partir do conceito da classificação biofarmacêutica (ISPCH, 2008).

6- CONCLUSÃO

- Os estudos *in vivo* demonstraram que as formulações teste e referência foram bioequivalentes somente quando o ensaio foi conduzido em jejum. Além disso, o estudo pós-prandial demonstrou que a alimentação influencia na absorção do pantoprazol;
- Os estudos *in vitro* empregando os meios biorelevantes nos aparatos 2 e 3 demonstraram que as formulações teste e referência apresentaram os mesmos perfis de dissolução. Além disso, as formulações liberaram acima de 85% do fármaco em até 60 minutos, o que caracteriza uma rápida liberação, considerando que a formulação é de liberação retardada e o tempo de trânsito no intestino delgado é de aproximadamente 180 minutos;
- A avaliação *in silico*, utilizando programas computacionais específicos e o conceito de classificação provisional, permitiram a inclusão do pantoprazol no grupo de fármacos intitulados como de classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade);
- A construção da relação *in vitro* – *in vivo* (IVVIR), utilizando dados de dissolução do aparato 2 e dados de fração absorvida dos estudos *in vivo*, permitiram caracterizar um comportamento não-linear, o que demonstra que as formulações teste e referência não apresentaram excipientes que alterassem a solubilidade ou a permeabilidade do fármaco.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIDON GL, SINKO PJ, FLEISHER D. Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharm Res* 5: 651-654, 1988.

AMIDON GL, LENNERNÄS H, SHAH VP, CRISON JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* v.12, n.3, p.413-420, 1995.

APOSTOLOU C, DOTSIKAS Y, KOUSOULOS C, TSATSOU G, COLOCOURI F, SOUMELAS GS, LOUKAS YL. Application of a semi-automated 96-well format solid-phase extraction, column-switching, fluorescence detection protocol for the determination of alendronate in human urine samples obtained from a bioequivalence study. *Pharm Biomed Anal.* v.43, n.3, p.1151-5, 2007

ATANASOVA I, BOZHINOVA K, TODOROVA D, TERZIIVANOV D. Pharmacokinetics and comparative bioavailability of two metformin formulations after single-dose administration in healthy subjects. *Clin Drug Investig.* v.23, n.11, p.743-9, 2003

BENET LZ, ZECH K. Pharmacokinetics--a relevant factor for the choice of a drug? *Aliment Pharmacol Ther.* v.8 Suppl 1, p.25-32, 1994.

BERMEJO M. Curso Internacional Biofarmácia 1/2. [S. l.: s. n.], 2000. n.p. Apostila.

BRANDSTROM A, LINDBERG P, BERGMAN NA, ALMINGER T, ANKNER K, LJUNGGREN U, LAMM B, NORDBERG P, ERICKSON M, GRUNDEVIK I, HAGIN I, HOFFMANN KJ, JOHANSSON S, LARSSON S, LIOFBERG O, OHLSON K, PERSSON B, SKANBERG I, TEKENBERGSHJELTE L. Chemical reactions of omeprazole and omeprazole analogues. *Acta Chem Scand.* v.43, p.536611, 1989

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde, Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br>. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. RDC nº 133, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. RDC nº 134, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a adequação dos medicamentos já registrados. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. RDC nº 16, de 2 de março de 2007. Determina a publicação do “Regulamento Técnico para medicamentos genéricos”. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. RDC nº 17, de 2 de março de 2007. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. RE nº 482, de 19 de março de 2002. Determina a publicação do Guia para Estudos de Correlação In Vitro-In Vivo (CIVIV). Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. RE nº 894, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para protocolo e relatório técnico de estudo de bioequivalência anexo. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. RE nº 897, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência, em anexo. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. RE nº 898, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência anexo. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. Resolução 1170, de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. Resolução 310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do “Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução”. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

BRASIL. Resolução nº 391, de 09 de agosto de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 14 out 2007

CACACE J, REILLY EE, AMANN A. Comparison of the Dissolution of Metaxalone Tablets (Skelaxin) Using *USP* Apparatus 2 and 3. *AAPS PharmSciTech* v.5, p.E6, 2004

CAMPOS DR, VIEIRA NR, BERNASCONI G, BARROS FA, MEURER EC, MARCHIORETTO MA, COELHO EC, CALAFATTI SA, SOMMER C, COUTO JM, BURANELLO S, SILVA AR, AMARANTE AR, ABIB E, JÚNIOR JP. Bioequivalence of two enteric coated formulations of pantoprazole in healthy volunteers under fasting and fed conditions. *Arzneimittelforschung*. v.57, n.6, p.309-314, 2007.

CHEER SM, PRAKASH A, FAULDS D, LAMB HM. Pantoprazole: an update of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of acid-related disorders. *Drugs*. v.63, n.1, p.101-33, 2003.

CORRIGAN OI, DEVLIN Y, BUTLER J. Influence of dissolution medium buffer composition on ketoprofen release from ER products and in vitro-in vivo correlation. *Int J Pharm.* v.254, n.2, p.147-54, 2003.

CUSTODIO JM, WU CY, BENET LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* v.60, n.6, p.717-33, 2008.

DAVIS SS, HARDY JG, FARA JW. Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut.* v.27, n.8, p.886-92, 1986

DAVIS SS, HARDY JG, TAYLOR MJ, WHALLEY, DR, WILSON, CG. A comparative study of the gastrointestinal transit of a pellet and tablet formulations. *Int J Pharm.* v.21, p.167 – 177, 1984.

DEF 2006/2007: dicionário de especialidades farmacêuticas. 35.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2006. p.602.

DIAS C.R.C. Medicamentos genéricos no Brasil: 1999 a 2002. Análise da legislação, aspectos conjunturais e políticos. São Paulo, 2003. 120p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública – USP)

DILIBERTI, C. E. Why Bioequivalence of highly variable drug is an issue. Disponível em: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/slides/4034S2_02_DiLiberti.ppt. Acesso em: 20 de agosto de 2005

DRESSMAN JB, AMIDON GL, REPPAS C, SHAH VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res.* v.15, n.1, p.11-22, 1998.

DRESSMAN JB, BERARDI RR, DERMENTZOGLOU LC, RUSSELL TL, SCHMALTZ SP, BARNETT JL, JARVENPAA KM. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm Res.* v.7, n.7, p.756-61, 1990

DRUGBANK. Disponível em: www.drugbank.com. Acesso em: 14 out 2007

EKPE A, JACOBSEN T. Effect of various salts on the stability of lansoprazole, omeprazole and pantoprazole as determined by high-performance liquid chromatography. Drug Dev Ind Pharm. v.25, n.9, p.1057-1065, 1999

EMAMI J. In vitro - in vivo correlation: from theory to applications. J Pharm Pharm Sci. v.9, n.2, p.169-89, 2006

EMA. Concept paper on BCS-based biowaiver. Londres: EMA, 2007. 3p.

FDA. Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Rockville: FDA. 2000. 13p.

FDA. Recommended Dissolution Methods. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/>. Acesso em: 02 março de 2007.

FILIPPE A, ALMEIDA S, SPINOLA ACF, NEVES R, TRABELSI F, TORNS A, SHINK E. Bioequivalence study of two enteric-coated formulations of pantoprazole in healthy volunteers under fed conditions. Arzneimittelforschung, v. 58, n.9, p.451-6, 2008

FORD SL, WIRE MB, LOU Y, BAKER KL, STEIN DS. Effect of antacids and ranitidine on the single-dose pharmacokinetics of fosamprenavir. Antimicrob Agents Chemother. v.49, n.1, p.467-9, 2005

FUJIOKA Y, METSUGI Y, OGAWARA K, HIGAKI K, KIMURA T. Evaluation of in vivo dissolution behavior and GI transit of griseofulvin, a BCS class II drug. Int J Pharm. v.352, n.1-2, p.36-43, 2008

FURUTA T, SHIRAI N, SUGIMOTO M, NAKAMURA A, HISHIDA A, ISHIZAKI T. Influence of CYP2C19 pharmacogenetic polymorphism on proton pump inhibitor-based therapies. Drug Metab Pharmacokinet. v.20, n.3, p.153-67, 2005

GALIA E, NICOLAIDES E, HÖRTER D, LÖBENBERG R, REPPAS C, DRESSMAN JB. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res.* v.15, n.5, p.698-705, 1998

GOODMAN A. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 10 ed. McGraw-Hill, 2001. 2025p.

FDA. *Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.* Rockville: FDA. 2000. 13p.

GUPTA E, BARENDS DM, YAMASHITA E, LENTZ KA, HARMSZE AM, SHAH VP, DRESSMAN JB, LIPPER RA. Review of global regulations concerning biowaivers for immediate release solid oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci.* v.29, n.3-4, p.315-24, 2006

ISPCH. *Guía G BIOF 02.* Disponível em: www.ispch.cl. Acesso em: 02 março de 2008.

JANTRATID E, PRAKONGPAN S, AMIDON GL, DRESSMAN JB. Feasibility of biowaiver extension to biopharmaceutics classification system class III drug products: cimetidine. *Clin Pharmacokinet.* v.45, n.4, p.385-399, 2006

JOHNSON CE. Stability of pantoprazole in 0.9% sodium chloride injection in polypropylene syringes. *Am J Health Syst Pharm.* v.62, n.22, p.2410-2, 2005

JUNGNICKEL PW. Pantoprazole: a new proton pump inhibitor. *Clin Ther.* v.22, n.11, p.1268-93, 2000

KASIM NA, WHITEHOUSE M, RAMACHANDRAN C, BERMEJO M, LENNERNÄS H, HUSSAIN AS, JUNGINGER HE, STAVCHANSKY SA, MIDHA KK, SHAH VP, AMIDON GL. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm.* v.1, n.1, p.85-96, 2004.

KATORI N, AOYAGI N, TERAO T. Estimation of agitation intensity in the GI tract in humans and dogs based on in vitro/in vivo correlation. Pharm Res. v.12, p. 237-43, 2005

KHAN MZ, RAUSL D, RADOSEVIĆ S, FILIĆ D, DANILOVSKI A, DUMIĆ M, KNEZEVIĆ Z. Classification of torasemide based on the Biopharmaceutics Classification System and evaluation of the FDA biowaiver provision for generic products of CLASS I drugs. J Pharm Pharmacol. v.58, n.11, p.1475-82, 2006

KLEIN S, BUTLER J, HEMPENSTALL JM, REPPAS C, DRESSMAN JB. Media to simulate the postprandial stomach I. Matching the physicochemical characteristics of standard breakfasts. J Pharm Pharmacol. v.56, n.5, p.605-10, 2004

KLEIN S, RUDOLPH MW, DRESSMAN J. Drug release characteristics of four mesalazine products using USP apparatus 3 to simulate passage through the GI tract. Dissolution Technologies. v.9, n.4, p.6-14, 2002

KLEIN S, RUDOLPH MW, SKALSKY B, PETEREIT HU, DRESSMAN JB. Use of the BioDis to generate a physiologically relevant IVIVC. J Control Release. v.130, n.3, p.216-9, 2008

KLEIN S, STEIN J, DRESSMAN J. Site-specific delivery of anti-inflammatory drugs in the gastrointestinal tract: an in-vitro release model. J Pharm Pharmacol. v.57, n.6, p.709-19, 2005

KLEIN, S. Biorelevant Dissolution Test Methods for Modified Release Dosage Forms. Frankfurt am Main, 2005. 312p. (Tese de Doutorado – Johann Wolfgang Goethe-Universität)

KRISHNA R, YU L. Biopharmaceutics applications in drug development. 1ed. Springer, 2008. 396p.

LE-BLANC P. Tratado de Biofarmácia e Farmacocinética. Instituto Piaget, 2000. 150p.

LÖBENBERG R, KRÄMER J, SHAH VP, AMIDON GL, DRESSMAN JB. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: dissolution behavior of glibenclamide. *Pharm Res.* v.17, n.4, p.439-44, 2000

MARQUES M. Dissolução. [S. l.: s. n.], 2000. n.p. Apostila.

MARQUES M. Dissolution Media Simulating Fasting and Fed States. *Dissolution Technologies*, 2004

MENDES FD, PATNI AK, REYER S, MONIF T, MOREIRA LD, ILHA JO, MENDES GD, DE NUCCI G. Comparative bioavailability study with two pantoprazole delayed-released tablet formulations administered with and without food in healthy subjects. *Arzneimittelforschung.* v.58, n.3, p.141-8, 2008

MICROMEDEX. Drug Dex. Disponível em: <http://www.portaldapesquisa.com.br/databases/login?&action=bye>. Acesso em: 20 de agosto de 2005.

MIDHA KK, SHAH VP, SINGH GJ, PATNAIK R. Conference report: Bio-International 2005. *J Pharm Sci.* v.96, n.4, p.747-54, 2007

OLBE L, CARLSSON E, LINDBERG P. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nature Reviews Drug Discovery.* v.2, p.132-139, 2003

OKUMU A, DIMASO M, LÖBENBERG R. Dynamic Dissolution Testing To Establish In Vitro/In Vivo Correlations for Montelukast Sodium, a Poorly Soluble Drug. *Pharm Res.* 2008 (no prelo).

PERES O, OLIVEIRA CH, BARRIENTOS-ASTIGARRAGA RE, REZENDE VM, MENDES GD, DE NUCCI G. Determination of pantoprazole in human plasma by LC-MS-MS using lansoprazole as internal standard. *Arzneimittelforschung.* v.54, n.6, p.314-9, 2004

POLLI J.E. In Vitro Studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetics In Vivo studies in assessing bioequivalence of immediate release solid oral dosage forms. [S. l.: s. n.], 2000. n.p. Apostila.

POLLI JE, CRISON JR, AMIDON GL. Novel approach to the analysis of in vitro-in vivo relationships. J Pharm Sci. v.85, n.7, p.753-60, 1996

REGE BD, YU LX, HUSSAIN AS, POLLI JE. Effect of common excipients on CaCo-2 transport of low-permeability drugs. J Pharm Sci, 90 (11): 1776-1786, 2001

RAFFIN RP, COLOMÉ LM, POHLMANN AR, GUTERRES SS. Preparation, characterization, and in vivo anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. Eur J Pharm Biopharm. v.63, n.2, p.198-204, 2006

ROHRS BR, BURCH-CLARK DL, WITT MJ, STELZER DJ. USP dissolution apparatus 3 (reciprocating cylinder): instrument parameter effects on drug release from sustained release formulations. J Pharm Sci. v.84, n.8, p.922-6, 1995.

ROSSI RC, DIAS CL, DONATO EM, MARTINS LA, BERGOLD AM, FRÖEHLICH PE. Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules based on in vivo data. Int J Pharm. v. 29; n. 338, p.119-24, 2007

ROUINI M-R, ARDAKANI YH, MIRFAZAEIAN A, HAKEMI L, BALUCHESTANI M. Investigation on different levels of In Vitro – In Vivo correlation: Gemfibrozil immediate release capsule. Biopharm Drug Dispos. 2008 (no prelo).

SAKURAI M, NARUTO I, MATSUYAMA K. Evaluation of zero-order controlled release preparations of nifedipine tablet on dissolution test, together with cost benefit point of view. Yakugaku Zasshi. v.128, n.5, p.819-26, 2008

SHELLEKENS RCA, STUURMAN FE, VAN DER WEERT FHJ, KOSTERINK JGW, FRIJLINK HW. A novel dissolution method relevant to intestinal release behaviour and its application in the evaluation of modified release mesalazine products. Eur J Pharm Sci. v. 30, p. 15-20, 2007

SHAH VP, TSONG Y, SATHE P, LIU JP. In vitro dissolution profile comparison-- statistics and analysis of the similarity factor, f2. Pharm Res. v.15, n.6, p.889-96, 1998.

SOUZA J, FREITAS ZMF, STORPIRTIS S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. Rev Bras Cienc Farm. v.23, n.4, 2007

STORPIRTIS S. Biofarmacotécnica. Fundamentos de Biodisponibilidade, Bioequivalência, Dissolução e Intercambialidade de Medicamentos Genéricos. São Paulo: [n.s], 1999. 78p.

TAKAGI T, RAMACHANDRAN C, BERMEJO M, YAMASHITA S, YU LX, AMIDON GL. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. Mol Pharm. v.3, n.6, p.631-643, 2006

TAYROUZ Y, DING R, BURHENNE J, RIEDEL KD, WEISS J, HOPPE-TICHY T, HAEFELI WE, MIKUS G. Pharmacokinetic and pharmaceutic interaction between digoxin and Cremophor RH40. Clin Pharmacol Ther. v.73, n.5, p.397-405, 2003

THASE ME. Efficacy and tolerability of once-daily venlafaxine extended release (XR) in outpatients with major depression. The Venlafaxine XR 209 Study Group. Clin Psychiatry. v.58, n.9, p.393-8, 1997

UNITED States Pharmacopeia. 31.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

VOGELPOEL H, WELINK J, AMIDON GL, JUNGINGER HE, MIDHA KK, MÖLLER H, OLLING M, SHAH VP, BARENDT DM. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. J Pharm Sci. v.93, n.8, p.1945-1956, 2004.

WEI H, LÖBENBERG R. Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug. Eur J Pharm Sci. v.29, n.1, p.45-52, 2006

WHO. Proposal to waive *in vivo* bioequivalence requirements for the WHO Model List of Essential Medicines immediate release, solid oral dosage forms. Suíça: WHO. 2005. 45p.

YEH KC, DEUTSCH PJ, HADDIX H, HESNEY M, HOAGLAND V, JU WD, JUSTICE SJ, OSBORNE B, STERRETT AT, STONE JA, WOOLF E, WALDMAN S. Single-dose pharmacokinetics of indinavir and the effect of food. Antimicrob Agents Chemother. v.42, n.2, p.332-8, 1998

YU LX, WANG JT, HUSSAIN AS. Evaluation of USP apparatus 3 for dissolution testing of immediate-release products. AAPS PharmSci. v.4, n.1, p.E1, 2002

YUKSEL N, KANIK AE, BAYKARA T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and independent methods. Int J Pharm. v.209, n.1-2, p.57-67, 2000

8- ANEXOS

ANEXO 1- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA (CEP)

Comitê de Ética em Pesquisa – Ciências Biológicas e da Saúde – USF



Bragança Paulista, 15 de fevereiro de 2005.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – USF

Projeto de Pesquisa: “Estudo da Biodisponibilidade de uma Formulação de Pantoprazol comprimido revestido de 40 mg da Medley S/A Indústria Farmacêutica (formulação teste) *versus* uma Formulação de Pantoprazol comprimido revestido de 40 mg do Produto de Referência da Altana Pharma Ltda. (Pantoc®) em Voluntários Sadios de Ambos os Sexos em jejum.”

Autores: Prof. Dr. José Pedrazolli Jr.

Protocolo nº. CEP/CBS – 13/05

Prezado(a) Prof.(a),

O CEP/CBS-USF, em reunião ordinária realizada no dia 10 de fevereiro de 2005, analisou o projeto de pesquisa supra-citado, sob a responsabilidade de V.Sa.. Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Atenciosamente,

Prof. Dra. Maria Betânia de Oliveira Garcia
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Área de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA
CÂMPUS DE ITATIBA
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO

Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 227-8183

Bragança Paulista, 15 de fevereiro de 2005.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – USF

Projeto de Pesquisa: “Estudo da Biodisponibilidade de uma Formulação de Pantoprazol comprimido revestido de 40 mg da Medley S/A Indústria Farmacêutica (formulação teste) *versus* uma Formulação de Pantoprazol comprimido revestido de 40 mg do Produto de Referência da Altana Pharma Ltda. (Pantoc®) em Voluntários Sadios de Ambos os Sexos pós-prandial.”

Autores: Prof. Dr. José Pedrazolli Jr.

Protocolo nº. CEP/CBS – 15/05

Prezado(a) Prof.(a),

O CEP/CBS-USF, em reunião ordinária realizada no dia 10 de fevereiro de 2005, analisou o projeto de pesquisa supra-citado, sob a responsabilidade de V.Sa.. Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Atenciosamente,



Prof. Dra. Maria Betânia de Oliveira Garcia
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Área de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA
CÂMPUS DE ITATIBA
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO

Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 227-8183

ANEXO 2- Tabela de Randomização

Pantoprazol *versus* Pantoc® Altana

Número	Sexo	(JEJUM)	
		Período 1	Período 2
1	M	T	R
2	F	R	T
3	M	R	T
4	F	T	R
5	M	T	R
6	F	R	T
7	M	R	T
8	F	T	R
9	M	T	R
10	F	R	T
11	M	R	T
12	F	T	R
13	M	T	R
14	F	R	T
15	M	R	T
16	F	T	R
17	M	T	R
18	F	R	T
19	M	R	T
20	F	T	R
21	M	T	R
22	F	R	T
23	M	R	T
24	F	T	R
25	M	T	R
26	F	R	T
27	M	R	T
28	F	T	R

F: Feminino; **M;** Masculino; **R:** Referência; **T:** Teste;

Pantoprazol *versus* Pantoc® Altana

		(PÓS-PRANDIAL)	
Número	Sexo	Período 1	Período 2
1	M	T	R
2	F	R	T
3	M	T	R
4	F	R	T
5	M	R	T
6	F	R	T
7	M	R	T
8	F	R	T
9	M	R	T
10	F	T	R
11	M	R	T
12	F	T	R
13	M	T	R
14	F	T	R
15	M	T	R
16	F	R	T
17	M	T	R
18	F	T	R
19	M	T	R
20	F	R	T
21	M	T	R
22	F	R	T
23	M	R	T
24	F	R	T
25	M	T	R
26	F	R	T
27	M	R	T
28	F	T	R
29	M	T	R
30	F	R	T
31	M	T	R
32	F	T	R
33	M	T	R
34	F	R	T
35	M	R	T

36	F	T	R
37	M	R	T
38	F	R	T
39	M	T	R
40	F	T	R
41	M	T	R
42	F	R	T
43	M	R	T
44	F	R	T
45	M	T	R
46	F	T	R
47	M	R	T
48	F	R	T
49	M	T	R
50	F	R	T
51	M	T	R
52	F	T	R
53	M	R	T
54	F	T	R
55	M	R	T
56	F	R	T
57	M	T	R
58	F	R	T
59	M	R	T
60	F	T	R
61	M	T	R
62	F	R	T
63	M	T	R
64	F	T	R
65	M	T	R
66	F	T	R
67	M	R	T
68	F	T	R
69	M	R	T
70	F	T	R
71	M	R	T
72	F	R	T

F: Feminino; **M;** Masculino; **R:** Referência; **T:** Teste;

