

LEONARDO AUGUSTO MORAES

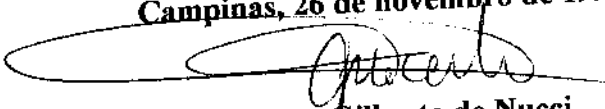
**"ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES DE
COMPRIMIDOS DE FLUCONAZOL EM VOLUNTÁRIOS SADIOS"**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso
de Pós-Graduação em Farmacologia da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título
de Mestre em Ciências na área de
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título
de Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia do
Farmacêutico Leonardo Augusto de Moraes.

Campinas, 26 de novembro de 1997


Prof. Dr. Gilberto de Nucci
- Orientador -

M791e

33142/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

980812

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
TÍTULO	
INSCRIÇÃO	
V. Ex.	
TOMBO BC	33142
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/03/98
N.º CPD	

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

CM-00107392-1

M791e

Moraes, Leonardo Augusto

"Estudo de bioequivalência de duas formulações de comprimidos de fluconazol em voluntários sadios" / Leonardo Augusto Moraes.
Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador : Gilberto de Nucci

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Farmacocinética. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Gilberto de Nucci. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

1. Prof. Dr. Gilberto de Nucci

2. Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

3. Prof. Dr. Antônio Roberto Martins

**Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 26/11/97

***“Adesso è il momento, hai il tempo
Per capire, di avere occhi sinceri”.***

**“Aos meus pais, pela formação, incentivo e compreensão pela
minha ausência nos momentos difíceis”**

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela amizade, oportunidade e formação de “maturidade”.

Aos amigos Wellington Ribeiro e Anicleto Poli, pela orientação, apoio nos momentos de dificuldades e acima de tudo pelo respeito e amizade.

Aos amigos do departamento de Farmacologia, Alessandra Linardi, Ana Maria Grégio, Ana Paula Peixoto, Carla Fernanda F. Penteado, Eduardo Abib Jr., Evandro Miranda, Ivani Ap. Souza, Iramaia M. Binhara, Marta Valéria Medeiros, Marta Pitalli, Maria Lúcia Martins, Pamela Liliane M.G. Bento, Rogério Castro, Renata Pereira, Simone Teixeira, Sonia Regina e Wladimir M. Gordo, pelos momentos de descontração e amizade.

Ao carinho especial em todos os momentos da Dra. Elen Landucci, *“una brava donna in mio cuore”*

Aos amigos Alexandre Moretti, Angela Sá, Cláudio Gaspar e Rosângela Sestari pela eterna amizade e apoio.

Aos Professores Dr. Alexandre P. Corrado, Dr. Edson Antunes, Dr. Heitor Moreno Júnior e Dr. Stephen Hyslop pelo apoio e amizade no decorrer de todo o mestrado.

Aos demais colegas e professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial Maria das Dores Ponciano, Alessandra Ponciano, Maria Rita de Lima e Gislaine Elias Cilípio, pela paciência e eficiência.

À Capes e Fapesp pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

Resumo	2
Introdução Geral	4
Biodisponibilidade	7
Produtos Bioequivalentes	9
Estudo de Bioequivalência de duas formulações de comprimidos de fluconazol em voluntários sadios	10
Introdução	11
Objetivos	15
Materiais e Métodos	16
Validação da Metodologia de HPLC	22
Resultados	25
Discussão	34
Referências bibliográficas	38
Anexos	42
Abstract	43

Resumo

A avaliação da eficácia e segurança, bem como da qualidade farmacêutica são pré-requisitos para o registro de drogas em muitos países. Neste contexto, a qualidade da formulação não é unicamente caracterizada por investigações "in vitro", mas também por estudos de biodisponibilidade em voluntários sadios, que determinam importância na identificação de formas farmacêuticas que apresentam falhas terapêuticas e na seleção de similares disponíveis no mercado.

O United States Food and Drug Administration (US FDA), define que duas formulações farmacêuticas são consideradas equivalentes quando a concentração plasmática da droga *versus* tempo, quando administradas na mesma dose molar, nas mesmas condições, não apresentem diferenças significativas em relação a velocidade e extensão de absorção. (Bio - International 94)

Neste trabalho, avaliamos a bioequivalência de duas formulações de comprimidos de fluconazol: Fluconal, comprimidos 150mg, (Laboratório Libbs, formulação teste) *versus* Zoltec, comprimidos 150mg, (Laboratório Pfizer, formulação referência), em dezoito voluntários sadios do sexo masculino.

O protocolo clínico apresentava delineamento aleatório cruzado de dois períodos, com intervalo de quatorze dias entre as doses, aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário da Universidade Federal do Ceará - UFC.

A concentração plasmática de fluconazol foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detecção ultravioleta. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos de cada formulação de fluconazol, foram: área sob a curva da concentração plasmática em função do tempo ($AUC_{[0-48h]}$), concentração plasmática máxima obtida (C_{MAX}), tempo empregado para ser alcançada a C_{MAX} (t_{max}), área sob a curva extrapolada

para o infinito ($AUC_{[0-\infty]}$). Todos os parâmetros farmacocinéticos foram analisados por métodos estatísticos paramétricos e não-paramétricos.

As médias geométricas das razões individuais Zoltec/Fluconal foram 96.7 para $AUC_{[0-48h]}$ (IC 90% (81.7 - 114), 100.7 para $AUC_{[0-\infty]}$ (IC90% 85.6 - 118), e 77.4 para C_{max} (IC90% 66.7 - 133). A média aritmética para as diferenças individuais de T_{max} foi 1.7h, com IC 90% com valores estatisticamente diferentes de zero.

De acordo com os resultados obtidos e requerimentos determinados pelo FDA (USA), concluímos serem as duas formulações não bioequivalentes, tanto na extensão quanto na velocidade de absorção.

Introdução Geral

A síntese e o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos envolvem anos de pesquisa e grandes investimentos das indústrias farmacêuticas, visando a fornecer novas alternativas terapêuticas à classe médica e à população.

O Food and Drug Administration (FDA) requer que novas formulações de produtos já disponíveis no mercado sejam testadas em termos de bioequivalência que consiste em comparar a biodisponibilidade das formulações, ou seja, que a velocidade e a extensão de absorção não apresentem diferenças significativas em relação ao produto original.

O termo biodisponibilidade é utilizado para indicar a velocidade e quantidade à qual o ingrediente ativo de uma droga ou espécie terapêutica é absorvida a partir de um produto farmacêutico para ser disponível no sítio de ação da droga.

Formulações farmacêuticas diferentes, com o mesmo ingrediente ativo, podem não apresentar respostas farmacológicas idênticas, sendo que a biodisponibilidade da droga pode ser afetada pela forma farmacêutica que é apresentada.

Concluimos que estas formulações não possuem os mesmos efeitos de desintegração e dissolução pois, resultam em diferentes formas de cristais, tamanho das partículas ou outras características das drogas que não são controladas rigorosamente em suas formulações e na manufatura das suas preparações. O teste de bioequivalência é fundamental para o controle da qualidade dos medicamentos.

A resposta terapêutica da grande maioria dos fármacos depende fundamentalmente da interação entre suas moléculas com receptores farmacológicos específicos. Contudo, é fato perfeitamente conhecido que a relação existente dose e efeito de fármacos é muito variável entre os indivíduos. Tais variações dependem não só da dose, da gravidade da doença, das funções cardíaca-hepática-renal, da motilidade gastrointestinal, da atividade hormonal e da farmacocinética do fármaco.

Assim, várias fases estão envolvidas na resposta terapêutica do fármaco:

I - Fase Farmacêutica

II - Fase Farmacocinética

III - Fase Farmacodinâmica

I - Fase Farmacêutica

Compreende a desintegração e/ou a dissolução das formas farmacêuticas de apresentação e a sua administração, por via diferente da intravenosa. Nesta fase estão envolvidas: a) liberação do princípio ativo de sua formulação, b) dissolução. É importante diferenciar que a desintegração é simplesmente a fragmentação das formas farmacêuticas em partículas de menor tamanho. Embora a desintegração seja um pré-requisito para ocorrer a absorção do princípio ativo presente nas formulações, esta ocorrerá após a dissolução de suas partículas.

No caso específico de cápsulas gelatinosas, a dissolução ocorre em maior velocidade no meio ácido, resultando em rápida absorção quando comparada a absorção em forma de comprimidos e drágeas.

II - Fase Farmacocinética

Compreende a absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos fármacos. A fração da dose disponível para a absorção, constitui medida de biodisponibilidade.

III - Fase Farmacodinâmica

Compreende a interação de moléculas do fármaco livre com os receptores farmacológicos específicos. Destaca-se, entretanto, que o efeito farmacológico de um fármaco depende, entre outros fatores, de sua concentração na biofase dos receptores e no local de ação propriamente dito. Em alguns fármacos, como os antibióticos e

antiinflamatórios por exemplo, a eficácia clínica está relacionada com suas capacidades em atingir as áreas afetadas, sendo que em regiões pouco vascularizadas ocorrem respostas terapêuticas inadequadas. Para esses casos, o fármaco de escolha, bem como sua forma farmacêutica de apresentação, deverão ser aqueles que propiciem não só o aparecimento de níveis sangüíneos mais elevados mas, principalmente, que garantam maior concentração do fármaco no local de ação.

Biodisponibilidade

Determina a velocidade e quantidade à qual o ingrediente ativo de uma droga ou espécie terapêutica é absorvida a partir de um produto farmacêutico para ser disponível no sítio de ação da droga. A biodisponibilidade usualmente é determinada por medida: 1) da concentração do ingrediente ativo da droga, ou espécie terapêutica, ou do(s) seu(s) metabólito(s), em fluidos biológicos, em função do tempo; 2) da excreção urinária da espécie terapêutica ou do(s) seu(s) metabólito(s), em função do tempo, ou 3) de um efeito farmacológico agudo apropriado.

A liberação de um fármaco, a partir de uma forma farmacêutica, pode influenciar a velocidade e magnitude da absorção. A desintegração da forma de dosagem e a dissolução possuem um papel relevante na absorção do fármaco, pois, a maior parte deles são absorvidos por difusão passiva. A biodisponibilidade de um fármaco pode ser influenciada por vários fatores, tais como:

- **Fatores fisiológicos**, dentre os quais destacam-se a variabilidade inter-individual, com causas genéticas, doenças, idade, fluxo urinário, sangüíneo e uma variedade de fatores de caráter ambiental. O tempo de esvaziamento gástrico tem grande influência na absorção de um fármaco, principalmente naquele que é absorvido em sítio específico do trato gastrointestinal. No caso de fármacos que são absorvidos através do epitélio gástrico, a absorção é bastante favorecida pela sua maior permanência no estômago. Por isso, o uso de voluntários em jejum em investigações clínicas visa diminuir a variabilidade na absorção de drogas (*Wilson & Washington, 1989*).

A presença de alimentos pode influenciar a absorção de várias drogas, levando a um aumento ou diminuição do tempo de esvaziamento gástrico. O Diclofenaco de potássio apresenta sua velocidade de absorção diminuída em presença de alimento (*Poli et al., 1996*). Os líquidos digestivos secretados pela ingestão de alimento podem alterar a absorção da droga. O aumento da secreção da bile, influenciada pela ingestão de alimento, com seus componentes tensoativos e solubilizantes pode acelerar a dissolução e absorção de fármacos lipossolúveis.

A biodisponibilidade é afetada significativamente pelo chamado efeito de primeira passagem, o qual reduz a fração do fármaco que chega na circulação. Este efeito é produzido pela metabolização do fármaco na parede intestinal e sistema microsomal hepático.

- **Fatores farmacotécnicos**, que são os que apresentam maior importância, tais como: formulação farmacêutica, via de administração da droga, drogas administradas concomitantemente que podem afetar profundamente a biodisponibilidade dos fármacos numa forma farmacêutica. A natureza do sal ou composto usado, sua velocidade de dissolução *in vivo*, tamanho das partículas e seu estado físico, propriedades hidrófilas ou lipófilas de princípio ativo. Existe uma relação direta entre a biodisponibilidade e a velocidade de dissolução. A forma farmacêutica que libera rapidamente seu fármaco, à medida que ocorre a dissolução, tende a uma melhor absorção do que aqueles em que a liberação ocorre mais lentamente e de maneira incompleta. A adição de certos adjuvantes influi também na velocidade de absorção, o que é importante para a escolha de associações medicamentosas.

Equivalentes Farmacêuticos

São produtos que contêm quantidades idênticas do mesmo ingrediente ativo da droga, por exemplo o mesmo sal ou éster da mesma espécie terapêutica, em idênticas formas farmacêuticas, mas não necessariamente contendo os mesmos ingredientes inativos, e que apresentam a mesma qualidade, pureza, potência, uniformidade de conteúdo e velocidade de desintegração e/ou dissolução.

Produtos Bioequivalentes

São equivalentes farmacêuticos cuja velocidade e grau de absorção não mostram diferenças significativas quando são administrados na mesma dose molar da espécie terapêutica sob condições experimentais similares, seja como dose única ou múltipla.

A bioequivalência de duas ou mais formulações é determinada, utilizando-se parâmetros farmacocinéticos, que são:

- Área sobre a curva (AUC), que determina a extensão de absorção;
- Concentração máxima atingida (C_{max}), que expressa não somente a velocidade, mas também a extensão de absorção do fármaco em função do tempo (T_{max}).
- T_{max} que representa um índice de velocidade de absorção.
- C_{max}/T_{max} , que de acordo com *Endrenyi et al.* (1991), é uma medida que reflete melhor a velocidade de absorção.

**“ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES DE
COMPRIMIDOS DE FLUCONAZOL EM VOLUNTÁRIOS SÁDIOS”**

INTRODUÇÃO

Fluconazol [(difluor-2,4-fenil)-2-bis (1H-triazol-1,2)-4-y1-1)-1,3-propanol-2], com fórmula molecular $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ e peso molecular de 306.3, difere de outros azóis pela substituição de um grupo triazol na posição do grupo imidazol e pela adição de um segundo grupo triazólico com a inserção de dois átomos de flúor na posição 2 e 4 do anel aromático (fig.1). A inserção dos átomos de flúor no anel aromático, resulta em um aumento da polaridade e hidrossolubilidade da droga, podendo ser utilizada em forma parenteral (Ryckelynck *et al.* 1993).

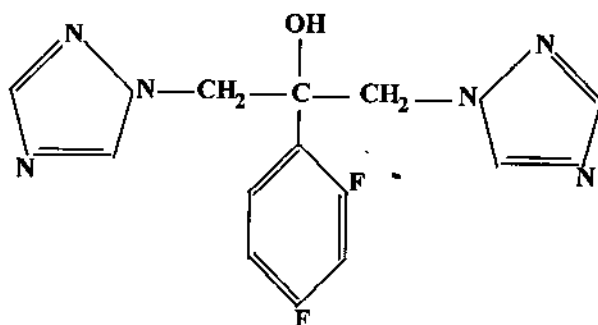


Figura 1 - Fluconazol

O fluconazol é um agente antifúngico bis-triazol, utilizado no tratamento de micoses sistêmicas e superficiais, infecções criptocóccicas em pacientes com AIDS (Koks *et al.* 1995), quimioterapia de câncer neutropênico (Foulds *et al.* 1988), histoplasmoze (kobayashi *et al.* 1986) e infecções superficiais por candida (Perfect *et al.* 1986; Richardson *et al.* 1985).

O mecanismo de ação do fluconazol se dá pela inibição do citocromo P-450 fúngica, mediada pela C-14 dimetilase, o que inibe a conversão do lanosterol para ergosterol, levando a destruição da membrana celular fúngica (Thomas *et al.* 1986). Acredita-se que a inibição da síntese de ergosterol conduz a acumulação de esteróides não funcionais e a ruptura da função da membrana normal, incluindo a

coordenação de síntese, a atividade dos esteróides contidos na membrana e a preservação da permeabilidade normal.

O fluconazol apresenta especificidade alta para fungos, opondo-se ao sistema citocromo P450 de mamíferos. Por exemplo, a α -dimetilase de ratos requer uma concentração 10.000 maior de fluconazol para causar uma redução em 50% da atividade enzimática quando comparada à concentração necessária para inibir a α -dimetilase da *Candida albicans* (Shaw et al., 1987).

A droga apresenta um efeito bifásico, uma fase inibitória, seguida de uma fase de indução enzimática (Ryckelynck et al. 1993). Morita et. al. (1992), descrevem que o fluconazol pode ser um potente inibidor de isoenzimas da citocromo P-450, que são responsáveis pelo metabolismo de muitas drogas, como a teofilina, fenitoína, ciclosporina e rifabutina.

A biodisponibilidade após a administração oral excede 90% (Humphrey et al. 1985; Brammer & Tarbit 1987), sendo sua absorção independente de pH e sua eliminação inalterada, por excreção renal (Koks et al. 1993). Washton et al. (1989), relatam que a absorção do fluconazol não é afetada em presença de alimento, mas que o alimento retarda o T_{max} em até 4 horas, após a administração da dose. Apresenta uma baixa ligação com proteínas plasmáticas (11-12%), e meia vida de aproximadamente 25 horas em humanos (Foulds et al. 1988).

O processo de eliminação renal consiste em duas etapas: alta filtração renal, atribuída a baixa ligação com proteínas plasmáticas e extensiva reabsorção tubular, o que determina a longa meia vida do fluconazol (Ryckelynck et al. 1993).

O Fluconazol penetra bem em todos os tecidos e líquidos corporais. Como consequência importante da excreção renal e eliminação, a meia vida plasmática do fluconazol é prolongada no idoso e outros pacientes com redução da depuração de creatinina.(Grant et. al., 1990).

Em estudos de interação medicamentosa, a absorção do fluconazol não é alterada em presença de hidróxido de magnésio e alumínio (Thorpe et al. 1990). A interação com cimetidina, apesar de diminuir o C_{max} e a AUC do fluconazol (Lazar & Wilner 1990), e aumentar o pH gástrico, a meia-vida plasmática e eliminação do fluconazol não foram alterados, não provocando efeitos clínicos significantes (Blum et al. 1990; Washton 1989).

A terapia com fluconazol, tem apresentado boa tolerância, com raros distúrbios como náuseas, vômitos e desconforto abdominal. Astakhova & Lepakhin (1990), demonstraram que a terapia com fluconazol pode apresentar leve elevação em testes de função hepática.

Estudos clínicos demonstram que o fluconazol pode alterar o metabolismo da ciclosporina (Colignon et al. 1989), ou que nenhuma diferença de concentração é observada nesta interação (Ehninger et al. 1989). No entanto, a associação de fluconazol com ciclosporina pode apresentar riscos, particularmente, se altas doses deste agente imunossupressor for administrado em pacientes com insuficiência renal, devido ao potencial de nefrotoxicidade com a ciclosporina (Torregrosa et al. 1992).

Há algumas evidências que o fluconazol aumenta o tempo de sangramento em pacientes tratados com warfarina (Lazar, et al., 1990), o que pode ser fatal em pacientes com endocardite fúngica, tratados com nicoumalona (Isalska et al., 1988).

Rifampicina é um potente indutor de enzimas microssomais hepáticas. A administração concomitante de rifampicina e fluconazol diminui a AUC do fluconazol em mais ou menos 20% (Apseloff et al., 1991).

Fluconazol apresenta considerável potencial para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas humana com excelente atividade em modelo animal de criptococcosis (Fernandez EP de, et al. 1986), histoplasmosis (Kobayashi et al. 1986) e candidíases (Richardson et al. 1985; Perfect et al. 1986).

O fluconazol apresenta vantagens como droga de escolha em relação a efetiva penetração no fluido cerebrospinal, baixa toxicidade, principalmente nefrotoxicidade quando comparado à anfotericina B, flucitosina e cetoconazol. Devido a excelente atividade no tratamento de meningite criptocócica em camundongos e coelhos,

estudos clínicos têm demonstrado resultado semelhante no tratamento de infecções micóticas intracranianas em humanos (*Foulds et al. 1988*).

OBJETIVO

Avaliar a existência ou não de bioequivalência entre duas formulações de comprimidos de fluconazol. (Fluconal, comprimidos, 150mg do laboratório Libbs, como formulação teste, *versus* Zoltec, comprimidos, 150mg do laboratório Pfizer, como formulação referência).

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos voluntários

Dezoito voluntários adultos saudáveis, do sexo masculino, com idade de 19 a 28 anos (média 22.6 anos), peso corporal de 63 a 100 Kg (média 75.7 Kg) foram selecionados. A seleção dos voluntários foi realizada através de consulta médica, incluindo rigorosa anamnese e exame físico. Foram excluídos do estudo todos os voluntários que participaram a menos de três meses de outro estudo, que receberam medicação regularmente, que apresentaram alterações clínicas ou sintomas de doenças cardíacas, hepáticas, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica ou psiquiátrica.

Além do eletrocardiograma, foram realizados os seguintes exames laboratoriais para a confirmação da saúde dos voluntários:

- Hemograma completo e velocidade de hemossedimentação.
- Uréia e creatinina séricas.
- Transaminases, fosfatase alcalina, Gama GT e bilirrubina total.
- Glicemia de jejum.
- Ácido úrico, sódio, potássio e cloreto.
- Urina I.
- Protoparasitológico.

Os voluntários selecionados, esclareceram dúvidas pessoais e assinaram termo de consentimento para o estudo, sendo o protocolo clínico aprovado pelo comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Protocolo Clínico

O estudo clínico foi realizado seguindo o delineamento aleatório cruzado de dois períodos, com intervalo de duas semanas entre as doses.

Os voluntários foram internados na véspera do início do estudo, quando receberam assistência e cuidados médicos e de enfermagem. Receberam dieta geral até as 23 horas, quando começaram o jejum visando o início do ensaio clínico previsto para 7 horas do dia seguinte.

Após as 8 horas de jejum, os voluntários receberam uma dose de 150 mg de fluconazol, via oral. A administração do medicamento em estudo seguiu rigorosamente a randomização apropriada. Os voluntários permaneceram em jejum para sólidos até 8 horas após a ingestão do fluconazol; líquidos foram permitidos, bebidas contendo xantinas, incluindo café, chás e refrigerantes, foram evitadas.

Análise da droga

As amostras de sangue foram coletadas através de "butterfly" heparinizado colocado em veia superficial do antebraço antes da administração do medicamento e logo em seguida foi feita a primeira coleta de sangue, minutos antes da administração da droga e outras nos seguintes intervalos após a administração da droga: 15, 30, 60, 90 minutos, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24 e 48 horas. Para cada amostra foram coletados 10 ml de sangue e acondicionados em tubos de vidros devidamente identificados. As amostras de sangue foram centrifugadas e armazenadas a -20°C até o momento da análise.

Sequência da Administração das duas formulações de fluconazol em voluntários sádios:

Voluntário n.	Período 1	Período 2
01	Zoltec®	Fluco®
02	Fluco®	Zoltec®
03	Fluco®	Zoltec®
04	Zoltec®	Fluco®
05	Fluco®	Zoltec®
06	Zoltec®	Fluco®
07	Fluco®	Zoltec®
08	Zoltec®	Fluco®
09	Fluco®	Zoltec®
10	Zoltec®	Fluco®
11	Fluco®	Zoltec®
12	Zoltec®	Fluco®
13	Zoltec®	Fluco®
14	Fluco®	Zoltec®
15	Zoltec®	Fluco®
16	Zoltec®	Fluco®
17	Fluco®	Zoltec®
18	Fluco®	Zoltec®

Condições Cromatográficas:

Materiais e Reagentes:

- Sistema água ultrapura: MilliQ Plus Millipore
- Metanol: Grau HPLC, Merck
- Éter etílico: Grau HPLC, Merck
- Fluconazol: LIBBS Farmacêutica LTDA
- Metronidazol: p.a., Sigma
- Acetonitrila: Grau HPLC, Merck
- NaOH : p.a., Merck
- Acetato de sódio: p.a., Merck

Equipamentos e Condições Cromatográficas:

O sistema cromatográfico foi composto de um detector UV Hitachi L4000, acoplado à uma bomba Hitachi L6000 e um injetor Hitachi AS2000A.

Coluna: Lichrospher 100 RP-18, 5 μ , 250x4 mm

Guarda Coluna: Lichrospher 100 RP-18, 5 μ , 10x4 mm

- A fase móvel foi composta por:

A) Acetato buffer 0.01M, pH 5 : 60%(vol)

B) Acetonitrila :20%(vol)

C) Metanol :20%(vol)

Eluição: Isocrática

Fluxo: 1.0 ml/min.

Volume de injeção: 50 μ l

Detector: λ : 210 nm

Tempo de retenção:

- Fluconazol: 4.2 $\pm$ 0.2 min

- Metronidazol: 2.9 $\pm$ 0.2 min (padrão interno)

Preparo de Soluções Padrões

Foram precisamente pesados 10mg de fluconazol em um balão volumétrico de 10ml, dissolvidos em metanol e completado o volume, obtendo uma solução stock na concentração de 1mg/ml. (solução A). Esta solução foi diluída para obter as seguintes concentrações:

50.000ml - 100ml	Sol. B= 500.00 mcg/ml
10.000ml - 100ml	Sol. C= 100.00 mcg/ml
5.000ml - 100ml	Sol. D= 50.00 mcg/ml
1.000ml - 100ml	Sol. E= 10.00 mcg/ml
0.500ml - 100ml	Sol. F= 5.00 mcg/ml
0.250ml - 100ml	Sol. G= 2.50 mcg/ml

100 μ l de cada solução foram adicionados para 1ml de controle de plasma humano para obtenção dos seguintes pontos na curva:

1ml plasma + 100 μ l da sol. B = [] = 50.00 mcg/ml

1ml plasma + 100 μ l da sol. C = [] = 10.00 mcg/ml

1ml plasma + 100 μ l da sol. D = [] = 5.00 mcg/ml

1ml plasma + 100 μ l da sol. E = [] = 1.00 mcg/ml

1ml plasma + 100 μ l da sol. F = [] = 0.50 mcg/ml

1ml plasma + 100 μ l da sol. G = [] = 0.25 mcg/ml

Solução padrão interno (Metronidazol)

Partindo de uma solução stock de 1 mg/ml (solução H), foram pipetados 1 ml desta solução e completado o volume com água milli-Q para 10 ml num balão volumétrico, obtendo uma solução de concentração final de 100µg/ml (solução I). Esta solução foi utilizada para preparação da curva padrão, com diluições apropriadas de acordo com as concentrações desejadas. Ambas as soluções foram preparadas diariamente.

Preparo da solução tampão de acetato de sódio 0.05M, pH=5

Foram precisamente pesados 0.82g de acetato de sódio em um balão volumétrico de 1000ml, dissolvidos em 800 ml de água, ajustado o pH para 5 com sol. Ácido Clorídrico concentrado, e completado o volume final da solução para 1000ml, com água milliQ.

Preparação da fase móvel:

A fase móvel foi composta por 600ml de tampão acetato de sódio 0.01M, pH 5, adicionados com 200ml de acetonitrila e 200ml de metanol. Após a mistura, a solução foi sonicada e filtrada num filtro de membrana de 0.45µ (Millipore).

Preparação da amostra:

Para 1ml de plasma foram adicionados 100µl da solução de padrão interno (100 µg/ml de metronidazol) e 0.1ml de metanol. A mistura foi extraída com 5ml de éter, misturados num vórtex por 5 minutos. Após centrifugação em 4000 rpm por 10 minutos, a fase orgânica foi evaporada em um fluxo contínuo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido com 150µl de fase móvel e 50 µl foram injetados no sistema cromatográfico.

Validação da Metodologia do Ensaio Cromatográfico

Confiabilidade e especificidade:

A especificidade do método foi estudada com os cromatogramas de diferentes soluções, determinadas em condições similares de análise. A confiabilidade do método foi determinada utilizando uma concentração conhecida de fluconazol (5µg/ml) e do metronidazol (10µg/ml), determinando a altura da amostra padrão/altura da amostra do padrão interno, conforme tabela abaixo:

N. Amostra	Concentração
	Altura da amostra/altura do padrão interno
1	0.318
2	0.320
3	0.321
4	0.321
5	0.319
6	0.315
7	0.316
8	0.315
9	0.314

Média	0.318
Variação	0.000007
C.V.%	0.85

Limite de Detecção:

O limite de detecção do método foi 0.01 µg/ml, sendo determinado o limite de quantificação em 0.03 µg/ml.

Intra-ensaio:

O intra-ensaio foi determinado a partir da análise de 5 replicatas de amostras de plasma de concentrações de 0.3, 5 e 50 µg/ml de fluconazol, conforme tabela abaixo:

X= Conc (µg/ml)	Y= Conc. Calculada	Área amostra/Padrão interno
0.3	0.3	0.014
0.3	0.3	0.014
0.3	0.3	0.013
0.3	0.3	0.013
0.3	0.3	0.013
5	5	0.291
5	5	0.293
5	5	0.293
5	5	0.293
5	5	0.293
50	50	2.873
50	50	2.859
50	50	2.860
50	50	2.856
50	50	2.858

Exatidão e precisão:

O método apresentou boa exatidão para o intra-ensaio nas concentrações de (0.3 µg/ml), apresentando coeficiente de variação de 1.45% e para o limite máximo quantificado (50 µg/ml), coeficiente de variação de 0.28%.

Inter-Ensaio:

A variação de um inter-ensaio realizado, consistiu de curvas padrões devidamente realizadas em dias diferentes. A curva de calibração foi linear quando utilizamos concentrações de 0.25 a 50 µg/ml, apresentando coeficiente de regressão médio de 0.999.

A tabela abaixo demonstra o inter-ensaio realizado no estudo e indica o coeficiente de variação de cada ponto estabelecido da curva padrão (n=6).

CONC. (µg/ml))	0.25	0.50	1.0	5.0	10.0	50.0
	0.22	0.46	0.93	4.92	9.74	50.06
	0.23	0.45	0.90	4.75	9.50	50.12
	0.22	0.47	0.91	4.83	9.62	50.09
	0.23	0.45	0.90	4.75	9.50	50.12
	0.22	0.46	0.92	4.80	9.62	50.02
	0.23	0.45	0.90	4.82	9.70	50.50
Mean	0.23	0.46	0.91	4.81	9.61	50.15
SD	0.01	0.01	0.01	0.06	0.10	0.17
CV	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00
SEM	0.00	0.00	0.01	0.03	0.04	0.07
%CV	2.43	1.79	1.39	1.31	1.03	0.35

RESULTADOS

As duas formulações de fluconazol foram bem toleradas na dose administrada nos voluntários. Não houve qualquer relato de efeitos adversos e os parâmetros bioquímicos permaneceram inalterados e dentro dos valores de referência.

A figura 1, apresenta curva de calibração do fluconazol, com coeficiente de regressão médio de 0.9999, utilizando concentrações de 0.25 a 50 µg/ml. Os valores dos coeficientes de variação inter-ensaio foram 2.43, 1.79, 1.39, 1.31, 1.03, e 0.35% para concentrações plasmáticas de fluconazol de 0.25, 0.50, 1.0, 5.0, 10.0 e 50.0 µg/ml respectivamente.

A figura 2, mostra cromatogramas típicos obtidos pelo método de HPLC descrito, demonstrando uma amostra de plasma branco, uma amostra da injeção em plasma de fluconazol (5 µg/ml) e uma amostra de injeção em plasma de metronidazol (padrão interno), na concentração de 10 µg/ml. Os tempos de retenção foram de 2.9 min (metronidazol) e 4.2 min (fluconazol), respectivamente.

A figura 3, mostra um cromatograma de uma amostra de um voluntário contendo 1.0 µg/ml de metronidazol e 4.0 µg/ml de fluconazol.

A tabela 1 mostra os valores das médias geométricas e os intervalos de confiança de 90% para $AUC_{[0-48]}$, $AUC_{[0-\infty]}$, K_e , $T_{1/2}$, C_{max} , assim como os valores das medianas de T_{max} para cada formulação.

As curvas das médias das concentrações plasmáticas de fluconazol em função do tempo obtidas após a administração oral de cada formulação de 150mg são mostradas na figura 4.

A tabela 2 mostra a análise estatística das razões individuais teste/referência da $AUC_{[0-48h]}$, $AUC_{[0-\infty]}$, C_{MAX} , C_{MAX}/AUC , K_e , $T_{1/2}$ e das diferenças teste - referência de T_{MAX} entre ambas as formulações de fluconazol, bem como os intervalos de confiança para determinar a bioequivalência entre as formulações. Apesar do intervalo de confiança da área sob a curva estar dentro do estabelecido pela FDA, não podemos determinar a bioequivalência entre as formulações, em relação à extensão de absorção, devido ao erro no delineamento do estudo.

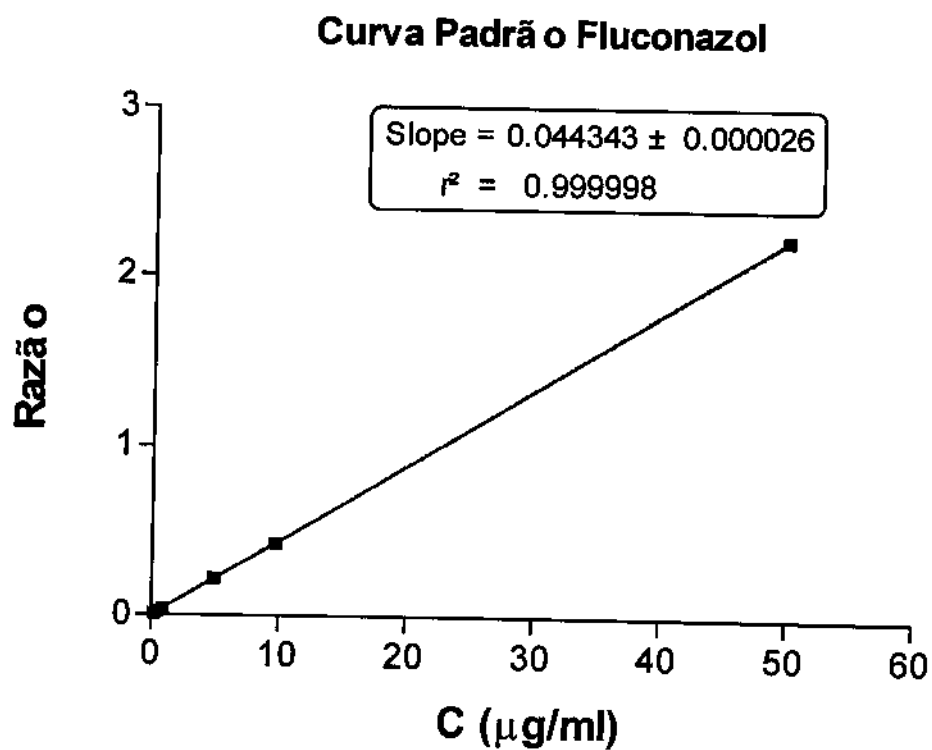


Figura 1 - Curva de calibração do fluconazol, apresentando coeficiente de regressão médio de 0.9999, utilizando concentrações lineares de 0.25 a 50 µg/ml.

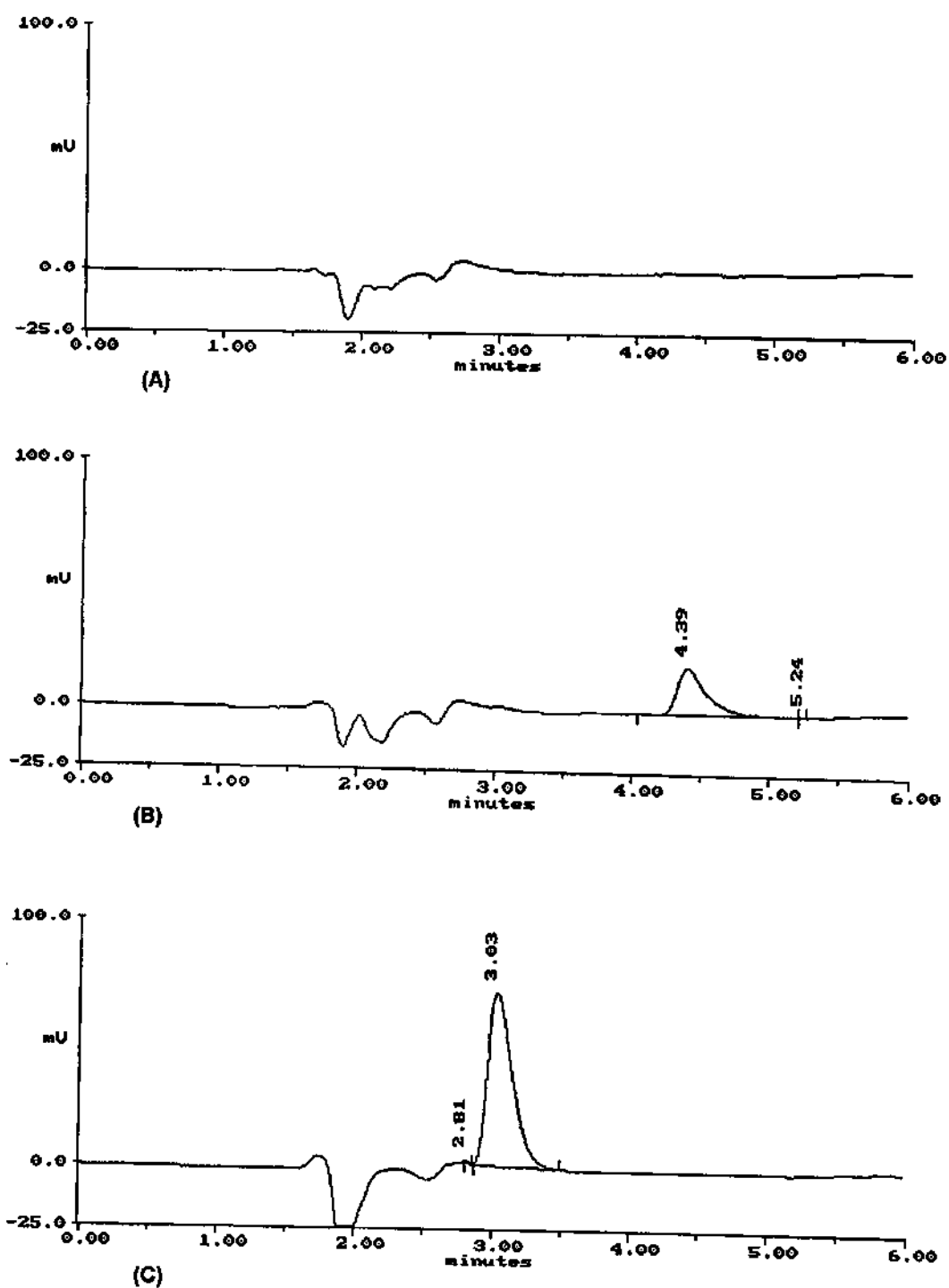


Figura 2- Cromatograma típico de HPLC, obtido de amostra de plasma humano, (a) branco (b) amostra contaminada com 5µg/ml de fluconazol e (c) amostra contaminada com 10µg/ml de metronidazol.

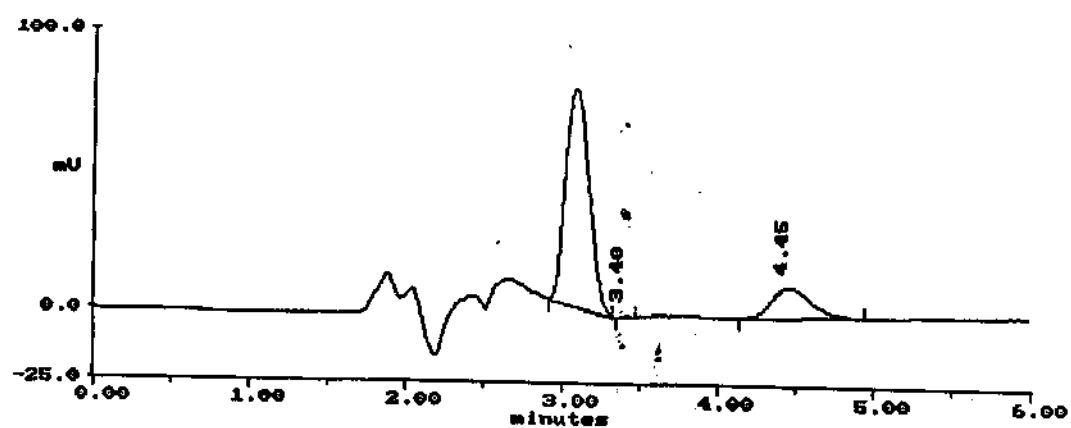


Figura 3 - Cromatograma típico de HPLC, obtido de amostra de plasma humano de um voluntário contendo 4 μ g/ml de fluconazol e 1 μ g/ml de metronidazol.

Análise Estatística:

As curvas individuais de concentrações plasmáticas de fluconazol em função do tempo foram obtidas para cada uma das formulações. A concentração máxima atingida (C_{max}) e o tempo gasto para atingir a concentração plasmática máxima (T_{max}) foram obtidos a partir de cada curva. A área sob a curva da concentração de fluconazol versus tempo de 0-48h (AUC_{0-48h}), foi calculada pelo método trapezoidal.

A extrapolação das AUC_{0-48h} ao infinito (AUC) foi realizado pela adição do valor C_{48}/K_e às AUC_{0-48h} calculadas (onde C_{48} = concentração plasmática 48 horas após a dose, calculada a partir da equação de regressão linear obtida para estimar as K_e).

A constante de eliminação terminal de primeira ordem (K_e) foi determinada a partir da equação de regressão linear entre o logaritmo da concentração e o tempo. A meia vida ($T_{1/2}$) foi calculado empregando a equação $T_{1/2} = (\ln 2/K_e)$ (Kinetics-Pharmkit Program-Version 2.0)

A bioequivalência entre as formulações foi avaliada através do cálculo das razões individuais teste/referência para $AUC_{[0-48]}$, C_{MAX} , e as diferenças individuais teste - referência para T_{max} , junto com as médias e os intervalos de confiança (IC) de 90%. A inclusão dos IC 90% para as razões percentuais dentro do intervalo 80-125%, e a inclusão do valor "zero" dentro do IC 90% para as diferenças foram analisadas empregando testes paramétrico (ANOVA para dados não transformados e transformados por logaritmo) e não paramétrico (teste de Wilcoxon de soma dos escores, de acordo com *Hauchke et. al.*, (1990)). Utilizou-se o programa de computador "Bioequivalence Program for two-Period Crossover Studies", versão 3.4.

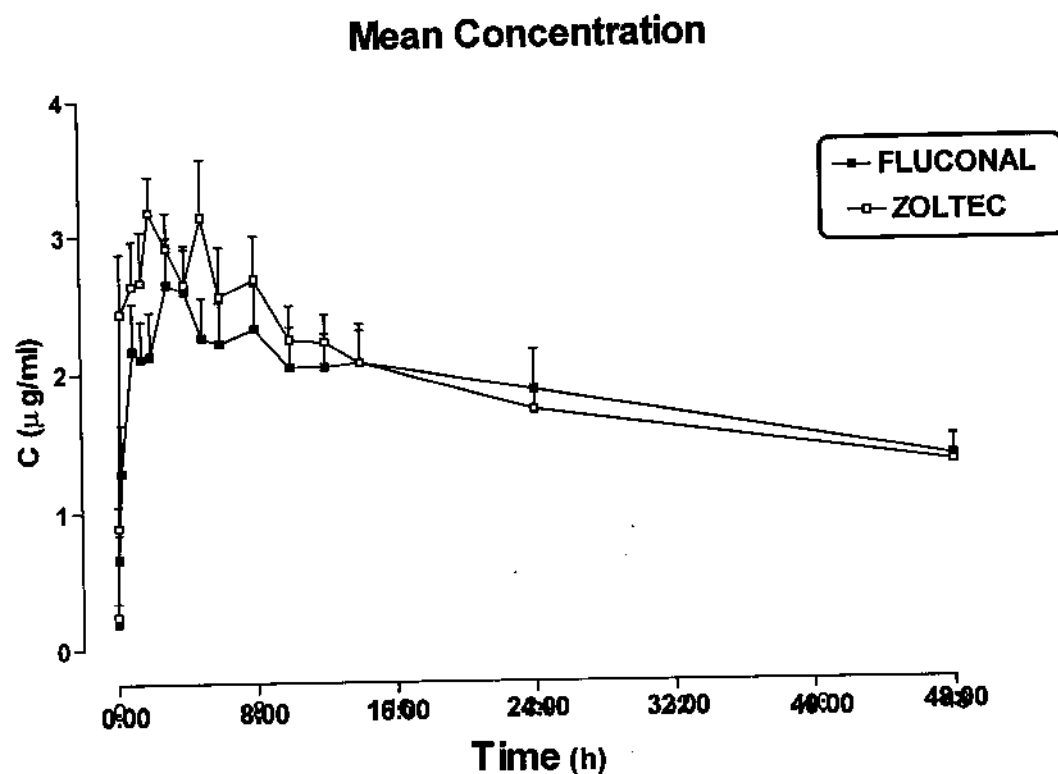


Figura 4. Média das concentrações plasmáticas (média $\pm$ DP) de fluconazol em função do tempo para as duas formulações (Fluconal®, 150mg, Laboratório Libbs, vs. Zoltec®, 150mg, Laboratório Pfizer), administradas em 18 voluntários sadios.

Parâmetro	Fluconal	Zoltec
AUC_[0-48h] (µg/ml*h) Média geométrica 90% IC	68.7 (52.8 - 89.5)	71 (55.9 - 90.3)
AUC_[0-∞] (µg/ml*h) Média geométrica 90% IC	136.6 (106.4 - 175.3)	135.5 (111.6 - 164.6)
T_(1/2)	36 (32.0 - 40.7)	36 (31.9 - 40.5)
K_e	0.02 (0.02 - 0.02)	0.02 (0.02 - 0.02)
C_{max} (µg/ml*h) Média geométrica 90% IC	3.0 (2.5 - 3.7)	3.9 (3.3 - 4.7)
T_{max} (h) Mediana Faixa	4 (0.25 - 12)	2.9 (0.3 - 6)

Tabela 1 - Parâmetros farmacocinéticos de fluconazol obtidos após a administração de cada uma das formulações de fluconazol (150mg) nos 18 voluntários sádios.

Fluconal/Zoltec	PARAMÉTRICO		NÃO PARAMÉTRICO	
% RAZÕES	Média Geométrica		Ponto Estimado	IC 90%
AUC [0-48h] (µg/ml*h)	96.7	p>0.30	97	(82.3 - 115)
AUC [0-∞] (µg/ml*h)	100.7	p>0.30	102.8	(83.7 - 116)
C _{max} (µg/ml*h)	77.4	p=0.17	78.9	(64.8 - 95.0)
K _e	99.2		97.5	(90.6 - 106.6)
T _{1/2}	100.4		103	(93.9 - 110.3)
C _{max} /AUC	79.8		77.7	(66.7 - 92.2)
T _{max} (h)	1.7**		1.0	(-0.9 - 2.7)***

* De acordo com Hauschke et. al., (1990);

** Média Aritmética;

*** IC 90% para as diferenças individuais.

Tabela 2 - Análise estatística das razões individuais teste/referência da AUC_[0-48h], AUC_[0-∞], C_{MAX}, e das diferenças teste - referência de T_{MAX} entre ambas as formulações de fluconazol.

DISCUSSÃO

A metodologia descrita no presente estudo nos apresentou boa sensibilidade, rapidez e precisão na determinação dos níveis plasmáticos de fluconazol. O tempo de retenção alcançado pelo padrão interno e o não aparecimento de picos tardios permitiu que todas as amostras de um único voluntário fossem analisadas num mesmo dia de trabalho afim de evitar variações inter ensaio.

Entretanto, a análise farmacocinética indicou problemas em relação ao delineamento do ensaio clínico realizado. A análise de bioequivalência proposta pelo *Food and Drug Administration* baseia-se na comparação da biodisponibilidade das duas formulações, levando-se em conta dois parâmetros farmacocinéticos: a área sob a curva e a concentração máxima atingida.

A área sob a curva representa a extensão da absorção. Na verdade, reflete essencialmente uma média das concentrações obtidas. É importante ressaltar que a área sob a curva obtida através dos concentrações medidas deve representar 80% da área extrapolada até o infinito. Ou seja, o investigador deve assegurar número de amostras suficiente para atingir este objetivo. Conforme podemos verificar na análise das áreas calculadas no intervalo proposto pelo delineamento (0-48 horas), esta representa aproximadamente 60% da área calculada até o infinito. Seguramente coletas realizadas 72, 96 e 120 horas após a administração (o que representaria quatro vezes a meia vida da droga) deveriam ter sido realizadas para cumprir este quesito essencial para análise de bioequivalência. Assim sendo, apesar da área calculada assim como a área extrapolada até o infinito estarem dentro do intervalo de confiança aceito pelo *Food and Drug Administration* (80-125%) e pela *European Community* (80-125%), o delineamento falha em não permitir afirmar que estas formulações sejam bioequivalentes quanto à extensão da absorção.

Um outro aspecto importante na análise da área sob a curva (e também em relação a concentração máxima atingida) é o poder do teste estatístico. Neste estudo, conforme podemos verificar, não foi constatado diferença estatística entre as

formulações testadas em relação à área sob a curva ($p > 0.30$). Entretanto, é fundamental verificar se o poder estatístico obtido no teste foi suficiente para detectar uma diferença, para não incorrerem no chamado erro tipo II (não detectar uma diferença porque o teste não é sensível suficiente para tal). Segundo o *Food and Drug Administration*, o poder estatístico desejado para avaliar diferenças é igual ou maior que 0.8. No nosso caso, o poder estatístico foi calculado em 0.58. Dois fatores podem ser responsáveis pelo baixo poder estatístico detectado: número insuficiente de voluntários e alta variabilidade farmacocinética da droga. O estudo foi realizado com dezoito voluntários; de fato, recentemente o *Food and Drug Administration* tem recomendado no mínimo vinte e quatro voluntários. É possível que com o incremento de mais seis voluntários o poder estatístico fôsse suficiente.

Outro parâmetro importante para a avaliação da bioequivalência é a concentração máxima atingida. De acordo com o *Food and Drug Administration*, a razão entre as C_{max} atingidas (teste/referência) devem estar dentro do intervalo de 0.8-1.25 (80-125%), o mesmo que aquele exigido para área sob a curva. Entretanto, a *European Community* aumentou o intervalo proposto para 0.7-1.43 (70-143%). O racional para este aumento é que sabidamente a concentração máxima atingida apresenta uma variabilidade muito maior do que a área sob a curva, quer seja pela dificuldade de determinar corretamente a concentração máxima atingida (devido a limitação do número de amostras no período em que a mesma deve ocorrer), quer seja pela característica do fármaco quando apresenta alta extração hepática. No nosso caso, as razões entre as concentrações máximas atingidas ficou fora do limite de confiança aceito por ambas entidades (66.7-133.3%).

Os critérios de bioequivalência tem sido motivo de discussões internacionais no sentido de aprimorá-los. Há propostas que incluem alteração no delineamento do estudo, sugerindo que os estudos deveriam ser feitos em replicata, ou seja, a formulação referência deveria ser dada duas vezes e a formulação teste também. O objetivo deste delineamento seria estabelecer o intervalo de variabilidade da formulação referência com ela mesma, e depois verificar se as razões entre a

formulação teste e a formulação de referência está dentro do limite detectado entre as formulações de referência. Não há sentido em se exigir que a formulação teste seja melhor do que a formulação de referência.

As diferenças de T_{max} foram estatisticamente diferentes de zero, como mostrado pelos intervalos de confiança de 90%, obtidos por testes paramétricos e não-paramétricos. De acordo com os requerimentos da *European Community*, a importância de T_{max} como um índice de velocidade de absorção “somente faz sentido se houver necessidade clinicamente relevante para a liberação rápida ou ação ou sinais de relação entre concentração e efeitos adversos (Salmonson, 1996) Entretanto, os resultados obtidos nas diferenças individuais de T_{max} faz com que as conclusões sejam reforçadas da não bioequivalência em relação à velocidade de absorção, uma vez que T_{max}, juntamente com C_{max}, são considerados indicadores da velocidade de absorção.

Apesar de C_{max} e T_{max} serem considerados como indicadores da velocidade de absorção, muitos autores tem questionado a utilidade e as limitações desses parâmetros em relação à bioequivalência, dados os efeitos que o esquema de amostragem tem sobre eles. No entanto, *Endrenyi et al.*, (1991) demonstrou que o C_{max} não apenas reflete a velocidade de absorção, mas também a extensão de absorção, como evidenciado pela alta correlação observada entre este parâmetro e AUC, e propôs a razão C_{max}/AUC como medida indicadora de velocidade de absorção. Nossos resultados demonstraram que o intervalo de confiança de 90% para as razões individuais teste/referência para C_{max}/AUC estiveram excluídos da faixa de bioequivalência de 80-125%.

Em conclusão, pelos resultados obtidos não podemos afirmar que a formulação Fluconal seja bioequivalente a formulação referência Zoltec. Um número maior de voluntários, e coletas a intervalos superiores aos 48h utilizados deverão ser incorporados no delineamento do estudo.

Referências

Apseloff G., Hilligoss D M., Gardner M J., Henry E B., Inskeep P B., Gerber N., Lazar J D., Induction of Fluconazole metabolism by rifampin: in vivo study in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*, **31**: pp: 358-361 (1991)

Astakhova AV, Lepakhin VK. Antifungal drugs. In Dukes & Beeley (Eds) Side effects of drugs, vol. **14**, pp. 229-236, Elsevier, Amsterdam, (1990)

Blum R.A., Wilton J.H., Hilligoss D.M., Gardner M.J., Henry E.B., et al. Effect of fluconazole on the disposition of phenytoin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **49**: 420-425, (1991)

Blume, H.H., McGilveray, I.J., Midha, K.K., Bio - International'94. Conference on Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics Studies. *Int. Pharm. Journal* **9**: 29 (1995)

Brammer K.W., Tarbit M.H. A review of the pharmacokinetics of fluconazole (UK-49,858) in laboratory animals and man. In fromtling (Ed.) Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents. *JR Prous Science Publishers SA*, Barcelona, pp: 141-150, (1987)

Collignon P., Hurley B., Mitchell D. Interaction of fluconazole with cyclosporin. *Lancet* **1**: 1262, (1989)

Edrenyl, L., Fritsch, S., Yan, W., Cmax/AUC is a clearer measure than Cmax for absorption rates in investigations of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther* **29**: 394-399 (1991)

Ehninger G., Jaschonek K., Schuler U., Kruger H.U. Interaction of fluconazole with cyclosporin. *Lancet* **2**: 104-105, (1989)

Fernandez E.P. de, Patino M.M., Graybill J.R., Tarbit M.H. Treatment of cryptococcal meningitis in mice with fluconazole. *J.Antimicrob.Chemotherapy* **18**: 261-270, (1986)

Foulds G., Brennan D.R., Wajszczuk C., Cantazaro A., Garg D.C., et al. Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid in humans. *Journal of Clinical Pharmacology* **28**: 363-366, (1988)

Grant SM, Clissold SP. Fluconazole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetics properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. *Drugs* **39**: 877-916, (1990)

Hosotsubo K.K., Hosotsubo H. Rapid determination of serum levels of a new antifungal agent, fluconazole, by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography - Biomedical Applications* **529**: 223-228, (1990)

Hauschke D., Steinijans VW., Diletti E. A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *International Journal Clinical Pharmacology Ther Toxicology*, **28**: 72-78. (1990)

Humphrey M.J., Jevons S., Tarbit M. H. Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **28**: 648-653, (1985)

Isalska B J., Stanbrige T.N.. Fluconazole in the treatment of candidal prosthetic valve endocarditis. *British Medical Journal* **297**: 178-179, (1988)

Kobayashi G.S., Travis S., Medoff G. Comparison of the *in vitro* and *in vivo* activity of the bis-triazole derivative UK 49,858 with that of amphotericin B against *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **29**: 660-662, (1986)

Koks C.H.W., Rosing H., Meenhorst P.L., et al. High-performance liquid chromatography determination of the antifungal drug fluconazole in plasma and saliva of human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Chromatography B*, **663**: 345-351, (1995)

Lavrijsen KLM, Van Houdt JMG, Van Dyck DMJ, Meuldermans WEG, Heykants JJP. Induction potencial of fluconazole toward drug-metabolizing enzymes in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**: 402-408, (1990)

Lazar J.D., Wilner K.D. Drug interaction with fluconazole. *Reviews of Infectious Diseases* **12**: 327-333, (1990)

Morita K., Konisbi H., Shimakawa H. Fluconazole, a potent inhibitor of cytochrome P-450 dependent drug-metabolism in mice and humans in vivo: comparative study with ketoconazole. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **40**: 1247-1251, (1992)

Perfect J.R., Savani D.V., Durak D.T. Comparison of itraconazole and fluconazole in treatment of cryptococcal meningitis and candida pyelonephritis in rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **29**: 579-583, (1986)

Poli A., Moreno, R.A., Ribeiro W., Dias H.B., Moreno Jr. H., Muscará M.N. and G. de Nucci. Influence of Gastric acid secretion blockade and food intake on the bioavailability of a potassium diclofenac suspension in healthy male volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol **34** - n.2, 76-79 (1996)

Rex J.H., Hanson L.H., Amantea M.A., Stevens D.A., Bennet J.E. Standardization of a fluconazole bioassay and correlation of results with those obtained by high pressure liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**: 846-850, (1991)

Richardson k., Brammer K.W., Marriott Ms, Troke P.F., et al. Activity of UK-49,858, a bis-triazole derivative, against experimental infections with *Candida Albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**: 832-835, (1985)

Ryckelynck, J.P., Debruyne D. Clinical Pharmacokinetics of Fluconazole. *Clinical Pharmacokinetics* **24**: 10-27, (1993)

Salmonson, T., Current practice of BA/BE requirements for immediate release products in the EU. Abstract from "Bio International: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics", *International Conference of F.I.P. "Bio-International 96"*, Tokyo, Japan, april 22-24, pp 16-19, (1996)

Shaw JTB, Tarbit MH, Troke PF. Cytochrome P-450 mediated sterol synthesis and metabolism: differences in sensitivity to fluconazole and other azoles. Pp 125-139, *JR Prous Science Publishers SA*, Barcelona, (1987)

Torregrosa V., De La Torre M., Campistol J.M., Oppenheimer F., Ricart M.J., et al. Interaction of fluconazole with cyclosporin A. *Nephron* **60**: 125-126, (1992)

Thomas A.H., Suggested mechanisms for the antimycotic activity of the polyene antibiotics and the N-substituted imidazoles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **17**: 269-279, (1986)

Thorpe J.E., Baker N., Bromet-Petit M. Effect of oral antacid administration on the pharmacokinetics of oral fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **34**: 2032-2033, (1990)

Washton H. Review of fluconazole: a new triazole antifungal agent. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. **12**: 229S-233S, (1989)

Wallace, E.J., Steven C.H., Jesse G., et al. Assay of Fluconazole by High-Performance Liquid Chromatography with a Mixed-Phase Column. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **36**: 603-606, (1992)

Wilson, C.G. & Washington, N. Physiological Pharmaceutics - Biological Barriers to Drug Absorption in Small intestine: Transit and absorption of drugs. England, Ellis Horwood Limited, (1989), p.69 - 90.

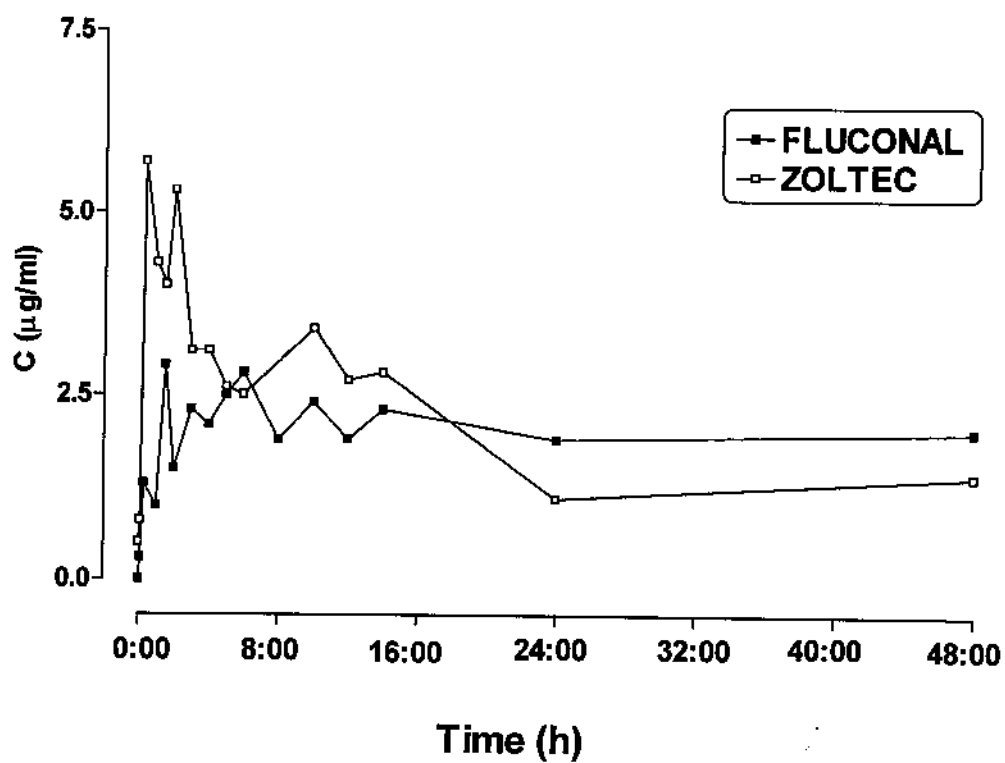
ANEXOS

ABSTRACT

The bioequivalence study of two fluconazole tablet formulations: Fluconal (from Laboratório Libbs), and Zoltec (from Laboratório Pfizer) were compared in eighteen healthy male volunteers who received a single dose of 150 mg of each formulation, in an open randomized two period crossover fashion with a fourteen day washout interval between doses. Plasma samples were obtained over a 48h interval and fluconazole concentrations were determined by HPLC with UV detection. From the plasma fluconazole concentration vs time curves, $AUC_{[0-48h]}$ (area under the concentration vs time curves from 0 to 48h), C_{max} (maximum achieved concentration), T_{max} (time to achieve C_{max}) and AUC (area under the concentration vs time curves extrapolated to infinity) were obtained. All these variables were analysed using both parametric and non-parametric statistics. Geometric mean Zoltec/Fluconal individual percent ratios were 96.7% (IC 90% 81.7 - 114) for $AUC_{[0-48h]}$, 100.7% (IC 90% 85.6 - 118), for AUC, 77.4% (IC 90% 66.7 - 133) for C_{max} . Although the $AUC_{[0-48]}$ geometric mean ratio (fluconal/zoltec) was inside both the FDA (0.8-1.25) and European Community (0.7-1.43) proposed limits, we cannot affirm that Libbs fluconal is bioequivalent to Pfizer Zoltec according to the extension of absorption, the reason for that being two fold: 1st - the calculated area obtained with the [0-48] was less than the 80% of the extrapolated area [0- ∞] and 2nd - the number of volunteers was not enough, since the power obtained for the statistical analysis was 0.52 (less than 0.8 as required). This implies in a possible type two error (not detecting a statistical difference due to power weakness).

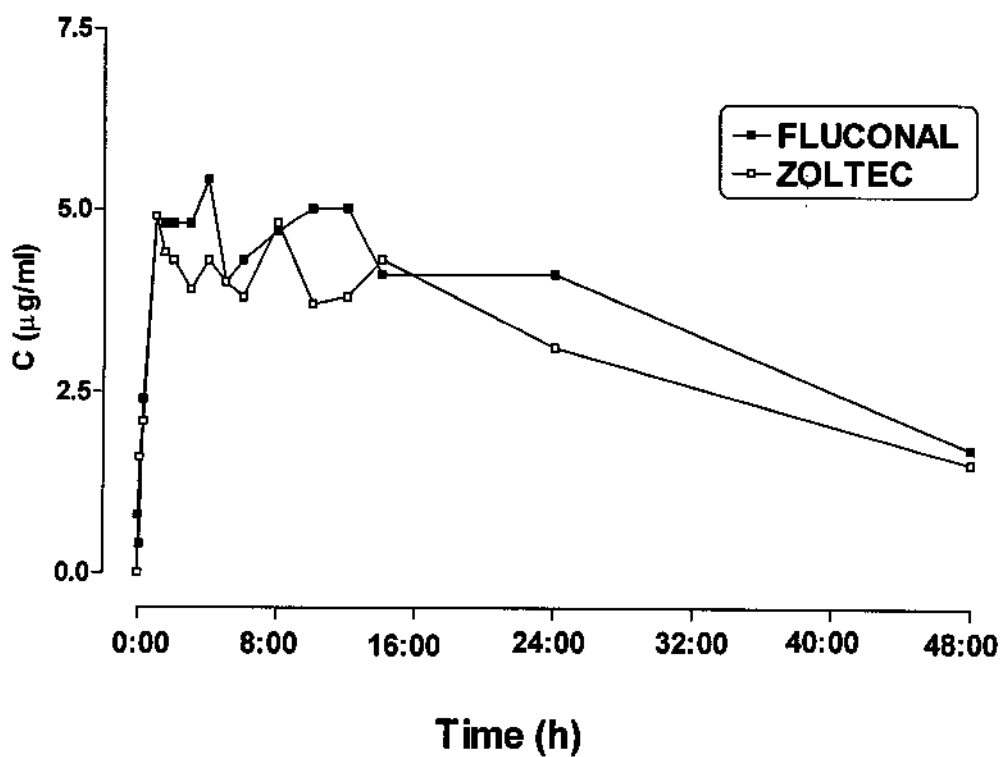
**Dados Concentração Individual vs Tempo (Figuras) e
Parâmetros Farmacocinéticos (Tabelas)**

VOL. I - AAA



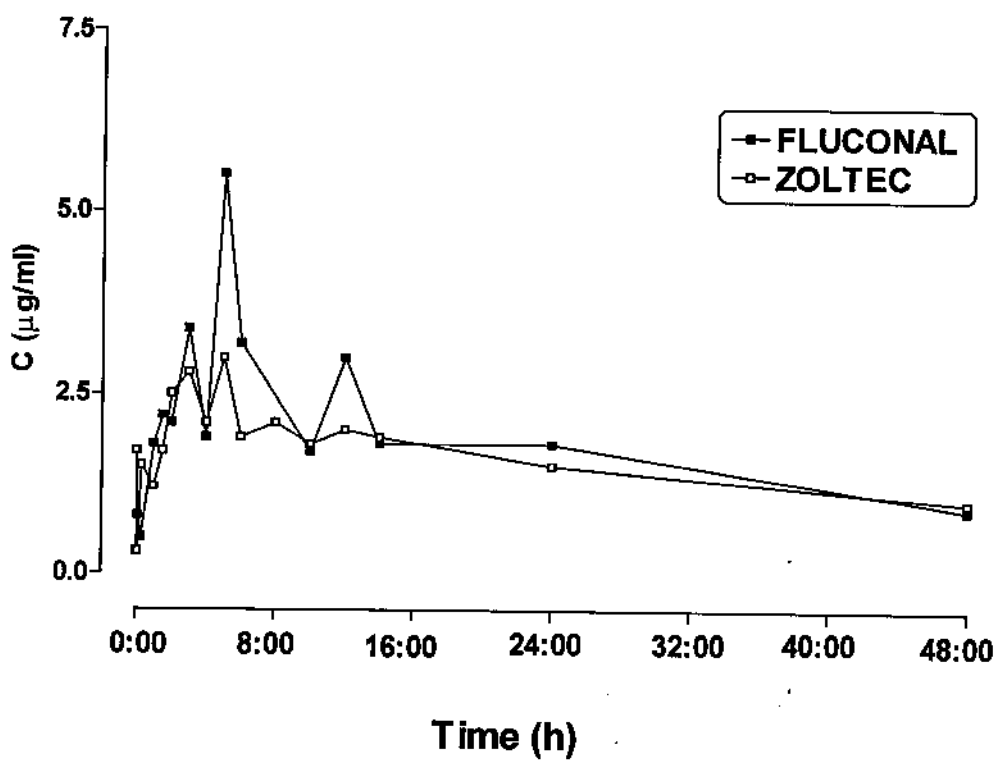
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} (µg/ml*h)	99	95.7
C_{max} (µg/ml)	3.0	5.7
$AUC_{0-\infty}$ (µg/ml*h)	199	154
K_e	0.020	0.024
$T_{1/2}$ (h)	35.5	29.1
C_{max}/AUC	0.030	0.059
T_{max} (h)	1.5	0.3

VOL. II - AEOL



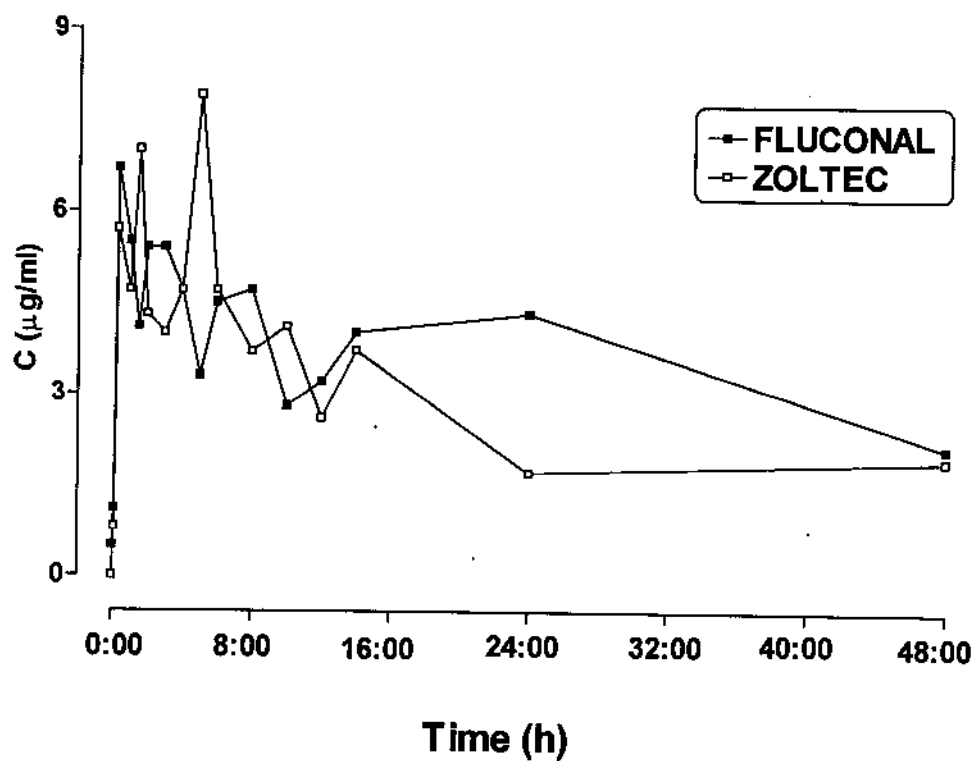
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	176.6	149
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/ml}$)	5.4	4.9
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	247.4	217.1
K_e	0.024	0.022
$T_{1/2}$ (h)	28.7	31.0
$C_{\max}/AUC$	0.030	0.032
$T_{\max}$ (h)	4	1

VOL. III - AHS



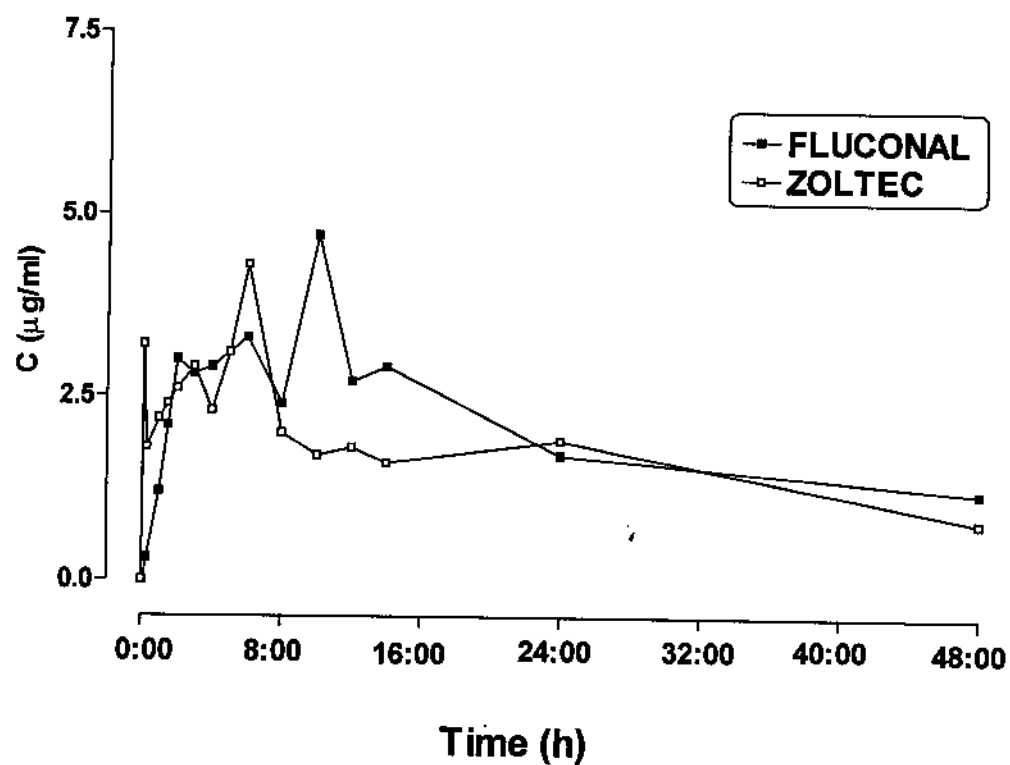
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	88.3	76.8
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	5.5	3.0
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	129.2	129.4
K_e	0.022	0.019
$T_{1/2}$ (h)	31.5	36.1
C_{max}/AUC	0.062	0.039
T_{max} (h)	5	5

VOL. IV - MTS



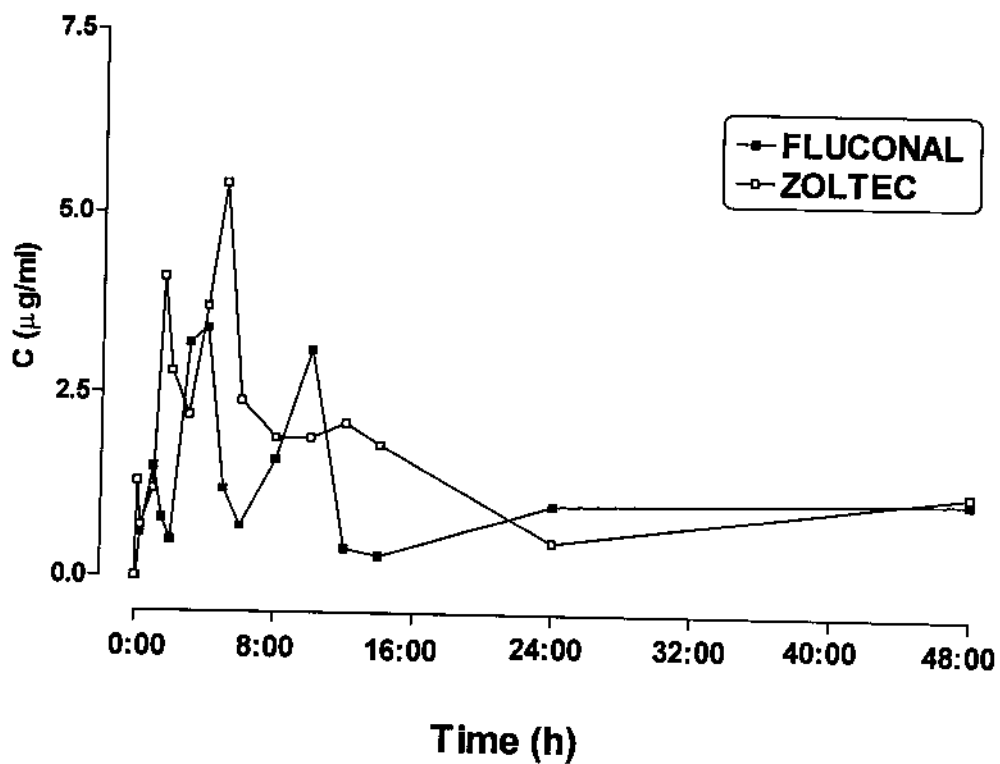
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} (µg/ml*h)	178	133.5
C_{max} (µg/ml)	6.7	7.9
$AUC_{0-\infty}$ (µg/ml*h)	288.5	228.5
K_e	0.019	0.020
$T_{1/2}$ (h)	36.1	34.6
C_{max}/AUC	0.037	0.059
T_{max} (h)	0.3	5

VOL. V - BAM



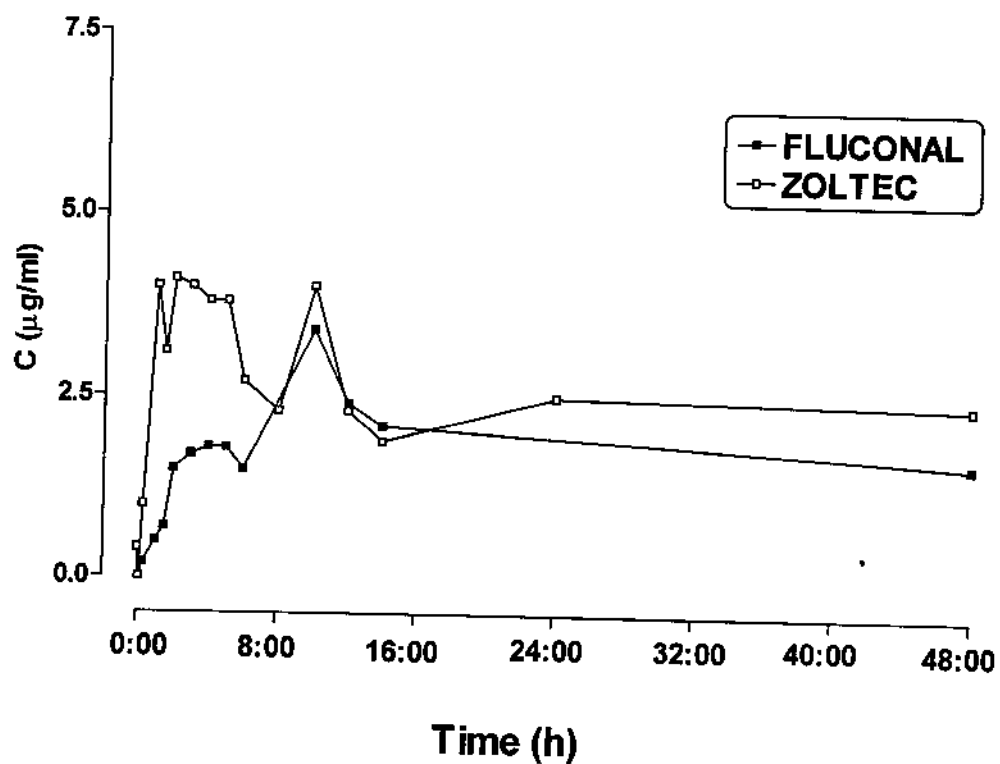
	Fluconal	Zoltec
$AUC_{0-48} (\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	96.5	43
$C_{\text{max}} (\mu\text{g/ml})$	3.3	3.1
$AUC_{0-\infty} (\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	146.5	75
K_e	0.024	0.025
$T_{1/2} (\text{h})$	29.0	27.7
C_{max}/AUC	0.034	0.072
$T_{\text{max}} (\text{h})$	6	5

VOL. VI - CJGM



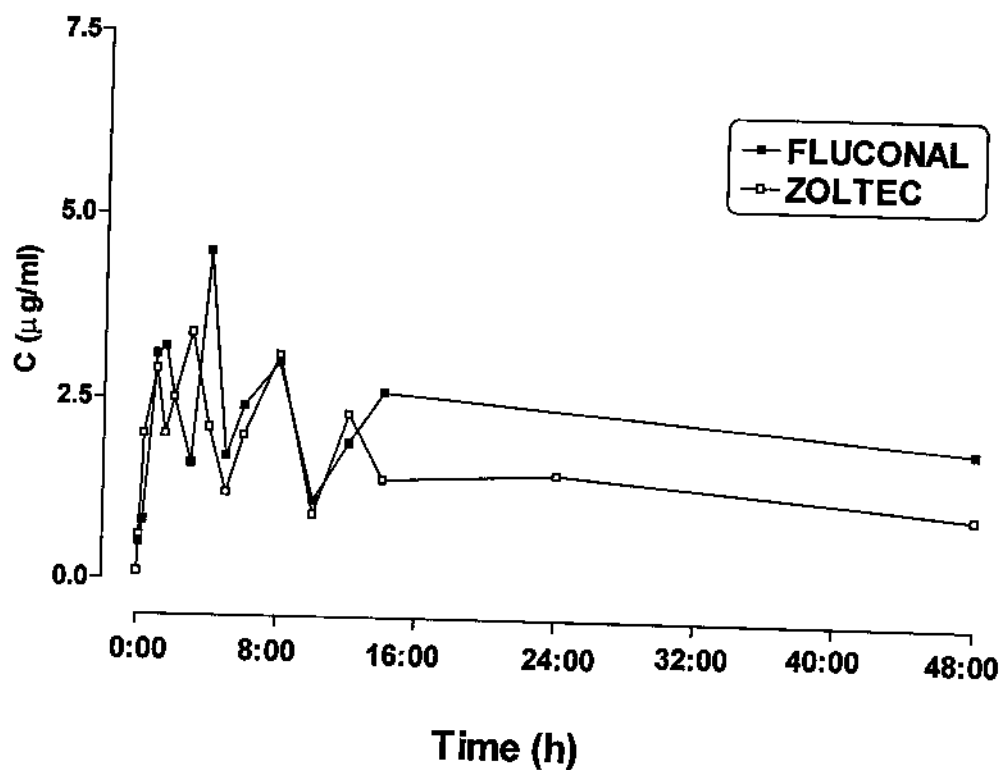
	Fluconal	Zoltec
$AUC_{0-48} (\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	53	65
$C_{\max} (\mu\text{g/ml})$	3.4	5.4
$AUC_{0-\infty} (\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	105.4	128.1
K_e	0.021	0.019
$T_{1/2} (\text{h})$	33.5	36
$C_{\max}/AUC$	0.064	0.083
$T_{\max} (\text{h})$	4	5

VOL. VII - DHM



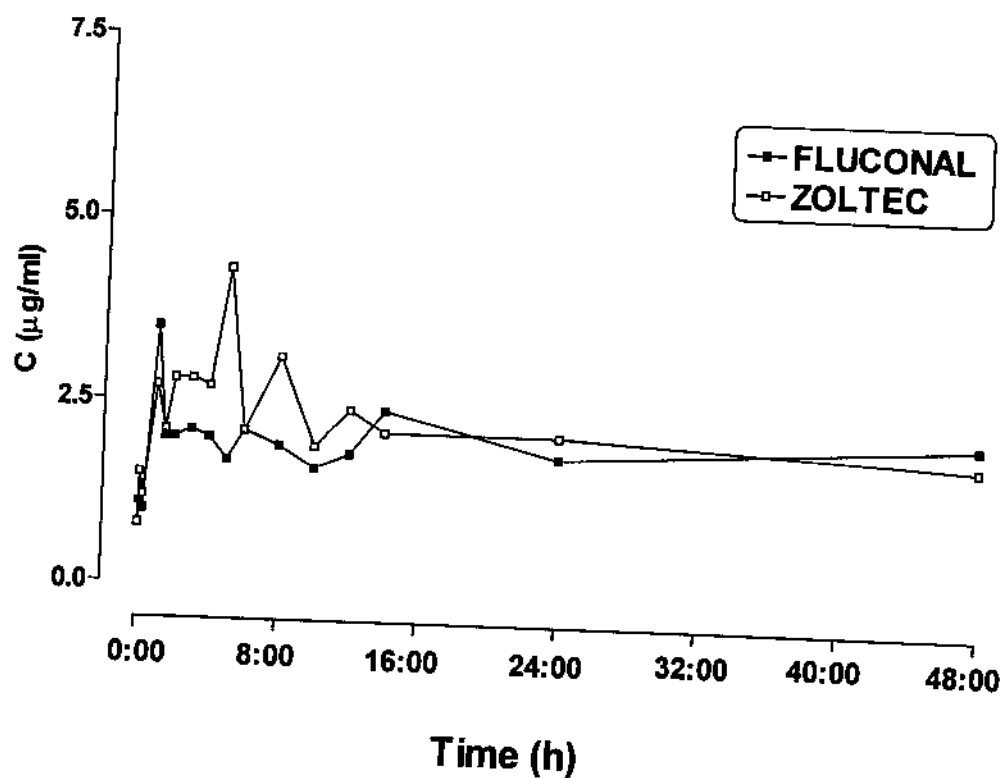
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} (µg/ml*h)	47.4	126.1
C_{max} (µg/ml)	3.4	4.1
$AUC_{0-\infty}$ (µg/ml*h)	161.6	310.7
K_e	0.014	0.013
$T_{1/2}$ (h)	49	58
C_{max}/AUC	0.071	0.032
T_{max} (h)	10	2

VOL. VIII - DLR



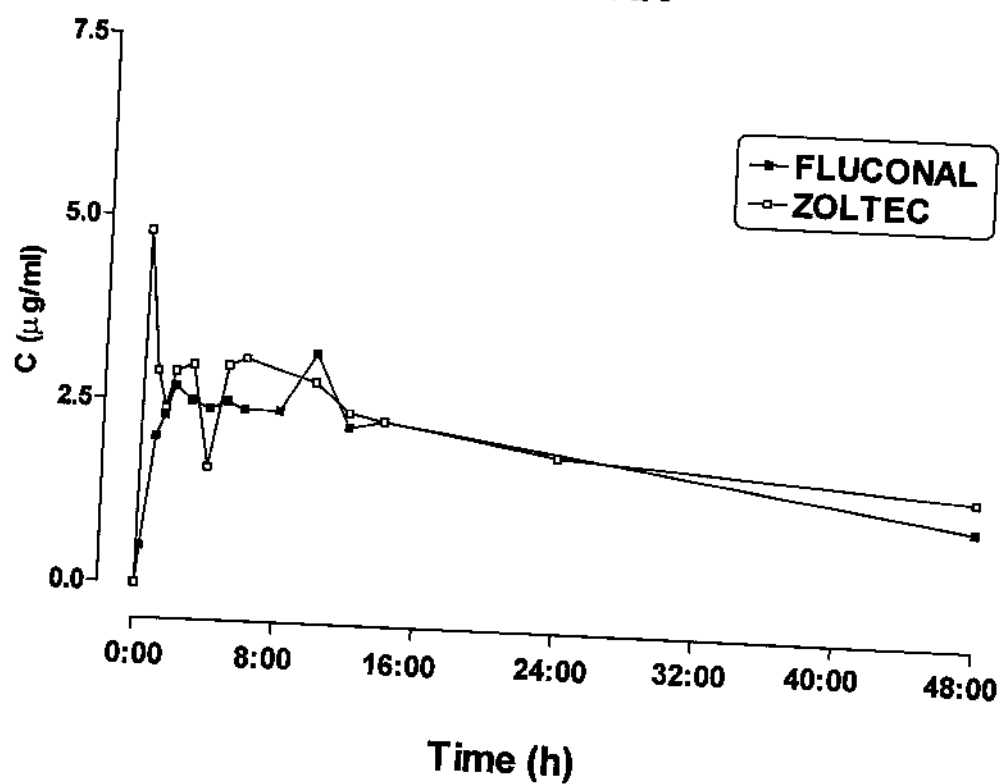
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	108	73.8
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/ml}$)	4.5	3.4
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	234.6	121.4
K_e	0.015	0.021
$T_{1/2}$ (h)	44.8	33.5
$C_{\max}/AUC$	0.041	0.046
$T_{\max}$ (h)	4	3

VOL. IX - EOGJ



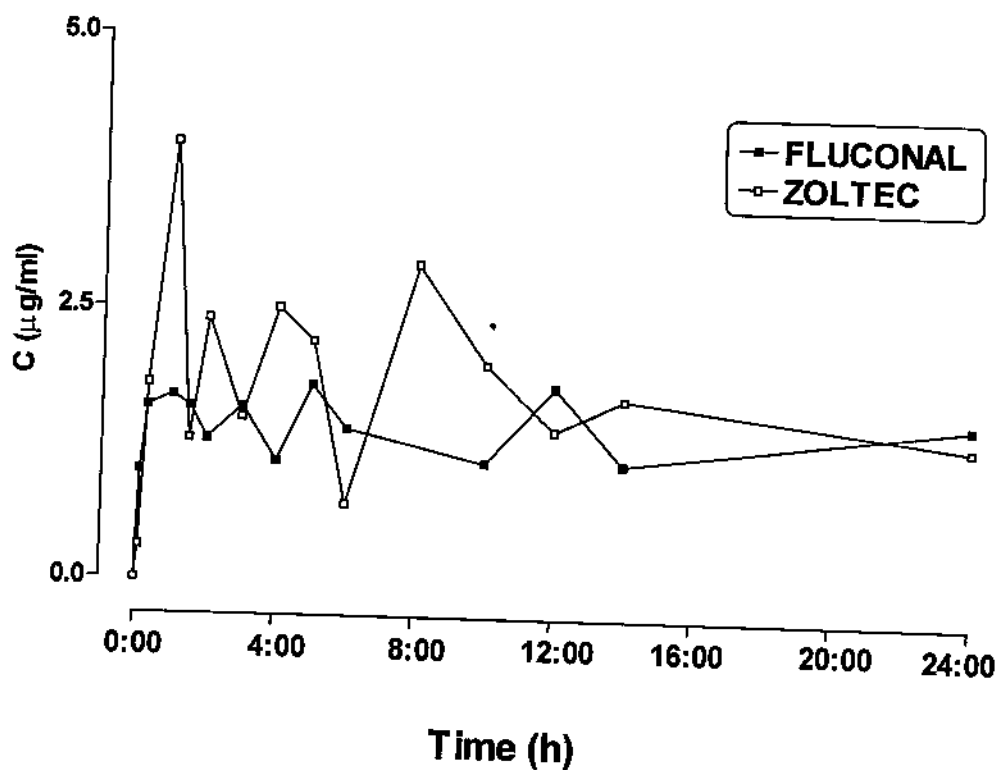
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} (µg/ml*h)	94	102
C_{max} (µg/ml)	3.5	4.3
$AUC_{0-\infty}$ (µg/ml*h)	244	230.5
K_e	0.014	0.014
$T_{1/2}$ (h)	51.2	49.6
C_{max}/AUC	0.037	0.042
T_{max} (h)	1	5

VOL. X - JAR



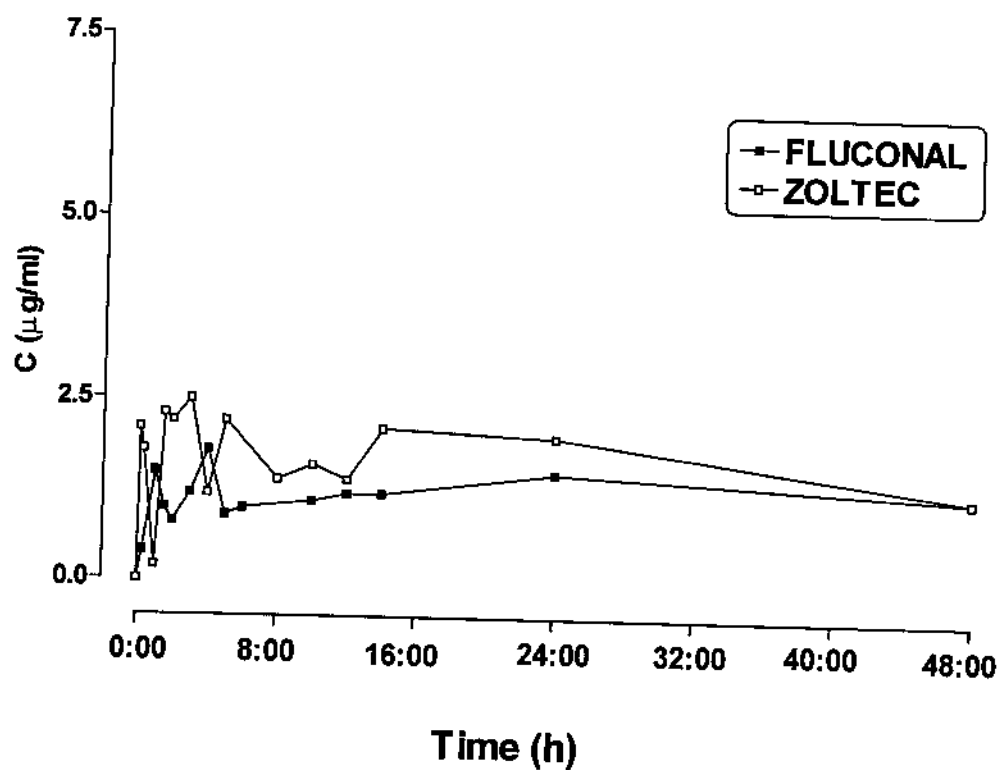
	Fluconal	Zoltec
$AUC_{0-48} (\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	98.7	102.8
$C_{\max} (\mu\text{g/ml})$	3.2	4.8
$AUC_{0-\infty} (\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	159.8	196.5
K_e	0.018	0.016
$T_{1/2} (\text{h})$	37.7	42.2
$C_{\max}/AUC$	0.032	0.046
$T_{\max} (\text{h})$	10	0.3

VOL. XI - PRPG



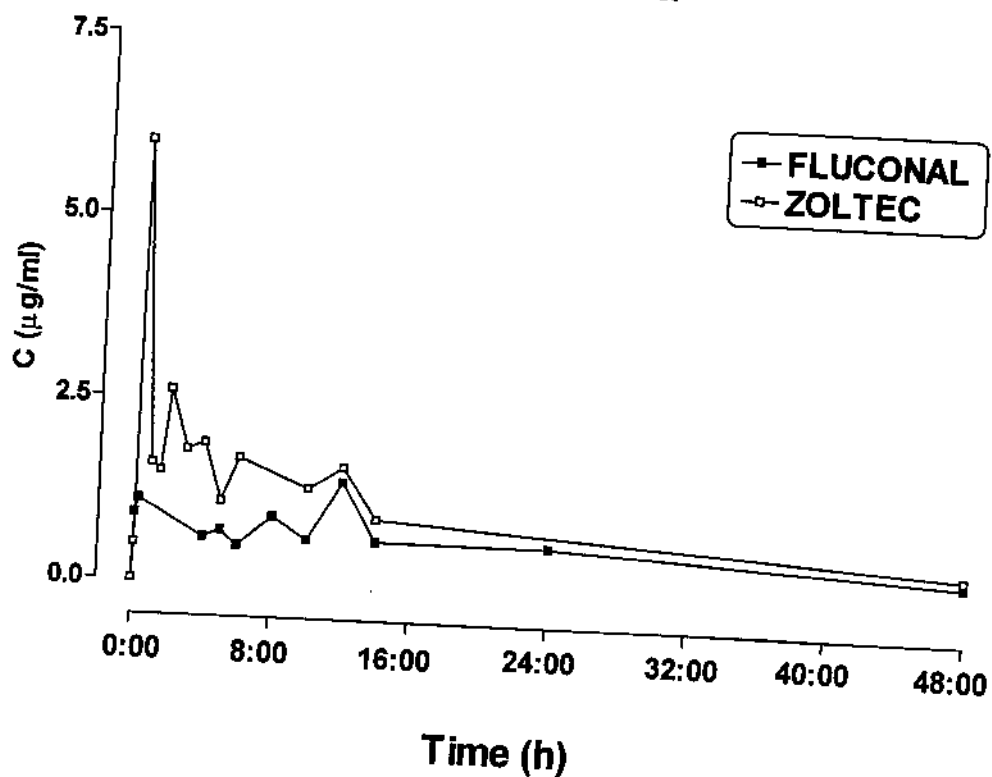
	Fluconal	Zoltec
$AUC_{0-48} (\mu g/ml \cdot h)$	33	42
$C_{max} (\mu g/ml)$	1.8	4
$AUC_{0-\infty} (\mu g/ml \cdot h)$	126.7	118.4
K_e	0.016	0.017
$T_{1/2} (h)$	43.6	41.4
C_{max}/AUC	0.054	0.095
$T_{max} (h)$	5	1

VOL. XII - ALBC



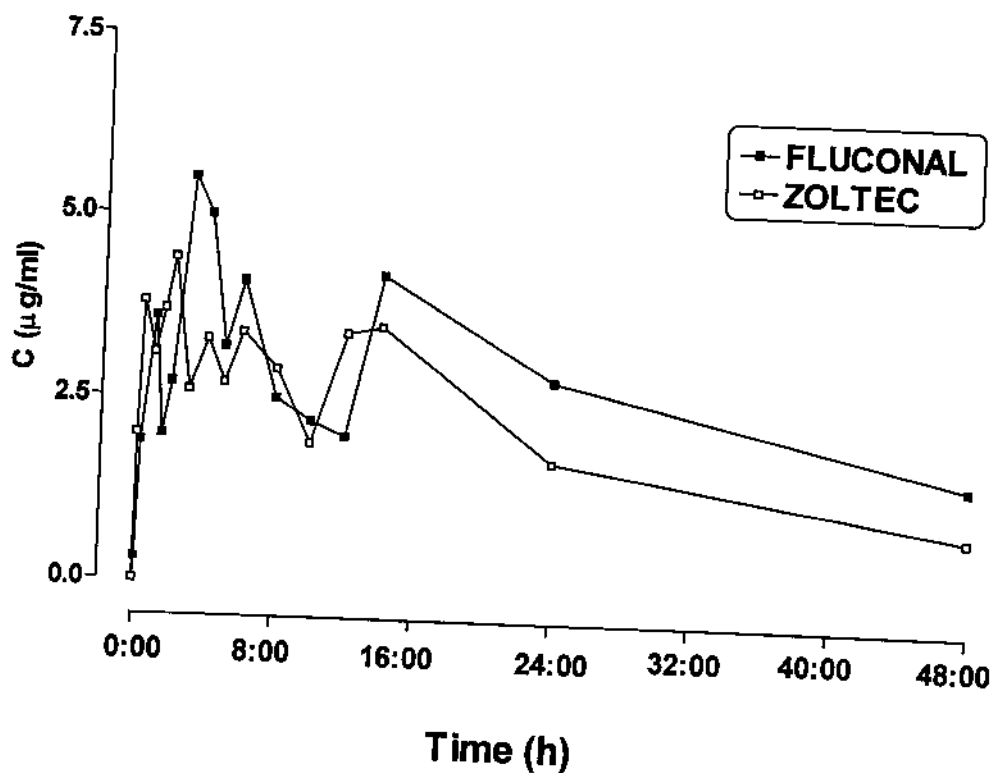
	Fluconal	Zoltec
$AUC_{0-48} (\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	30.1	43.6
$C_{\max} (\mu\text{g/ml})$	1.8	2.5
$AUC_{0-\infty} (\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	163.4	163.6
K_e	0.009	0.010
$T_{1/2} (\text{h})$	74.5	70.4
$C_{\max}/AUC$	0.059	0.057
$T_{\max} (\text{h})$	4	3

VOL. XIII - JAXF



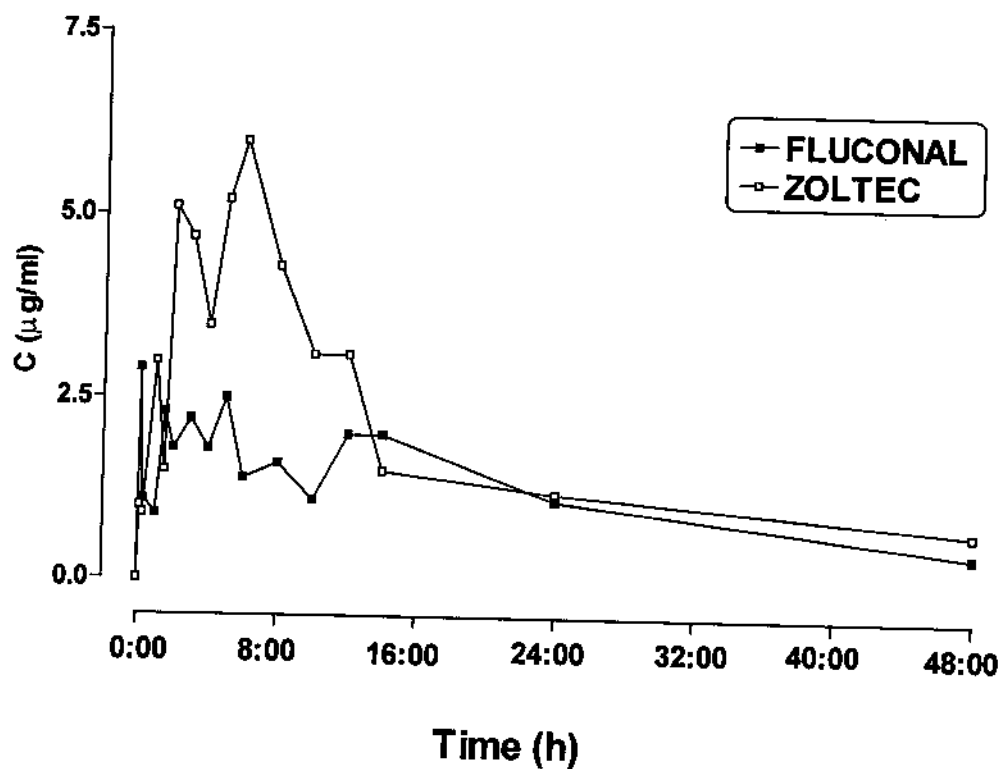
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	28.3	45.4
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/ml}$)	1.4	6
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	41.9	59.6
K_e	0.022	0.028
$T_{1/2}$ (h)	31.6	24.6
$C_{\max}/AUC$	0.049	0.133
$T_{\max}$ (h)	12	0.5

VOL. XIV - PAN



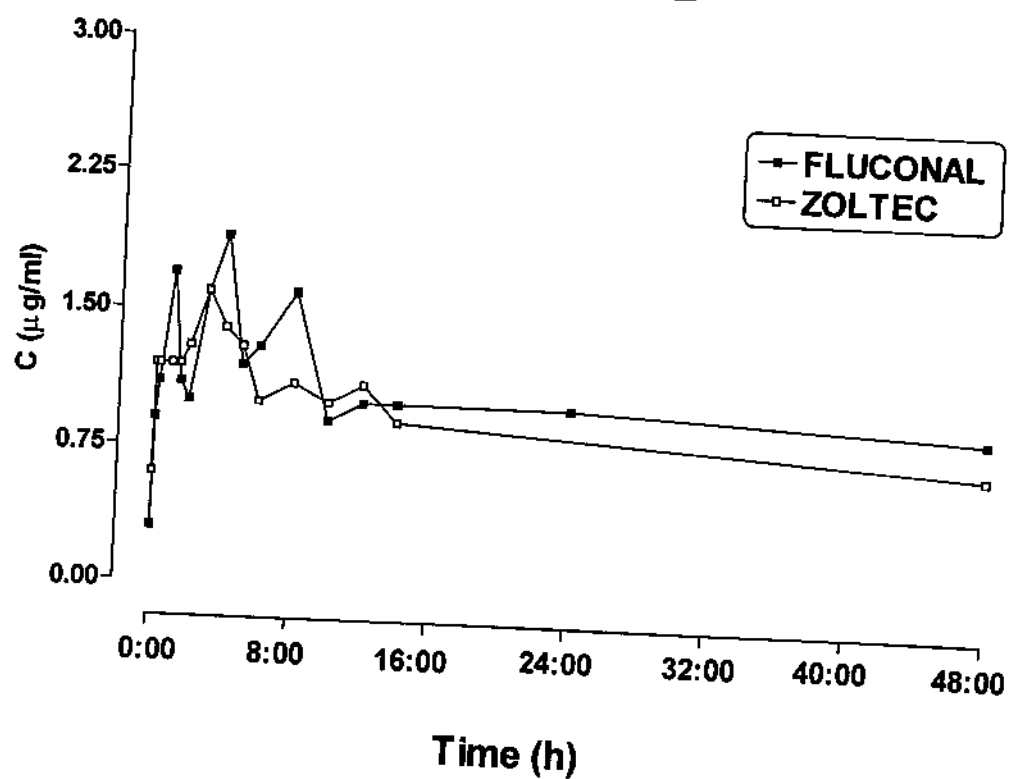
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	129	98
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/ml}$)	5.5	4.4
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	194.2	123.8
K_e	0.023	0.031
$T_{1/2}$ (h)	30.3	22
$C_{\max}/AUC$	0.042	0.044
$T_{\max}$ (h)	3	2

VOL. XV - KLMB



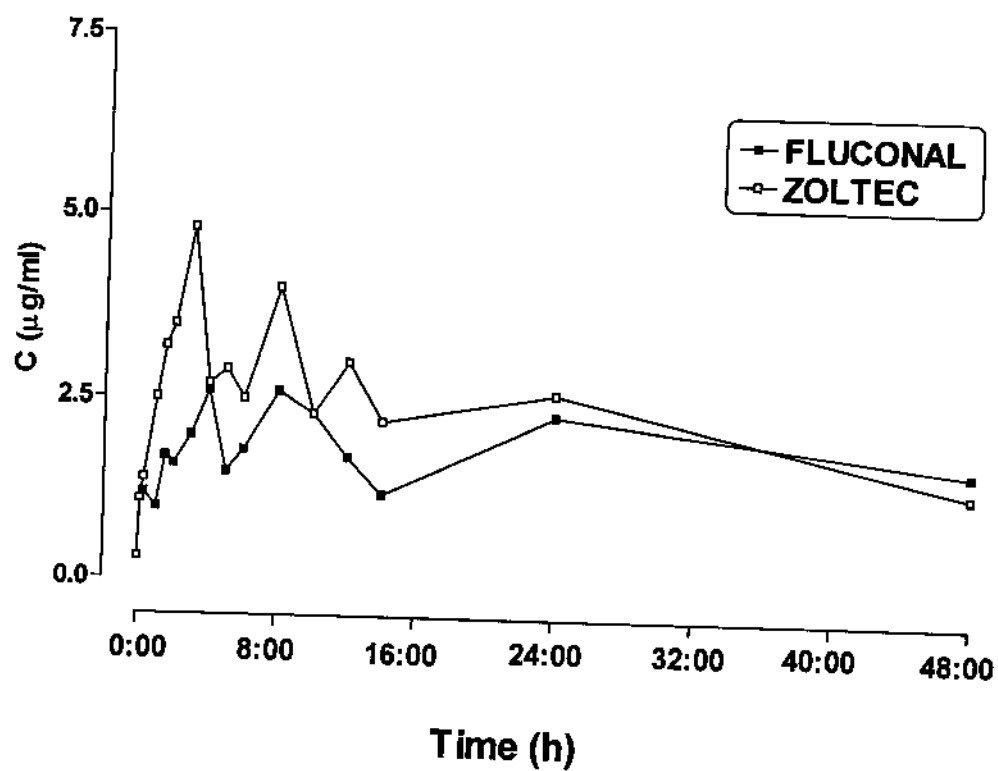
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	57	87
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/ml}$)	2.9	6
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	73	118.8
K_e	0.025	0.022
$T_{1/2}$ (h)	27.3	30.9
$C_{\max}/AUC$	0.050	0.068
$T_{\max}$ (h)	0.25	6

VOL. XVI - MCL



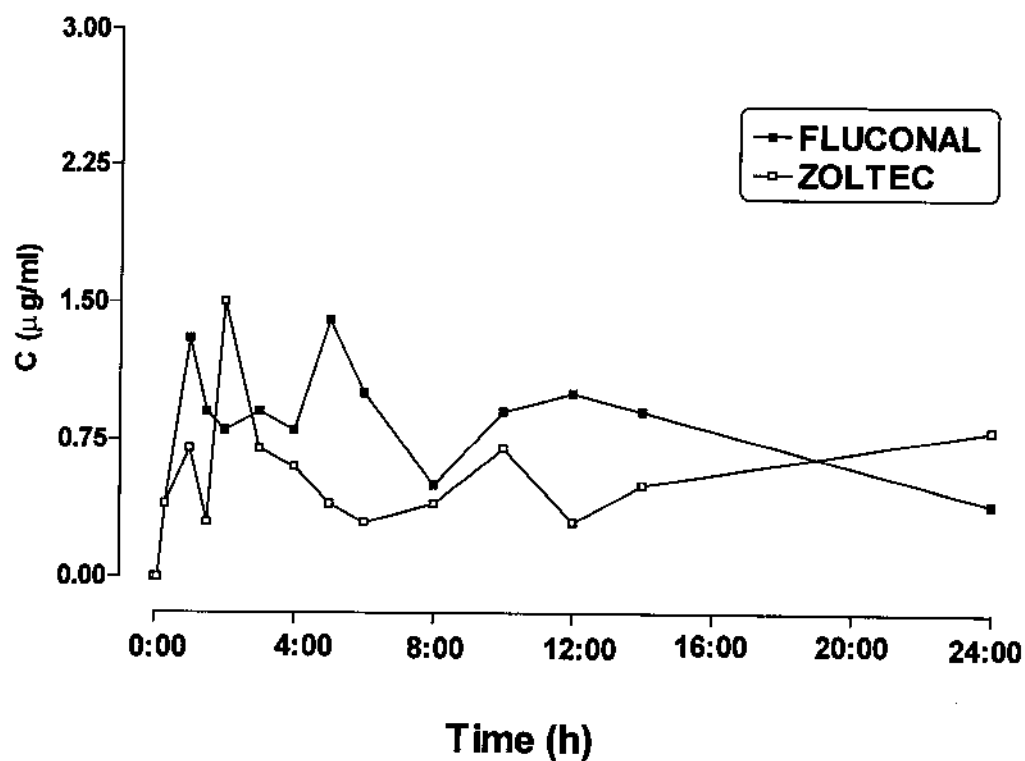
	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	50	49
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	1.9	1.6
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	86	80.8
K_e	0.025	0.022
$T_{1/2}$ (h)	28.1	30.8
C_{max}/AUC	0.038	0.032
T_{max} (h)	4	3

VOL. XVII - JADN



	Fluconal	Zoltec
$AUC_{0-48} (\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	91	112
$C_{\max} (\mu\text{g/ml})$	2.6	4.8
$AUC_{0-\infty} (\mu\text{g/ml}\cdot\text{h})$	197.6	184.2
K_e	0.015	0.018
$T_{1/2} (\text{h})$	45.8	38.6
$C_{\max}/AUC$	0.028	0.042
$T_{\max} (\text{h})$	4	3

VOL. XVIII - AGAV



	Fluconal	Zoltec
AUC_{0-48} ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	18.8	13.8
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/ml}$)	1.4	1.5
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	31.3	58.2
K_e	0.032	0.018
$T_{1/2}$ (h)	21.5	38.7
$C_{\max}/AUC$	0.074	0.108
$T_{\max}$ (h)	5	2

Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
27 de julho de 1995

COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA DO HC/UNICAMP

CONSULTA No. 286/95-C.Ética

ASSUNTO: Projeto de Pesquisa - "Estudo de bioequivalência de duas preparações comerciais de comprimidos de fluconazo"

INTERESSADO: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

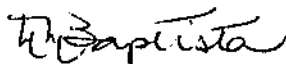
RELATOR: Prof. Dr. Ubirajara Ferreira

PARECER

O estudo em questão preenche os pré-requisitos necessários para experimentação em humanos, contendo um Termo de Consentimento detalhado e adequado. Portanto, a Comissão de Ética Médica do Hospital das Clínicas da Unicamp manifesta-se favoravelmente a realização do trabalho.



Prof. Dr. Ubirajara Ferreira
MEMBRO-RELATOR



Dra. Maria Tereza M. Baptista
PRESIDENTE DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA
HC/UNICAMP

Comparative bioavailability of two atenolol tablet formulations in healthy male volunteers after a single dose administration

M.L. MARTINS¹, M.A. PIEROSI¹, L.A. MORAES¹, W. RIBEIRO¹, E. ABBE Jr.¹, G.B. MENDES¹, A. POLI², G. DE NUCCI¹ and M.N. MUSCARA³

¹Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, SP, ²Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, and ³Department of Clinical Medicine, Faculty of Medical Sciences, University São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brazil

Abstract. The bioavailability of 2 atenolol tablet formulations (Angipress from Laboratórios Biosintética, and Atenol from Wellcome ICI Laboratory, Brazil) were compared in 18 healthy male volunteers who received a single 50 mg dose of each atenolol formulation. The study was conducted following an open randomized 2-period crossover design with a 14-day washout interval between doses. Plasma samples were obtained over a 24-hour interval and atenolol concentrations were determined by HPLC with fluorimetric detection. From the plasma atenolol concentration vs time curves the following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC₍₀₋₂₄₎ (area under the concentration vs time curves from 0 - 24 h), k_e (terminal elimination constant), $t_{1/2}$ (terminal first order elimination half-life), AUC (area under the concentration vs time curves extrapolated to infinity), C_{max} (maximum achieved concentration), T_{max} (time to achieve C_{max}) and C_{max}/AUC . All these variables were analyzed using both parametric and nonparametric statistics. Geometric mean Angipress/Atenol individual percent ratios were 99.6% for AUC₍₀₋₂₄₎, 99.7% for AUC, 98.0% for C_{max} , 102.8% for $t_{1/2}$, 97.2% for k_e and 97.8% for C_{max}/AUC , with all their 90% confidence intervals within the bioequivalence range 80 - 125%, thus showing similar patterns of absorption and disposition. Arithmetic mean for individual T_{max} differences was 0.8 h, and the 90% confidence interval did not include the zero value. Based on these results and in accordance with the European Union and the US Food and Drug Administration bioequivalence requirements we conclude that both atenolol formulations are bioequivalent for both the extent and the rate of absorption.

Key words: atenolol - bioavailability - human pharmacokinetics - high-performance liquid chromatography

Introduction

Atenolol (4-(2-hidroxy-3-propoxy-amino-isopropyl)-methyl ethylamino)propoxybenzene acetamide) is a β -adrenergic selective blocker without intrinsic partial agonist or membrane-stabilizing activity widely employed in the treatment of hypertension, angina pectoris, and cardiac arrhythmias [Frishman 1982, Heel 1979, Majid 1979].

It is commercially available as a racemic mixture ((R,S) or rac-atenolol), being the (-)S-form the active

isomer, with no significant pharmacological activity reported for the (+)R-enantiomer [Eggering et al. 1993].

Atenolol is a weak base (pK_a : 9.6) [Heel 1979], with a partition coefficient of 0.015 (n-octanol/buffer pH 7.4, 37° C). After an oral dose administration, atenolol is incompletely absorbed (50% of the drug is bioavailable). It is poorly bound to plasma proteins and only about 5% is metabolized by the liver. Due to its high hydrophilicity, atenolol is mainly eliminated unchanged by the kidneys [Stoschitzky 1993].

The objectives of this study were to determine the relative bioavailability and to compare the pharmacokinetic profiles of two commercial tablet formulations of 50 mg of atenolol: Angipress from Laboratórios Biosintética (test formulation; ANG) and Atenol from Wellcome ICI Laboratories (reference formulation; ATE), in healthy male volunteers.

Received April 17, 1997; accepted May 9, 1997.

Correspondence to Dr. G. de Nucci, Av. Jesuino M. Machado, 415, Campinas, 13092-320, SP, Brazil.



Fig. 1 Examples of obtained HPLC chromatograms. Panel (a): blank plasma showing the absence of peaks at the retention times of the compounds of interest, panel b: plasma sample withdrawn 6 hours after the administration of 50 mg of atenolol. Atenolol concentration measured in this sample was 170 ng/ml. Peak I: atenolol, peak II: metoprolol (internal standard).

differences (test – reference) together with their mean and 90% confidence intervals (CI). The inclusion of the 90% CI for the ratios into the 80 – 125% range, and that of the zero value into the 90% CI for the differences were analyzed by using either parametric (ANOVA for untransformed and log-transformed data) and nonparametric (Wilcoxon rank sum test according to Hauschke et al. [1990]) methods.

Materials

Atenolol, ($\pm$)-metoprolol tartrate (internal standard), sodium dodecyl sulphate (SDS) and HPLC grade acetonitrile were supplied by Sigma Chemicals (St. Louis, Mo, USA). Analytical grade cyclohexane, n-butanol, and sodium hydroxide were obtained from CAQ Indústria e Comércio Ltda. (Sao Paulo, Brazil). Analytical grade hydrochloric acid and monosodium phosphate were purchased from Merck Indústrias Químicas (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). HPLC grade methanol was obtained from Montecatini Group (Milano, Italy).

The commercial atenolol test formulation tablets Angipress 50 mg (lot 94102701) is marketed by Laboratórios Biosintética (Sao Paulo, Brazil) and the reference atenolol tablet formulation Atenol 50 mg (lot 48894) is marketed by Wellcome-ICI Laboratories (Sao Paulo, Brazil).

Results

Both atenolol formulations were well tolerated at the administered dose. No adverse effects were reported and

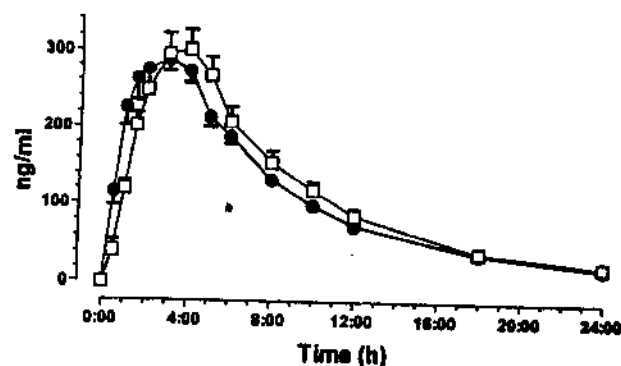


Fig. 2 Plasma atenolol concentrations (mean $\pm$ SEM) versus time curves obtained from 18 healthy male volunteers after the single administration of each 50 mg atenolol tablet formulation (open circles: ATE, empty squares: ANG).

the biochemical parameters remained unchanged and within the reference range. A discrete fall in both systolic and diastolic arterial pressure (approximately 10 mmHg in supine position) was observed during the first 8 – 10 hours following atenolol administration. However, both formulations showed similar profiles with no statistically significant differences at any time (data not shown). No significant effect on heart rate was observed either at any time with respect to the basal value or between the formulations.

Figure 1 shows typical chromatograms obtained by the HPLC method described. Retention times were 5.5 and 8 min for atenolol and metoprolol, respectively. Under the described conditions, the lowest quantifiable atenolol plasma concentration was 20 ng/ml (taken as 5 times the signal/noise ratio value). The calibration curve was linear over the range 20 ng/ml to 1,000 ng/ml, with typical regression coefficients higher than or equal to 0.999, and intercept values not significantly different from zero. Interassay variation values (as % CV) were 21.3, 10.5, 9.0, 4.4, 7.6, and 2.2% for plasma atenolol concentrations of 20, 50, 108, 200, 500, and 1,000 ng/ml, respectively (number of replicates between 14 and 17 for each concentration). Intraassay variation was determined by assaying 6 replicates of atenolol plasma samples of concentration 55, 214, and 1,081 ng/ml within the same run, and the coefficients of variation obtained were 6.3, 2.6, and 4.3%, respectively.

The mean atenolol plasma concentration vs time profiles obtained after the single oral administration of each atenolol 50 mg tablet formulation are shown in Figure 2.

Table 1 shows geometric mean and 90% CI values for $AUC_{(0-24)}$, AUC , k_e , $t_{1/2}$, C_{max} , and C_{max}/AUC , and median and range for T_{max} values obtained for each atenolol tablet formulation.

Table 2 shows statistical analysis of the individual test/reference ratios of $AUC_{(0-24)}$, AUC , k_e , $t_{1/2}$, C_{max} and C_{max}/AUC , as well as the inclusion of the 90% CIs for the geometric means into the bioequivalence range 80 – 125%.

showed any value below the 85% of AUC. This allows the calculation of the relative extent of bioavailability from the AUC₍₀₋₂₄₎ values, in accordance to the European Union (EU) statements (minimum 80% of total AUC).

Table 2 shows that 90% CI of mean AUC₍₀₋₂₄₎, AUC, C_{max}, k_e, t_{1/2}, and C_{max}/AUC (after the log-transformation of individual ratios) were included into the bioequivalence range, i.e. 80–125%, when analyzed by either parametric or nonparametric analysis. Individual T_{max} differences were statistically different from zero as shown by the 90% CI obtained by parametric and nonparametric tests. These results mean that both formulations are clearly bioequivalent for the extent of absorption, as stated by the US Food and Drug Administration authorities [1985, 1993]. However, the results obtained on individual T_{max} differences make that the conclusions on bioequivalence for the rate of absorption should be more thoroughly discussed. Despite C_{max} and T_{max} being considered as indexes of absorption rate, many authors have questioned the usefulness and the limitations of these parameters to decide on a bioequivalence problem, given the effects that the sampling schedule has on them. In this way, Endrenyi et al. [1991] have demonstrated that C_{max} not only reflects the rate, but also the extent of absorption, as evidenced by the high correlation observed with the parameter AUC, and proposed that the ratio C_{max}/AUC should better reflect the absorption rate. In this study, geometric means and 90% CI for test/reference ratios for either C_{max}/AUC or C_{max} alone were entirely included into the 80–125% range. Based on these results, the conclusions on the presence of bioequivalence for the rate of absorption are in opposition with the finding of significant differences observed in T_{max} between the formulations. The EU guidelines state that assessment of T_{max}, as an index of rate of absorption, "only makes sense if there is a clinical relevant claim for rapid release or action or signs for a relation to adverse effects" [Salmonson 1996]. As shown in Table 1, the median T_{max} values for two 50 mg atenolol tablet formulations are 2.5 and 3 h, with wide intervals (1–4 and 1.5–5 h for the reference and test formulations, respectively). As already mentioned, when the volunteer's blood pressure or heart rate values were compared no significant differences were observed at any time point, despite having both formulations caused a decrease in blood pressure. Considering these observations, we can conclude that the difference in T_{max} between both formulations (mean 0.8 h) is not of clinical significance, even when chronically administered to cardiac patients. Based on these considerations and on the obtained results, we conclude that the test formulation Angipress is bioequivalent with the reference Atenol for the rate and extent of absorption.

Acknowledgement

Supported by a grant FINEP/BIOSINTETICA.

REFERENCES

- Boyd RA, Chin KS, Pedro OD, Williams RL, Giacomini KM 1989 The pharmacokinetics of the enantiomers of atenolol. *Clin Pharmacol Ther* 45: 403-410
- Clemeti WA, Garvey TQ, Clifton GD, McCoy RA, Brandt S, Schwartz 1994 Single dose pharmacokinetics of (S)-atenolol administered orally as a single enantiomer formulation and as a racemic mixture (Tenormin). *Chirality* 6: 169-174
- Endrenyi L, Fritsch S, Yan W 1991 C_{max}/AUC is a clearer measure than C_{max} for absorption rates in investigations of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther* 29: 394-399
- Egginger G, Lindner W, Karh S, Stoschitzky K 1993 Stereoselective HPLC bioanalysis of atenolol enantiomers in plasma: application to a comparative human pharmacokinetic study. *Chirality* 5: 506-512
- Food and Drug Administration 1985 Federal Register, part 320: Bioavailability and Bioequivalence Requirements, pp 154-173
- Food and Drug Administration 1993 In vivo bioequivalence guidances. *Pharmacopeial Forum* 19: 6501-6508
- Frishman WH 1982 Atenolol and Timolol, two new systemic β -adrenoceptor antagonists. *N Engl J Med* 306: 1424-1462
- Hauschke D, Steinijans VW, Diletti E 1990 A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 28: 72-78
- Heel RC, Brogden RN, Speight TM, Avery GS 1979 Atenolol: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in angina pectoris and hypertension. *Drugs* 17: 425-460
- Irshaid YM, Rawashdeh NM, Awwadi FF, Kato MK 1996 Comparative pharmacokinetics of two brands of atenolol following a single oral administration. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 34: 457-461
- Majid PA, van der Vijgh WJF, Feitjer PJ, Wade R, van der Wall EE, Roos JP 1979 Once daily atenolol (Tenormine) in the treatment of angina pectoris. Observations on clinical efficacy, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Eur J Cardiol* 9: 419-435
- Miller RB, Guertin Y 1992 High performance liquid chromatography assay for the derivatized enantiomers of atenolol in whole blood. *J Liq Chromatogr* 15: 1289-1302
- Muscará MN, de Nucci G 1995 Comparative bioavailability of single doses of tablet formulations of cetirizine dihydrochloride in healthy male volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 33: 27-31
- Salmonson T 1996 Current practice of BA/BE requirements for immediate release products in the EU. Abstract from Bio International: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics, International Conference of F.I.P. Bio-Internacional 96, Tokyo, pp 16-19
- Shen J, Wanwimolruk S, Hung CT, Zoest AR 1991 Quantitative analysis of β -blockers in human plasma by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography using a micropore column. *J Liq Chromatogr* 14: 77-793
- Stoschitzky K, Egginger G, Zernig G, Klein W, Lindner W 1993 Stereoselective features of (R)- and (S)-atenolol: Clinical pharmacological, pharmacokinetic and radioligand binding studies. *Chirality* 5: 15-19
- Terry S, Teitelbaum Z 1991 A liquid chromatographic method for determination of atenolol in human plasma. *J Liq Chromatogr* 14: 3735-3744
- Yee YG, Ruben P, Blaschke TF 1979 Atenolol determination by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J Chromatogr* 171: 357-362