

Maria Carla Petrellis

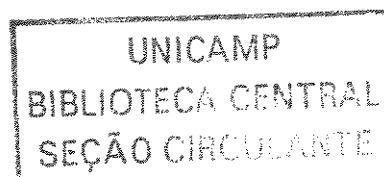
“Estudo de Bioequivalência de duas formulações de comprimidos de Pantoprazol em voluntários sadios de ambos os sexos”

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Maria Carla Petrellis.

Campinas, 22 de dezembro de 2004.

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

Campinas - Unicamp
2.004



Maria Carla Petrellis

“Estudo de Bioequivalência de duas formulações de comprimidos de Pantoprazol em voluntários sadios de ambos os sexos”

Dissertação 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

*Campinas - Unicamp
2.004*

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP P447e
V	EX
TOMBO BC	63170
PROC.	16-P-00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	15/04/05
Nº CPD	

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

P447e Petrellis, Maria Carla
 “Estudo de bioequivalência de duas formulações de comprimidos de pantoprazol em voluntários sadios de ambos os sexos / Maria Carla Petrellis. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Gilberto de Nucci
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biodisponibilidade. 2. Farmacocinética. 3. . Farmacologia clínica . 4. Equivalência terapêutica. I. Gilberto de Nucci. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

SLP



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Membros:

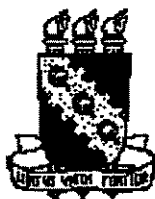
Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Prof. Dr. Sigisfredo Luis Brenelli

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

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

Data: 22/12/2004



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 052/99

Fortaleza, 03 de setembro de 1999

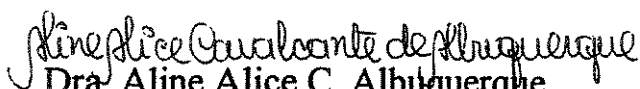
Protocolo n° 058/99

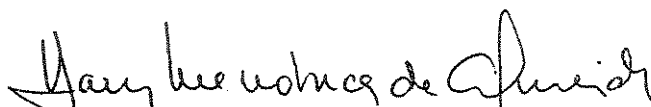
Dept°./Serviço: Unidade de Farmacologia Clínica/UFC

Título do Projeto: "Estudo de bioequivalência de duas formulações de Pantoprazol em voluntários sadios de ambos os sexos"

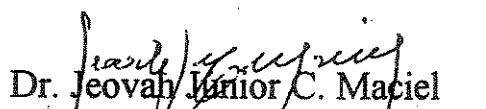
Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n°196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o protocolo clínico, a ficha clínica e o termo de consentimento informado do projeto supracitado, na reunião do dia 02 de setembro de 1999.

Atenciosamente,


Dra. Aline Alice C. Albuquerque
Profa. Adjunto IV/Farmacêutica


Dra. Yacy Mendonça de Almeida
Profa. Adjunto IV/Médica


Dra. Mirian Parente Monteiro
Profa. Assistente III/Farmacêutica


Dr. Jeovah Junior C. Maciel
Bacharel em Administração de
Empresa

“Homem algum, por mais conhecimentos que tenha, pode ser chamado de culto enquanto existir uma brecha entre seu saber e seu modo de viver”

S.C. Powys

*“Aos meus pais, pela formação, compreensão e principalmente
incentivo nos momentos mais importantes da minha vida”*

Agradecimentos

Aos meus pais e familiares por todo estímulo, confiança e apoio recebido ao longo da minha vida.

Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci pela oportunidade, confiança, ensinamentos e acima de tudo pelo exemplo dignificante de tenacidade e de amor à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno por contar com sua experiência em ensaio clínico durante a realização deste trabalho

Aos amigos Wellington Ribeiro, Marcio Motta, pelo apoio técnico e científico recebido durante a realização deste trabalho.

Ao amigo José Walber Miranda Costa Cruz pela orientação e ajuda nos momentos mais difíceis e de desespero.

Em especial ao meu grande amigo Juliano Rocha de Oliveira por sempre contar com seu incondicional apoio emocional nos momentos mais difíceis e de desespero e por acreditar no meu trabalho.

Ao Mauro Sucupira, pelo auxílio técnico recebido durante a realização dos experimentos.

A toda equipe do laboratório Cartesius, em especial Mario Porrio Baldini, Débora Rodrigues da Silva, Marcus Vinicius Ferreira de Araújo, Yuri Borges Vannuchi, Rafael Eliseo Barrientos-Astigarraga, Jaime Ilha pela convivência e apoio durante este período.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, em especial a Eliane, Fran e Wanderley.

Agradeço aos demais professores do Departamento de Farmacologia da FCM, em especial ao Prof. Dr. Heitor Moreno Jr e Profa. Dra. Albetiza Lobo de Araújo, pela oportunidade e confiança.

A Altana Pharma Ltda pelas pesquisas em farmacologia básica e apoio na documentação científica referente a inibidores de bomba protônica.

Sumário

	<i>Pág.</i>
<i>Lista de abreviaturas</i>	ix
<i>Lista de figuras</i>	xii
<i>Lista de tabelas</i>	xiv
<i>Resumo.....</i>	xvi
 Capítulo 1 – Introdução Geral	
<i>Validação de Métodos Bioanalíticos.....</i>	19
 Capítulo 2 – Estudo de Bioequivalência de duas formulações comprimidos de pantoprazol em voluntários sadios de ambos os sexos	
<i>Introdução.....</i>	52
<i>Objetivos.....</i>	68
<i>Materiais e Métodos.....</i>	69
<i>Resultados.....</i>	93
<i>Discussão.....</i>	107
<i>Abstract.....</i>	112
<i>Referências Bibliográficas.....</i>	114
 Anexos	
<i>Anexos I.....</i>	141
<i>Anexos II.....</i>	167
<i>Anexos III.....</i>	178

Lista de Abreviaturas

ASC (0-12h) – Área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo, calculada pelo método dos trapezóides, do tempo zero a 12 horas

ASC (0- ∞) – Área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo, calculada do tempo zero ao tempo infinito.

C_{máx} – Pico de concentração máxima do fármaco.

T_{máx} – Tempo para atingir o C_{máx}.

T_{1/2} – Meia vida de eliminação.

K_e – Constante de eliminação.

V_d – Volume aparente de distribuição.

CL – Clearance total da droga no corpo em relação ao plasma

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

HPLC – High - performance liquid chromatographic.

LC-MS/MS – High -performance liquid chromatographic/mass spectrometry.

CG-MS/MS – Gas chromatographic/mass spectrometry.

CG – Gas chromatographic

MS – mass spectrometry (Espectrômetro de massa).

C – Concentração

RIA – Radioimunoensaio.

EMIT – Imunoensaio de Múltiplas enzimas.

ELISA – Ensaio de imunoabsorção de enzimas ligadas.

U.V – Spectro de luz na faixa do ultra – violeta.

C18 – Carbono18.

C8 – Carbono 8.

TFA – Ácido Trifluoro Acético.

LOQ – Limite de Quantificação.

LOD – Limite de Detecção.

D.P – Desvio Padrão.

D.P.R – Desvio Padrão Relativo.

E.R – Erro Padrão.

r^2 – Coeficiente de determinação.

FDA – Food and Drug Administration.

EU – União Européia.

ANOVA – Análise de Variância.

USP – United State of Pharmacopoeia.

ISO – International Organization for Standardization.

ICH – International Conference of Harmonization.

IUPCA - International Union of Pure and Applied Chemistry.

ID₅₀ – Dose requerida para se obter a metade da inibição máxima da secreção ácida.

ECG – Eletrocardiograma.

IBP – Inibidores de Bomba Protônica.

H⁺/K⁺-ATPase – Bomba Protônica.

pH – Potencial Hidrogeniônico.

pKa – Potencial de ionização ácida.

CYP – Enzima citocrômica hepática.

HIV – Vírus da imunodeficiência humana.

TGP – Transaminase glutâmico pirúvica

Gama GT – Gama glutamil tranferase

Lista de Figuras

Figura 1- Cromatogramas de íons (MRM): (A) Plasma humano branco (MRM: 366,10>91,50). (B) Plasma humano lipêmico (MRM: 366,10>91,50). (C) Plasma humano hemolisado (MRM: 366,10>91,50).

Figura 2 - Cromatogramas de íons (MRM): (A) Limite de quantificação (35ng/mL), (MRM: 366,10>91,50). (B) Padrão interno carbamazepina (50 ng/mL), (MRM: 236,89>194,09).

Figura 3 - Cromatogramas de íons (MRM): (A) Amostra de plasma de um voluntário coletada 5 horas após administração da formulação teste (40 mg de pantoprazol) (MRM: 366,10>91,50). (B) Plasma humano contaminado com o padrão interno carbamazepina (50 ng/mL) (MRM: 236,89>194,09). (C) Concentração plasmática máxima (99 ng/mL), pantoprazol (MRM: 366,10>91,50) e seu padrão interno, carbamazepina (50 ng/mL) (MRM: 236,89>194,09).

Figura 4 - Cromatogramas de íons (MRM): (A) Amostra de plasma de um voluntário coletada 3 horas após administração da formulação teste (40 mg de pantoprazol) (MRM: 366,10>91,50). (B) Plasma humano contaminado com o padrão interno carbamazepina (50 ng/mL) (MRM: 236,89>194,09). (C) Concentração plasmática máxima (145 ng/mL), pantoprazol (MRM: 366,10>91,50) e seu padrão interno, carbamazepina (50 ng/mL) (MRM: 236,89>194,09).

Figura 5 - Espectro de massa: (A) Espectro do Pantoprazol adquirido em Q1, energia do cone = 50v. (B) Espectro dos produtos de íons do pantoprazol adquirido em Q2 após colisão induzindo dissociação, energia do cone = 50v e energia de colisão= 35 eV.

Figura 6 - Espectro de massa: (A) Espectro da carbamazepina adquirido em Q1, energia do cone = 30v. (B) Espectro dos produtos de íons da carbamazepina adquirido em Q2 após colisão induzindo dissociação, energia do cone = 25v e energia de colisão= 15 eV.

Figura 7 - Curva de calibração obtida após a contaminação de plasma humano com Pantoprazol (35.0 – 1000 ng/ mL) e Carbamazepina (50.0 ng/ mL).

Figura 8 - Concentrações plasmáticas (médias aritméticas $\pm$ EP) de pantoprazol em função do tempo para as duas formulações de pantoprazol (40mg) administradas em 22 voluntários sadios de ambos os sexos.

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Distribuição final dos grupos com base na diferença de sexo com a mesma dose de Pantoprazol nos períodos de internação: (1), (2) .

Tabela 02 – Tabela de randomização.

Tabela 03 – Soluções padrões Pantoprazol.

Tabela 04 - Soluções padrões de Carbamazepina.

Tabela 05 - Curva de calibração: Volume das soluções padrões de Pantoprazol utilizados para obtenção da curva de calibração.

Tabela 06 - Preparo dos controles de qualidade.

Tabela 07 - Típicos tempos de retenção.

Tabela 08 - Ions Monitorados.

Tabela 09 - Soluções padrões.

Tabela 10 – Diferentes curvas obtidas após a contaminação de plasma humano com pantoprazol (35.0 – 1000 ng/mL) e carbamazepina (50.0 ng/mL) durante a realização do interensaio.

Tabela 11 – Intra – ensaio e interensaio.

Tabela 12 – Parâmetros farmacocinéticos de pantoprazol obtidos após a administração de cada uma das formulações de pantoprazol (40mg) nos 22 voluntários.

Tabela 13 – Análise estatística das razões individuais teste/referência da ASC 0-12h, ASC0- ∞ , Cmax, e das diferenças teste – referência de Tmax entre ambas as formulações de pantoprazol.

Neste trabalho foram comparadas as biodisponibilidades de duas formulações de comprimidos de pantoprazol: Pantozol 40 mg, (Laboratório Byk Química; formulação de referência) *versus* Pantoprazol, comprimidos 40 mg (Laboratório Merck; formulação teste), em vinte dois voluntários sadios de ambos os sexos.

O protocolo clínico constava de dois períodos randômicos, com intervalo de quatorze dias entre as doses, aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Este estudo foi conduzido de acordo com as cláusulas das revisões da Declaração de Helsinki (1965), de Tokyo (1975) e de Veneza (1983).

Os voluntários, após triagem, foram hospitalizados às 23 horas do dia anterior do estudo clínico sob jejum e, às 7 horas do dia seguinte, iniciou-se o ensaio clínico. Receberam uma única dose de pantoprazol de cada formulação e as amostras de sangue foram obtidas imediatamente antes e a intervalos regulares, até 12 horas após a administração da droga.

A Concentração plasmática de pantoprazol foi determinada por CLAE detecção MS/MS. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos de cada formulação de pantoprazol foram: área sobre a curva da concentração plasmática em função do tempo de 0 até 12 h (ASC[0-12]), concentração máxima alcançada (C_{máx}) e o tempo em que a referente ocorre (t_{máx}), meia vida de eliminação (t_{1/2}), constante de eliminação terminal de primeira ordem (k_e) e a área sobre a curva extrapolada ao infinito (ASC[0-∞]). Todos os parâmetros farmacocinéticos foram analisados por métodos estatísticos paramétricos e não-paramétricos. Assim, os resultados dos parâmetros farmacocinéticos obtidos à partir da média geométrica das razões individuais Pantoprazol®/ Pantozol® foram 105.5% para ASC[0-12h], 102.5% para ASC[0-∞], 99.8% para C_{máx} e 105.6% para C_{máx}/ASC[0-12h], e portanto encontram-se totalmente incluídos dentro da faixa de bioequivalência de 80-

125%. As duas formulações de comprimidos de pantoprazol não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em biodisponibilidade. De acordo com os resultados obtidos conforme os requerimentos estipulados pela EU e a FDA (EUA), as duas formulações foram consideradas bioequivalentes, com referência tanto à velocidade quanto ao grau de absorção.

Capítulo I

Introdução geral

1. Validação de Métodos Bioanalíticos

Nas últimas décadas, houve um aumento de métodos bioanalíticos aplicados à cromatografia para a determinação qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados, matérias primas e amostras biológicas, em todas as fases do desenvolvimento do fármaco, desde a pesquisa até a realização de estudos de bioequivalência.

Assim, devido a este aumento e a globalização da economia, a adoção de um sistema de qualidade reconhecido e universalmente aceito, é requisito fundamental. Portanto, o entendimento do que constitui uma validação de métodos cromatográficos, possibilita a garantia de um nível satisfatório de qualidade na validação metodológica (Massart *et al.*, 1998; Swartz e Krull, 1998).

A Bioanálise é uma das áreas da ciência analítica que exige uma validação metodológica. Essa validação é realizada para garantir que a mesma seja exata, específica, reproduzível e resistente dentro da variação específica na qual a substância em exame será analisada.

Conforme a definição presente na USP, a validação do método deve assegurar a credibilidade tais requisitos durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como “o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual se destina” (Swartz e Krull, 1998 e USP XXIII, 1985).

Portanto, laboratórios analíticos devem realizar a validação de métodos para atender as exigências dos Órgãos Regulamentadores de Saúde, sendo que os dados obtidos devem fazer parte do processo de registro dos Estudos de Bioequivalência, Biodisponibilidade e Estudos Farmacocinéticos.

Nos anos noventa, Conferências realizadas tanto nos EUA quanto na Europa (Cartwright *et al.*, 1991; Shan *et al.*, 1991 e Arnoux e Morrison, 1992) abordaram os principais parâmetros analíticos (precisão, bias, entre outros) que constituem uma validação analítica e que necessitam ser documentados para o emprego e aceitação de métodos bioanalíticos, aplicados a Estudos de Bioequivalência e Farmacocinéticos, tanto em animais quanto em humanos. Além disso, um dos objetivos destas Conferências foi o estabelecimento de muitos destes parâmetros para que os mesmos possam ser amplamente aceitos na Comunidade Científica.

Portanto, nestas conferências, ficaram estabelecidos os principais procedimentos de validação de métodos bioanalíticos e várias recomendações foram reunidas em relatórios finais, servindo como alvos de debates.

Na verdade, desde os anos noventa, não havia nenhum regulamento específico, bem como resoluções e compêndios que estabeleçam critérios e procedimentos de análises de drogas e ou seus metabólitos em fluídos biológicos, no entanto, um número bem restrito de recentes publicações em revistas e jornais indexados abordou este assunto; em particular o trabalho de Brooks e Wienfeld (Brooks & Wienfeld, 1985) que descreve um completo procedimento de validação analítica através de relatório final em estudo bioanalítico (Jackson, J. A 1994; Shan *et al.*, 1992; Karnes *et al.*, 1991; Brooks and Wienfeld, 1985). Deste modo, tais relatórios publicados em conferências da comunidade científica, juntamente com a participação das indústrias farmacêuticas e órgãos oficiais de saúde como o Food and Drug Administration (FDA), American Association of Pharmaceutical Scientists, Federation International Pharmaceutique, Health Protection Branch (Canadá) e Association of Official Analytical Chemists, entre outros, tiveram como finalidade de estabelecer consenso na padronização dos critérios presentes em métodos bioanalíticos (Jackson, J. A 1994; Shan *et al.*, 1992).

Já no final dos anos 80, a importância da *validação de métodos bioanalíticos* e suas influências na avaliação e interpretação dos resultados, transformou-se em alvo de amplas discussões presentes em diversos trabalhos (Shan *et al.*, 1992; Dadgar *et al.*, 1995), e conseqüentemente através destas, ter melhor direcionamento dos princípios utilizados em bioanálises, tendo com base, principalmente o relatório da Conferência de Washington, fornecendo adequadas diretrizes em relação aos parâmetros exigidos na validação analítica.

Antes que o método analítico seja empregado na rotina, primeiro deve-se demonstrar que o mesmo cumpre os critérios de segurança no seu desempenho. Quando os valores destas exigências são encontrados e registrados, pode-se dizer que o método em questão é validado (Hartmann *et al.*, 1994).

Uma das principais dificuldades na fase de desenvolvimento da validação metodológica é decidir quais parâmetros analíticos (precisão, exatidão, etc.) serão avaliados e os principais critérios de aceitabilidade que devem ser empregados antes do início do processo de validação.

Assim, uma vez que tais parâmetros são fixados, pode-se avaliar sua inclusão em limites de aceitabilidade (Hartmann *et al.*, 1994). Para avaliar as dificuldades; na conferência de Washington, foi proposto *viabilização de guias* para a resolução de dificuldades nos ensaios bioanalíticos (Shan *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1994). Além disso, outros objetivos presentes nesta Conferência foram destacados: determinação de limites de aceitação e a formulação de novas recomendações para o aperfeiçoamento das exigências, principalmente para a precisão e exatidão.

Para se obter conclusões precisas em Estudos Biofarmacêuticos, estas devem ser extraídas a partir de ensaios bioanalíticos, onde as concentrações da droga ou seus metabólitos a ser investigados, devem ser exatos, precisos e seletivos (Jackson, J.A 1994), portanto, a correta avaliação dos Ensaios Biofarmacêuticos só pode ser alcançada se a

exatidão dos dados analíticos forem obtidos (Pachla *et al.*, 1986). Além disso, essa exatidão depende de critérios fundamentais empregados, não só em relação à adequada interpretação desses resultados, como também na aplicação da confiabilidade e na totalidade do desempenho do método bioanalítico. Assim, pode-se destacar como principais critérios: (1) *Avaliação da droga e estabilidade do analito*, (2) *Seletividade/Especificidade*, (3) *Linearidade e modelo de calibração*, (4) *Precisão*, (5) *Exatidão*, (6) *Sensibilidade, Limite de Quantificação e Detecção* e (7) *Recuperação* (Pachla *et al.*, 1986; Buick *et al.*, 1990; MacDouglas e Crummett, 1980; Taylor, 1983; Brooks e Weinfeld, 1985; Dadgar e Smith, 1986; Inman *et al.*, 1987 e Shan, 1987).

Para uma correta interpretação dos resultados, atualmente têm-se proposto uma adequação no planejamento e na realização das fases clínica e analítica compreendidas em Estudos Biofarmacêuticos. Protocolos clínicos normalmente são desenvolvidos utilizando elevado número de dados de informações pré-clínicas e clínicas, a fim de minimizar riscos que os pacientes poderão sofrer. Da mesma maneira, métodos analíticos são utilizados na quantificação de drogas e seus metabólitos em matrizes biológicas, os quais deverão ser cuidadosamente desenvolvidos para otimizar sua precisão e exatidão.

Modernos métodos bioanalíticos são fundamentados em relação a uma variedade de técnicas físico-químicas e biológicas á saber: (1) *Métodos Químicos*, Cromatografia (CG, HPLC) e uma variedade de processos utilizando métodos de espectrometria de massa (MS) tais como MS-MS e combinações de técnicas tais como CG-MS, LC-MS; (2) *Métodos Biológicos*, baseados em procedimentos de imunoensaios; em particular o Radioimunoensaio (RIA), imunoensaio de múltiplas enzimas (EMIT) e ensaio de imunoabsorção de enzimas ligadas (ELISA) e métodos microbiológicos; que são capazes de fornecer precisão e exatidão em relação aos resultados obtidos (Jackson, J.A 1994). Tais métodos analíticos devem ser

cuidadosamente pré-validados na fase de desenvolvimento e também validados durante o ensaio analítico, para garantir que os mesmos sejam satisfatoriamente realizados e que a confirmação das especificações pré-determinadas seja encontrada; além disso, gerar confiabilidade nos resultados obtidos (Buick *et al.*, 1990; Jackson, J. A 1994; Shan *et al.*, 1992).

Para tanto, os mesmos envolvem procedimentos de determinação e quantificação de moléculas orgânicas com amplas propriedades físico-químicas, onde cada composto deve ser avaliado de acordo com as suas propriedades individuais e também levando em consideração a complexidade analítica e as concentrações almejadas (Jackson, J. A 1994). A dimensão de como o método é validado, depende da sua aplicação, número de amostras a ser investigadas e como será o seu desempenho em relação aos dados obtidos (Pachla *et al.*, 1986; Buick *et al.*, 1990).

Diversos métodos analíticos podem ser necessários durante o desenvolvimento de fármacos. Cada método deve ser validado quando é aplicado em diferentes estudos. Neste caso, quando possível, o número de métodos aplicados deve ser mínimo para que as informações sejam estatisticamente avaliadas, quando compiladas em relação às já existentes (Pachla *et al.*, 1986).

Parte das técnicas analíticas podem exigir validação adicional como: (1) investigação das características do complexo antígeno-anticorpo, (2) determinação do pico de pureza, (3) avaliação do efeito de matrizes ou conformação estrutural do composto. Normalmente, cada ensaio deve possuir validação cruzada empregando técnicas com detectores de alta especificidade, por exemplo, o espectrômetro de absorção de massa (Buick *et al.*, 1990).

Em uso, o método analítico validado, o seu desempenho deve ser monitorado por padrões de controle de qualidade, para garantir sua aplicabilidade. No caso de um método analítico ser realizado em outro

laboratório, o seu desempenho deve ser monitorado através de padrões de controle de qualidade enviados pelo laboratório de origem.

Conforme já mencionado, há poucos trabalhos relacionados à *validação de metodologias bioanalíticas* (Shan *et al.*, 1992; Shan *et al.*, 1987; Gelpi, 1987; Aarons, 1987; Dadgar e Smith, 1986; Brooks e Weinfeld, 1985) e também poucos guias de validação bioanalítica para a submissão destes métodos bioanalíticos em jornais e revistas indexadas, o que pode resultar em maior variabilidade da qualidade de tais manuscritos. Além disso, não existe um plano de padrão a ser seguido, o que faz com que o trabalho dependa da conduta e da experiência do bioanalista.

Pode-se dizer ainda, que a importância da validação em bioanálises, constitui questão de discussões constantes no contexto de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos na indústria farmacêutica. Entretanto, os critérios aqui citados são perfeitamente aplicados a todas técnicas bioanalíticas (Shan, 1987; Buick *et al.*, 1990).

1.1- Seleção e Desenvolvimento de Métodos Bioanalíticos

Técnicas analíticas aplicadas nos ensaios biofarmacêuticos são na maioria das vezes diferentes em relação a outros métodos empregados na quantificação de drogas, tanto na forma farmacêutica quanto a granel.

Portanto, ainda não existem compêndios, bem como métodos oficiais para análises de drogas em fluídos biológicos. De fato, alguns métodos são desenvolvidos e aplicados, seguindo exigências dos órgãos oficiais regulamentadores, porém podem não estar presentes na Literatura.

Pode-se considerar que a etapa crítica no Estudo Biofarmacêutico é o desenvolvimento e validação de ensaios bioanalíticos, que consistem de experimentos realizados para encontrar condições necessárias para a quantificação do analito em questão. Isto requer conhecimentos das propriedades físico-químicas da droga para que o processo de

desenvolvimento seja racional e individualizado. Assim, todos os critérios envolvidos no desenvolvimento analítico deverão ser registrados em relatórios de acompanhamento analítico (Snyder *et al.*, 1988; Jackson, J.A 1994).

Metodologias publicadas podem ser utilizadas com modificações, quando necessário. A Publicação de um método na literatura, não significa que o mesmo pode ser considerado *validado* (Buick *et al.*, 1990; Carr e Wahlich, 1990). Uma completa validação de um método bioanalítico deve ser obtida através de pesquisa na literatura que tenha como finalidade determinar a adequação metodológica às necessidades do estudo em questão. Mesmo assim, esta deverá ser conduzida de maneira similar em relação à validação de métodos recentemente desenvolvidos. Por outro lado, técnicas desenvolvidas recentemente podem não necessitar de validação cruzada ou correlação com outros métodos já publicados. A validação cruzada somente é utilizada quando há dúvidas ou inconsistência nos resultados obtidos, seja para o teste de especificidade ou para o radioimunoensaio. Quando esta não for necessária, outra técnica associada ao método analítico pode ser utilizada, como exemplo, o espectrômetro absorção de massa o qual pode demonstrar alta especificidade para o ensaio analítico (Midha *et al.*, 1990).

- **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

É considerado como um dos mais genéricos métodos analíticos e também o de primeira escolha nas análises de drogas em matrizes biológicas para Ensaio Biofarmacêuticos (Adamovics *et al.*, 1990; Snyder e Kirkland, 1979). Simples na sua concepção, mas possui tecnologia confiável, o que justifica o seu excelente desempenho.

Um líquido, caracterizado como sendo a fase móvel do método é bombeado por toda extensão de uma coluna (composta por matrix

estacionária à base de carbono) e os diferentes componentes analíticos da amostra são separados e quantificados em diferentes tempos de eluição.

Na Cromatografia de fase reversa, o emprego de uma coluna composta por um material menos polar que a fase móvel é freqüentemente utilizada. Dessa forma o eluente é monitorado por detector apropriado, e a altura/ área da resultante do pico analítico é quantificada eletronicamente. Esta técnica é perfeitamente aplicada nas determinações dos mais diversos compostos por dois motivos: (1) existe uma gama de diferentes colunas que apresentam diversas matrizes diferenciadas pelas propriedades de polaridade, que incluem desde compostos com características iônicas até compostos altamente apolares (C18, C8, etc); 2) a fase móvel pode ser prontamente modificada de forma desejável e com concentrações bem definidas de compostos orgânicos, tais como acetonitrila, metanol e tetrahidrofurano, que são os mais utilizados no preparo. Além disso, eventualmente são adicionados sistemas de tampões para a manutenção de diferentes pHs .

O uso de diferentes técnicas de detecção tais como, absorção na luz visível (UV), fluorescência, eletroquímica e espectrometria de massa contribuem de forma significativa tanto na especificidade quanto na sensibilidade do método analítico. Contudo, outro benefício que as diferentes técnicas de detecção pode oferecer, é em relação à capacidade de quantificar baixas concentrações.

Amostras biológicas contendo a droga em questão, geralmente necessitam de pré-tratamento antes de serem injetadas no sistema CLAE.

Métodos freqüentemente empregados no pré-tratamento são: (1) precipitação de proteínas nas amostras biológicas; (2) extração líquido-líquido e (3) extração líquido-sólido ou extração fase sólida. Entretanto, tais técnicas podem ter um impacto significativo na exatidão, precisão e seletividade do ensaio analítico. Normalmente, o padrão interno é adicionado nas amostras biológicas antes da extração com finalidade de compensar

perdas de transferência de solvente e também nas mudanças abruptas de volume durante processamento das amostras analíticas.

Os dados são obtidos através de cálculos que são dados pela razão da altura do pico do analito de interesse em relação à altura do pico do seu padrão interno. As concentrações das amostras são determinadas comparando a razão da altura do pico do analito em relação à curva de calibração, onde esta também é preparada simultaneamente com amostras que serão investigadas.

1.2- Protocolo do Ensaio Bioanalítico

Uma vez que o método bioanalítico foi desenvolvido e totalmente validado, um manual de procedimentos operacionais padronizados (POPs) para o mesmo deve ser documentado. Portanto, todas as análises do método em questão devem ser submetidas conforme procedimentos do respectivo POP. Alterações podem afetar significativamente resultados finais como por exemplo, a substituição por um outro tipo de coluna, uma mudança significativa no comprimento de onda durante as análises e ou mudança no procedimento de extração, requer, no mínimo, revalidação parcial do método analítico. A dimensão de revalidação do método depende de fatores que podem influenciar nos resultados e, portanto, cabe ao bioanalista avaliar a melhor conduta para a sua realização (Buick *et al.*, 1990).

As amostras biológicas dos voluntários a serem investigadas são processadas e totalmente “randomizadas” e pode estar compreendidas em uma única lista ou em série de listas analíticas, conforme a necessidade do fluxo de trabalho. Assim, desde que o objetivo do estudo seja comparar concentrações das amostras analíticas da droga teste em relação a droga referência, é necessário que a análise de amostra biológica de um voluntário seja compreendida em uma única corrida analítica com a

finalidade de minimizar efeitos da variabilidade do inter-ensaio (Dighe e Adams, 1991).

Geralmente, amostras biológicas são processadas individualmente ou em duplicata, sendo esta última, a maneira mais correta durante a realização dos ensaios por cromatografia.

Os efeitos da variabilidade nos resultados dos Estudos Biofarmacêuticos, têm sido discutidos (Gaffney, 1992). Portanto conclui-se que os mesmos, devem trazer menor contribuição na variabilidade global, principalmente em Ensaios de Bicequivalência, Farmacocinéticos e Farmacologia Clínica.

Normalmente, uma lista analítica é constituída por lote de amostras de padrões de calibração, amostras analíticas a serem determinadas e amostras de padrões de controle de qualidade, onde estes devem estar dispostos adequadamente em intervalos com o objetivo de monitorar o desempenho do ensaio. De cinco a oito pontos de calibração, não incluindo amostras zero, em duplicata têm sido recomendado (Shan *et al.*, 1992; Jackson, J.A 1994) para Estudos Biofarmacêuticos. Contudo, pode ser necessário a adição de outros pontos de calibração quando a faixa de concentração for ampla, ou quando a curva de calibração for caracterizada como sendo não linear. Além disso, o intervalo de concentrações deve ser bem amplo e apresentar uma distribuição homogênea para as diferentes concentrações nominais com intuito de caracterizar adequadamente curva de calibração.

Crítérios de aceitabilidade de lista analítica tendo em base resultados obtidos a partir da curva de calibração e amostras dos diferentes controles de qualidade, devem ser previamente estabelecidos. Sugere-se que quatro dos seis pontos da curva de calibração estejam em torno de 20% em relação aos seus valores de concentração nominal e que dois pontos não satisfatórios tenham concentrações diferentes de suas concentrações reais para que a lista seja considerada aceitável (Buick *et al.*, 1990). Entretanto,

têm sido propostos outros critérios de aceitabilidade que empregam diferentes tratamentos estatísticos para a precisão e exatidão como por exemplo, realização de one-way ANOVA (Karnes *et al.*, 1991; Causey *et al.*, 1990).

1.3- Parâmetros da Validação Bioanalítica

- **Especificidade/Seletividade**

Os termos especificidade e seletividade são muitas vezes permutáveis quando empregados.

Uma importante questão na validação analítica é a demonstração da especificidade de um método quando utilizado. Sendo assim, o mesmo é dito específico, quando produz uma única resposta analítica para um único analito. Em relação à seletividade, esta é definida como a habilidade de uma técnica analítica em distinguir e quantificar, ou não, uma droga em relação a outras respostas de diferentes componentes presentes nos fluidos biológicos (Dagdar *et al.*, 1995; Dadgar e Burnett, 1995; Karnes *et al.*, 1991; Massart *et al.*, 1998; Causon, 1997). Portanto, se a resposta do analito de investigação é diferente de todas as outras respostas, pode-se dizer então, que o método é seletivo.

Assim, uma vez que as técnicas cromatográficas produzem respostas que possam ser distinguidas das demais resultantes dos diferentes interferentes presentes na matriz biológica; o termo seletivo pode ser amplamente empregado como parâmetro, na avaliação da validação dos métodos bioanalíticos (Karnes *et al.*, 1991; Dadgar e Brunett, 1995).

Diversos interferentes podem surgir durante o desenvolvimento de um método analítico, sendo de duas origens distintas: (1) *endógenos*: compreende um amplo número de compostos orgânicos de alto e baixo peso molecular (hormônios, lipídeos, proteínas, etc.), metabólitos de fármacos,

precursores, produtos de degradação do analito, co-administração de fármacos e vitaminas; (2) *exógenos*: impurezas presentes nos reagentes empregados no processamento das amostras analíticas, componentes utilizados na manufatura dos recipientes de acondicionamento e ou uma incompleta lavagem dos mesmos (Buick *et al.*, 1990; Dadgar *et al.*, 1995; Dadgar e Burnett, 1995).

Normalmente o percentual zero de interferência em relação ao composto de interesse é desejável, mas nem sempre é alcançado na prática. Por esta razão, o menor nível de interferentes é aceitável. Além disso, é importante considerar que interferências são indesejadas quando estas afetarem a exatidão na determinação das concentrações próximo ao Limite de Quantificação (LOQ) e com isso obter resultados imprecisos e conseqüentemente gerar conclusões errôneas no final do estudo. Portanto, quando os critérios para a precisão e exatidão da concentração do LOQ não forem encontrados, as opções ficam limitadas e o ajuste da concentração do LOQ deve ser considerado. Normalmente, este ajuste é realizado através do aumento da concentração do LOQ para que não ocorram novas interferências. Sendo assim, é importante também destacar que este aumento da concentração do LOQ poderá influenciar positivamente na sensibilidade a fim de se alcançar uma seletividade desejável (Dadgar *et al.*, 1995; Dadgar e Burnett, 1995).

Crítérios de aceitabilidade para o teste de interferência são amplamente empregados em análises cromatográficas. Estudos sugerem que qualquer interferente deverá possuir um pico ou uma área cromatografada menor que 20% em relação à concentração nominal do LOQ (Causey *et al.*, 1990; Doig and Jones, 1990 e Dadgar *et al.*, 1995; Jackson, JA 1994; Dadgar e Burnett, 1995; Causon, 1997).

Para a avaliação do teste de especificidade/seletividade, recomenda-se a utilização de no mínimo seis fontes de amostras de matriz biológica branca obtida sob controladas condições em relação ao tempo de coleta,

ingestão de alimentos e outros fatores intrínsecos presentes nos protocolos dos Estudos Biofarmacêuticos. Contudo, não deverá apresentar nenhuma interferência significativa nos tempos de retenção tanto do analito quanto do seu padrão interno (Shan *et al.*, 1992; Hooper *et al.*, 1995; ISO/DIS 5725-1 - 5725-3, 1994). Além disso, amostras contendo o composto de investigação são convenientemente submetidas às condições de extrema temperatura, pH e luz, antes de avaliar o caráter do potencial de degradação, onde possíveis produtos de decomposição poderão causar interferência nos resultados finais (Pachla *et al.*, 1986; Jackson, J.A 1994). Também, cada amostra biológica isenta de padrões analíticos e empregada no teste de interferência é processada utilizando apropriados procedimentos de extração, condições cromatográficas e de espectrometria.

Recentemente, o surgimento de diversas técnicas analíticas empregando alta tecnologia, possibilitou a obtenção de extrema especificidade/seletividade. Dentre estas técnicas, sistemas LC-MS/MS e CG-MS/MS, são capazes de nos fornecer resultados precisos com absoluta seletividade (Dadgar *et al.*, 1995). Portanto, a dimensão da análise destes critérios é considerada como fator determinante para o desenvolvimento da metodologia analítica proposta, mas também é de relevância a técnica instrumental empregada (Massart *et al.*, 1998).

• Linearidade, “Range” e Seleção do Modelo de Calibração

O termo linearidade geralmente é bem aceito em bioanálises, muito embora o mesmo não esteja completamente esclarecido. O relatório final da International Conference of Harmonization – ICH (Guideline for Validation of Analytical Procedure Methodology, 1996) determina que a linearidade de um procedimento analítico é considerada como a habilidade de se obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra

(Comission of European Communities – Comittee for Proprietary Medicinal Products 111/5626/94 final draft, 1994; Buick *et al.*, 1990).

O estudo da linearidade de um método analítico, pode ser interpretado através da investigação da constante ou índice de sistematização de erros mensurados denominado de *bias* (exatidão), considerando-se a relação linear entre as concentrações nominais e as determinadas na amostra biológica (Braggio *et al.*, 1996). A linearidade também pode ser considerada como o estudo da curva de calibração ou padronização (i.e. regressão linear) conforme discutido no tópico da validação metodológica presente no relatório final do ICH de 1996 (Hartmann *et al.*, 1998). Portanto, o procedimento ou o mecanismo de avaliação para a linearidade deverá ser incluído no estudo do *bias*, e neste caso se o referido índice for aceito, conseqüentemente linearidade também será. Sendo assim, conclui-se que desta forma fica mais fácil utilizar a avaliação do limite da linearidade para a verificação e a aceitação de um modelo de calibração empregado.

Tendo em vista estas considerações, a seleção do modelo de calibração é normalmente realizada durante a fase de desenvolvimento da validação analítica. Também a escolha do modelo de calibração é fator crucial e determinante para a qualidade do *bias* e da precisão, os quais deverão ser alcançados de forma satisfatória pelo método analítico durante o seu emprego (Burrows, 1993; Karnes and March, 1991, Aarons, 1981 e Hill *et al.*, 1992).

Vale lembrar, que a extensão do ensaio analítico é determinado pelo intervalo de concentrações, onde o analito pode ser mensurado com limites de aceitabilidade para a precisão e exatidão. Portanto, todos os métodos bioanalíticos devem possuir bom intervalo de concentração, que pode não ser necessariamente linear (Buick *et al.*, 1990).

A linearidade da resposta do detector cromatográfico deve ser estabelecida. Isto é importante quando o ensaio metodológico é requerido

para quantificar um analito com elevada concentração em um amplo intervalo de calibração. Deste modo, o aumento das sucessivas determinações nominais deve respeitar a magnitude da linearidade do detector, não podendo exceder a ordem de grandeza durante a quantificação das concentrações do analito (Buick *et al.*, 1990). Sendo assim, o aumento da variação juntamente com o aumento das concentrações nominais é a melhor forma de controle da linearidade utilizando cálculos através de regressão linear (Johnson *et al.*, 1988). A calibração dos resultados obtidos é necessariamente sempre “plotada” através de métodos estatísticos apropriados. Por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, se uma resposta linear for alcançada (Miller e Miller, 1988 e Causon, 1997). De acordo com o relatório final da Conferência de Washington (Shan *et al.*, 1992), a resposta do instrumento será representada tanto por gráficos quanto por funções algorítmicas e deve apresentar a curva de calibração obtida (experimental e a resultante do tratamento matemático), o coeficiente de correlação linear e o intercepto da reta.

Grande parte de gráficos de modelos de calibração produzida em análises cromatográficas é linear. Entretanto, curvas de calibração não lineares podem indicar uma variabilidade nos procedimentos de extração, pipetagem, problemas na fase estacionária (coluna cromatográfica) e ou na resposta do detector. Contudo, as mesmas podem ser facilmente linearizadas utilizando os valores da função logarítmica de x e y (Metha, 1989).

A avaliação da curva de calibração, requer o emprego de no mínimo quatro níveis de concentrações nominais. Porém, estudos (Massart *et al.*, 1998) recomendam o uso de 5 a 8 determinações que correspondem ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atendam aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade (Pennickx *et al.*,

1996; Shan *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 1992; Metha, 1989 e Hartmann *et al.*, 1998).

Quatro fatores devem ser empregados no desenvolvimento da curva de calibração:

- Precisão e exatidão menor ou igual a 15% nas determinações nominais da curva de calibração, exceto para as concentrações do LOQ.
- Precisão e exatidão menor ou igual a 20% nas determinações nominais do LOQ.
- Pelo menos quatro das seis concentrações nominais devem estar de acordo com os critérios acima mencionados, incluindo os pontos do LOQ e os pontos de calibração de menor concentração.
- Valor de coeficiente de correlação linear igual ou maior que 0.95.

Uma vez que o modelo de calibração é validado, o número e a distribuição dos pontos de calibração podem ser adaptados conforme a necessidade de reduzir a carga de trabalho durante a rotina analítica, porém os limites de exigências para a precisão e a exatidão serão sempre mantidos (Hartmann *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1992 e Hartmann, C. 1994).

• **Precisão e Exatidão (Bias)**

Após a aprovação dos resultados do estudo da linearidade, pode-se então realizar a avaliação da precisão e da exatidão (*bias*) da metodologia empregada, sendo considerados os fatores mais importantes de desempenho quando utilizados na decisão de aceitação da técnica proposta. Como consequência deste fato, as agências regulatórias, aceitam estes dois parâmetros como os principais determinantes no desenvolvimento e registro de validação de métodos (Shan *et al.*, 1992 e Hartmann *et al.*, 1998).

Além disso, a recuperação também é considerada como um fator adicional que pode ser mensurado nos mesmos procedimentos empregados para a precisão e a exatidão. Normalmente a recuperação é refletida na

exatidão de um método analítico. Portanto, durante uma completa validação, este parâmetro também é considerado importante e suficiente como um indicativo para a avaliação do estudo do *bias* (Hartmann *et al.*, 1998). Geralmente, o mais importante é alcançar a reprodutibilidade da recuperação e que esta seja suficientemente alta, para satisfazer os limites de aceitabilidade para a detecção e quantificação das amostras de baixa concentração (Hooper *et al.*, 1995). Assim, estudos consideram um limite mínimo de recuperação de 70% (Braggio *et al.*, 1996).

A precisão do método bioanalítico é considerada como uma medida ou um índice de erros aleatórios ou “randomizados” (Causon, R. 1997). Dessa forma, os erros “randomizados” normalmente são expressos através de um desvio padrão (D.P) ou como um desvio padrão relativo (D.P.R). Portanto, o desvio padrão real ou nominal da metodologia analítica é definido com parâmetro populacional que pode ser unicamente determinado através de um número ilimitado de resultados experimentais. Dessa forma, o mesmo pode ser estimado por um desvio padrão dos resultados de um número (*n*) de valores experimentais em replicata(s). Por outro lado, o desvio padrão relativo é a razão expressada em porcentagem dos resultados de um certo número de valores experimentais dividido pela média geométrica destes mesmos valores (Hartmann *et al.*, 1994).

Porém, esta mesma precisão também pode ser definida como o grau de repetibilidade ou de concordância entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento analítico é aplicado em diversas vezes em uma mesma amostra analítica, em idênticas condições experimentais (Swartz e Krull 1998; Buick *et al.*, 1990; Causon, R. 1997; Brittain, 1998). Além disso, é expressa como a porcentagem do coeficiente de variação (C.V) ou o desvio padrão relativo da média geométrica dos valores das replicatas de cada determinação nominal, a saber:

$$\text{Precisão} = \% CV = (dp/média) \times 100$$

$$dp = \sqrt{n \sum c^2 - (\sum c)^2} : n(n-1)$$

Onde:

CV = coeficiente de variação

dp = desvio padrão

n = número de dados

c = concentração calculada

De acordo com a ICH de 1996 e o relatório final da ISO (International Organization for Standardization, 1990/1991), a precisão pode ser medida em três diferentes níveis (Swartz e Kull, 1998; Hartmann *et al.*, 1994):

- **Repetibilidade (Precisão intra-ensaio)**, a qual avalia a precisão da metodologia durante uma corrida analítica (Buick *et al.*, 1990). Também é definida como a habilidade de repetições de uma metodologia empregada nas mesmas condições laboratoriais, por exemplo, da utilização do mesmo corpo de analistas, dos mesmos equipamentos e dos mesmos reagentes analíticos em um curto intervalo de tempo, considerando a realização do ensaio analítico em um único dia (Hartmann *et al.*, 1994; Causon, R. 1997; Shan *et al.*, 1992 e ISO/Dis 5725-1 – 5725-3 final draft, 1990/1991).

Neste caso, autores sugerem que esta precisão intra-ensaio poderá ser determinada através de no mínimo de 5 a 10 determinações em replicata para cada nível de concentrações nominais pré-estabelecidas das amostras de controle de qualidade. Assim, emprega-se três níveis de concentração: baixo, que pode ser o LOQ; médio e alto, que estejam compreendidos no intervalo de limite especificado do procedimento analítico (Metha, 1989; Swartz e Krull 1998; Hartmann *et al.*, 1998 e FDA – Guideline for Industry / Bioanalytical Method Validation final draft, 1998 e 2001).

- **Reprodutibilidade (Precisão inter-ensaio)**, que demonstra o grau de

variabilidade da precisão do método analítico em diferentes intervalos de tempo da análise (Buick *et al.*, 1990). Também é definida como a habilidade de repetições da mesma metodologia analítica aplicada sob diferentes condições laboratoriais como, por exemplo, mudanças de analistas, reagentes e equipamentos em subsequentes ocasiões que podem compreender várias semanas ou até meses (Shan *et al.*, 1992; USPXXII, 1990; Brooks and Weinfeld, 1985; Hartmann *et al.*, 1994 e Buick *et al.*, 1990). Além disso, esta precisão inter-ensaio é realizada de maneira similar a precisão intra-ensaio, porém é determinada através da análises de no mínimo em 10 dias distintos (Metha, 1989), onde os resultados obtidos são interpretados através de um coeficiente de variação para cada nível de concentração nominal pré- estabelecidas das amostras de controle de qualidade, conforme já descrito anteriormente. Portanto, a reprodutibilidade é importante e de grande interesse para o bioanalista, uma vez que a mesma contribui para melhor avaliação da metodologia, incluindo através da análise dos resultados obtidos com demais estudos realizados em outros laboratórios (Causon, 1997 e Metha, 1989).

Precisão intermediária, é definida pela ISSO de 1990/1991 (Hartmann *et al.*, 1994) como fator de diferentes condições de variações experimentais (M-fator =1,2 e 3)

sendo:

M=1, somente um dos três fatores (analista, equipamentos ou tempo) é alterado ou quando o equipamento analítico é recalibrado entre sucessivas determinações.

M=2, quando dois dos três fatores são alterados.

M=3, quando todos os três fatores são alterados entre as sucessivas determinações.

Dessa forma, na determinação da precisão intermediária, o pessoal operacional deverá empregar o projeto experimental de forma que os efeitos das variáveis possam ser monitorados (Swartz e Krull, 1998).

Para a validação de metodologias bioanalíticas aplicadas em Estudos Biofarmacêuticos, estudos determinam que os valores de aceitabilidade para a precisão intra e inter-ensaio possuem um coeficiente de variação menor ou igual a 15%, para todos os níveis de concentração das amostras de controle de qualidade, exceto para o LOQ, onde este não deve ser superior a 20% (FDA – Guideline for Industry / Bioanalytical Method Validation final draft 1998 e 2001; Shan *et al.*, 1992 e 2000 e Causon, R. 1997).

Organizações Internacionais, como a ISO aborda em suas definições tanto para precisão como para a exatidão, a ocorrência de diferentes erros experimentais tais como: os erros “randomizados” ou aleatórios (conforme descrito anteriormente na definição da precisão), e erros sistemáticos.

A sistematização de erros de um método analítico é a diferença entre o valor médio (obtido do resultado de um número (*n*) de diferentes experimentos) e o valor nominal aceito como referência. Portanto, a exatidão é considerada como um conceito ou uma definição de uma constante ou um índice de erros sistemáticos denominada de **bias** (Hartmann *et al.*, 1994). Além disso, esta exatidão também pode ser definida como o grau de concordância entre os valores individuais encontrados em relação aos valores reais ou nominais (Causon, R. 1997; Swartz e Krull 1998; Buick *et al.*, 1990; Brittain, 1998 e Mehta, 1989).

A melhor maneira de reportar a exatidão de um ensaio analítico é através da porcentagem do *bias*, calculado a saber:

$$\% \text{ BIAS} = [(\text{Valores experimentais} - \text{Valores nominais}) / \text{Valores nominais}] \times 100$$

Contudo, esta exatidão é normalmente determinada pelas análises em replicata das amostras de controle de qualidade contendo concentrações pré-estabelecidas. Dessa forma, empregam no mínimo três níveis de

concentração nominal (baixo que pode ser o LOQ, médio e alto) que estejam compreendidas dentro do intervalo de calibração especificado pela metodologia analítica utilizada (Mehta, 1989; Swartz e Krull, 1998; FDA – Guideline for Industry / Bioanalytical Method Validation final draft, 1998 e 2001 e Shan *et al.*, 1992 e 2000).

Para a documentação da exatidão de um ensaio analítico, as diretrizes presentes no capítulo da Metodologia Analítica do relatório final da ICH, recomendam a coleta dos dados referentes a um mínimo de nove determinações sobre um mínimo de três concentrações nominais de amostras de controle de qualidade analisadas em triplicata. Porém, levando em consideração às diretrizes, autores e determinações presentes nos guias de Validação de Metodologia Bioanalítica, estabelecem o emprego de no mínimo cinco replicatas para cada concentração nominal das amostras de controle de qualidade, sendo a forma mais correta de se determinar uma adequada exatidão do ensaio analítico (Shan *et al.*, 1992 e 2000; FDA – Guideline for Industry / Bioanalytical Method Validation final draft, 1998 e 2001; Causon, R 1997 e Jackson, A. J 1994).

Normalmente os ensaios para a exatidão poderão se realizados em um único dia (exatidão intra-ensaio) e também em dias diferentes (exatidão inter-ensaio), sendo esta última a de maior interesse e representatividade para se determinar a exatidão do ensaio metodológico utilizado (Buick *et al.*, 1990 e Shan *et al.*, 1992 e 2000).

Todos os resultados analíticos e outros dados que foram rejeitados por razões analíticas, por exemplo, um análise cromatográfica inconsistente (pobre), serão utilizados no cálculo da determinação tanto da exatidão intra – ensaio quanto para a exatidão inter-ensaio (Causon, 1997). Autores sugerem que os limites de aceitabilidade para exatidão intra e inter-ensaio devem possuir coeficiente de variação menor ou igual a 15% para todos os níveis de concentração nominal, exceto para o LOQ, onde este não deve exceder a limite maior que 20% (USP XXII, 1990; Brooks and Weinfeld, 1985; Causon,

R. 1997; Shan *et al.*, 1992 e 2000 e FDA – Guideline for Industry / Bioanalytical Method Validation final draft, 1998 e 2001).

- **Sensibilidade, Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)**

Sensibilidade e Limite de Detecção (LOD) são dois parâmetros muito empregados na identificação da habilidade de uma técnica analítica em detectar e quantificar traços de compostos, das mais variadas propriedades químicas, em concentrações abaixo de 1mg/L em complexos químicos ou biológicos (Mehta, A.C 1989 e Miller, J.N 1982). Portanto, os mesmos fornecem importantes informações quando leva a uma tentativa de comparar várias metodologias, equipamentos ou na decisão de qual método pode ser aplicado para solucionar problemas mais específicos (Metha, 1989).

Há um certo grau de confusão na terminologia quanto ao emprego das definições de sensibilidade e Limite de Detecção; às vezes um desses dois termos pode ser erroneamente definido no lugar do outro.

A metodologia analítica é dito sensível quando pequenas mudanças nos padrões de calibração podem gerar grandes variações na resposta do instrumento analítico. Portanto, conclui-se que a sensibilidade do ensaio analítico é definida pela inclinação (“slope”) da curva de calibração, onde este nos fornece um gráfico linear (IUPAC, 1976; Causon, 1997 e Mehta, 1989).

Por outro lado, o Limite de Detecção representa a mais baixa concentração do composto de investigação que pode ser detectada em relação à amostra biológica branco com certo limite de confiabilidade (Swartz e Krull, 1998; Metha, 1989; Mehta, A.C 1987; Mehta A.C 1989; Brittain, 1998 e Buick *et al.*, 1990).

De acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC, o Limite de Detecção é estabelecido através de análises de soluções com concentrações conhecidas e decrescentes do analito até que o nível detectável seja 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base cromatográfica (IUPAC, 1978; Rutledge e Garrick, 1989 e Bressolle, Bres J. e Moulin, 1990).

O Limite de Quantificação (LQ) representa a mais baixa concentração de um composto de investigação que pode ser mensurado de acordo com os critérios de aceitabilidade para precisão e exatidão através de um ensaio analítico (Swartz e Krull, 1998; Causon, R. 1997 e Buick *et al.*, 1990).

É muito importante destacar que tais limites para a precisão e a exatidão do LOQ sejam obtidos empregando amostras de controle de qualidade com concentrações pré-determinadas para o LOQ independentemente dos pontos de calibração utilizados para a construção do modelo de calibração, pois estes padrões do LOQ utilizados na construção da curva de calibração influenciam o cálculo da equação de regressão linear. Dessa maneira a precisão e a exatidão do LOQ poderão ser definidas tanto para intra-ensaio como inter-ensaio (Dadgar *et al.*, 1995).

Também, para a avaliação da concentração do LOQ, pode-se utilizar a razão 5:1 entre o sinal e o ruído da linha de base cromatográfica no tempo de retenção do analito, ou seja, deverá obter uma típica resposta do instrumento que seja cinco vezes maior que qualquer interferência na amostra branco no tempo de retenção do composto de interesse.

Para a determinação do LOQ, normalmente é utilizado uma série de análises de amostras analíticas em replicata considerando de 5 a 6 determinações para cada nível de concentração pré-estabelecida das amostras de controle de qualidade do LOQ (Shan *et al.*, 1992 e 2000; Jackson, A.J 1994 e Causon, R. 1997).

Os critérios de aceitabilidade para a precisão e a exatidão do LOQ recomendam que o coeficiente de variação não seja maior que 20% em

relação à concentração nominal (Shan *et al.*, 1992 e 2000; Jackson, A.J 1994 e Dadgar *et al.*, 1995).

• Recuperação

Os testes para a avaliação da recuperação são particularmente aplicados em diferentes etapas do ensaio da metodologia analítica. Porém, são normalmente realizados durante a fase inicial do desenvolvimento analítico para determinar uma melhora da eficiência dos procedimentos de extração nas amostras biológicas. Além disso, podem ser considerados como um indicativo da robustez do método analítico (Mehta, 1989 e Buick *et al.*, 1990). Contudo, têm por finalidade verificar possíveis perdas durante o tratamento das amostras biológicas, como por exemplo, da utilização de um líquido extrator (Mehta, 1989).

Perdas de substâncias analíticas podem ocorrer durante os procedimentos de extração das amostras biológicas através de uma incompleta extração (separação parcial ou uma emulsificação entre a fase orgânica e a fase aquosa, contendo os componentes analíticos das amostras analíticas), incompleta solubilização do resíduo seco final da amostra analítica, adsorção inespecífica, ou uma sublimação dos componentes voláteis. Portanto, o grau de variabilidade das perdas dos componentes analíticos durante o tratamento das amostras analíticas pode acarretar na diminuição significativa da precisão do ensaio analítico. Assim, conforme mencionado anteriormente, é importante ressaltar que a avaliação quantitativa da recuperação deverá ser somente empregada durante a fase de desenvolvimento da validação bioanalítica (Jackson, J.A 1994).

Por outro lado, a utilização de solventes extratores no tratamento das amostras biológicas, como por exemplo, o acetato de etila, confere elevados valores de recuperação devido ao seu alto poder de extração. Porém, pode ocorrer simultaneamente a extração de muitos componentes orgânicos

levando a uma interferência indesejada. Sendo assim, é preciso destacar a importância de uma correta escolha de um solvente extrator empregado no ensaio analítico, com finalidade de alcançar uma elevada eficiência nos testes para a recuperação e minimizar a carga de interferentes. Além disso, o fornecimento de adequados limites de detecção para a sensibilidade e seletividade, somente serão obtidos através de uma adequada precisão e exatidão da metodologia analítica, onde a dimensão da avaliação da recuperação deverá ser considerada apenas como um fator indicativo no desenvolvimento da validação dos procedimentos analíticos (Dadgar *et al.*, 1995).

A recuperação pode ser definida como uma medida percentual da eficiência dos procedimentos extrativos de um método analítico dentro de um limite de variação de aceitabilidade (FDA – Guideline for Industry / Bioanalytical Method Validation final draft, 1998 e 2001).

Normalmente, os experimentos para a avaliação da recuperação são realizados através da contaminação de três níveis (baixo, médio e alto) de concentração nominal do composto analítico nas amostras biológicas branco. Sugere-se no mínimo o emprego de cinco replicatas para cada concentração, onde estas deverão estar compreendidas em intervalo de calibração especificado pela metodologia analítica (Mehta, 1989; Causon, R. 1997 e FDA – Guideline for Industry / Bioanalytical Method Validation final draft, 1998 e 2001).

Existem várias formas utilizadas na determinação da recuperação do ensaio analítico. A maneira mais usual para a quantificação da recuperação é através da comparação da resposta da resultante do analito (pico ou área cromatografada) das amostras analíticas em replicata, previamente tratadas em relação as mesmas em idênticas concentrações preparadas em fase móvel, correspondendo 100% da recuperação (Jackson, J.A 1994; Taylor, J.K 1987; Causon, R. 1997; Buick *et al.*, 1990; Mehta, 1989; Brooks and Weinfeld, 1985 e Dadgar *et al.*, 1995).

Outra maneira utilizada na avaliação da recuperação é através da comparação direta da resposta do componente analítico das amostras de controle de qualidade, previamente tratadas em relação às amostras branco contaminadas com o analito em idênticas concentrações nominais. Dessa forma, efeitos de matriz biológica, por exemplo, o surgimento de picos tardios, não deverá interferir na interpretação dos resultados da recuperação (Dadgar *et al.*, 1995).

Para uma validação formal do procedimento analítico, a recuperação pode ser determinada através da comparação da inclinação ("slope") de duas curvas de calibração, uma preparada em matriz biológica e extraída, e outra diluída em fase móvel, com finalidade de avaliar a existência de variabilidades em cada ponto de calibração (Buick *et al.*, 1990 e Jackson, J.A 1994).

Embora seja desejável alcançar valores de recuperação próximos a 100%, é possível maximizar a sensibilidade da metodologia analítica utilizando limites de eficiência para a recuperação de 50 á 90%, desde que os mesmos sejam satisfatoriamente reproduzíveis (Mehta, 1989; Karnes *et al.*, 1991; Causon, R. 1997 e Jackson, J.A 1994). Dessa forma, autores acreditam que baixos valores de recuperação em torno de 50% não necessariamente irão comprometer a integridade do método analítico. Contudo, adequados limites de precisão e exatidão só serão obtidos através de valores moderados de recuperação, os quais fornecerão a validação analítica excelente limites de sensibilidade e seletividade (Causon, R. 1997).

Normalmente se faz necessário sacrificar intencionalmente altos índices de recuperação em favor da obtenção de uma melhor sensibilidade, e conseqüentemente alcançar adequados índices de seletividade, precisão e exatidão nos procedimentos analíticos (Dadgar *et al.*, 1995 e Causon, R. 1997).

Entretanto, limites para precisão e exatidão da metodologia analítica devem ser determinados independentemente dos valores para a precisão,

pois estes quando empregados, podem levar a um valor irreal da precisão e a exatidão do método analítico, e conseqüentemente gerar falsas conclusões (Dighe e Adams, 1991 ; Jackson, J.A 1994).

Ainda, índices satisfatórios de recuperação ou o conhecimento pleno das ocorrências que podem causar perdas analíticas, contribuirão para melhor robustez da metodologia empregada (Jackson, J.A 1994).

• Estabilidade

A estabilidade de drogas em fluídos biológicos está relacionada às condições de estocagem, propriedades químicas das mesmas, matriz biológica, e sistemas de armazenagem. A estabilidade de um analito em uma específica matriz biológica para um sistema de armazenamento é de relevância somente para a mesma matriz e para o mesmo sistema de armazenamento, não podendo ser aplicado a outras matrizes e sistemas de armazenamento.

Os procedimentos de estabilidade devem avaliar a estabilidade dos analitos (drogas e ou metabólitos) em fluídos biológicos após as condições à longo prazo (estocagem em baixas temperaturas), nas condições à curto prazo (condições de bancada e temperatura ambiente), e diferentes ciclos de congelamento/descongelamento e processos analíticos (condições de injetor automático). Os procedimentos de estabilidade também devem incluir avaliações da estabilidade do analito (droga e ou metabólito) em soluções de estoque (Buick, 1985; Pachla, 1989).

Todos os procedimentos de estabilidade devem ser utilizados em cada lote de amostras de calibração preparadas através de soluções estoque recém preparadas do analito (droga e ou metabólito) em apropriadas matrizes biológicas isenta de outros analitos e interferentes.

Para a avaliação, as soluções estoque do analito (droga e ou metabólito) devem ser preparadas em solventes apropriados nas

concentrações definidas no método de preparo presente no manual de procedimentos operacionais padronizados (POP).

1- Estabilidade de curto prazo

- **Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento**

Deve-se testar a estabilidade do analito durante três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico, nas seguintes condições: as amostras devem ser congeladas a -20°C, ou outra temperatura indicada para o armazenamento (por exemplo, -70°C) e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas a -20°C, por 12 a 24 horas, e assim, sucessivamente, até completar os três ciclos, quantificando-se o analito nas amostras após o terceiro ciclo. Se o analito for instável a -20°C, a estabilidade da amostra deve ser feita a -70°C, durante três ciclos de congelamento e descongelamento (Shan, 1992; Buick *et al.*, 1990).

- **Estabilidade no tempo e condições de análise**

O analito deve permanecer estável durante o tempo de análise. Para a verificação dessa propriedade, emprega-se no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Cada uma delas será submetida ao descongelamento natural, a temperatura ambiente, e mantida nesta condição pelo tempo máximo esperado para a duração do ensaio (Buick *et al.*, 1990).

A estabilidade do analito e seu padrão interno devem ser avaliados na temperatura do injetor automático, pelo período de tempo em que ficarão no injetor automático esperando ser injetadas (tempo de corrida x número de

frascos no injetor automático). É preparada uma solução de estoque do padrão interno e do analito, em triplicata, em três concentrações diferentes e deixadas na bandeja do injetor automático pelo período indicado. Por fim, são avaliados os dados destas soluções com um conjunto de padrões preparados imediatamente antes da quantificação (Timm *et al.*, 1985).

2- Estabilidade de longo prazo

O tempo de armazenagem para o estudo de estabilidade de longo prazo deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última, de acordo com o cronograma apresentado no protocolo de estudo de bioequivalência ou de biodisponibilidade; a temperatura utilizada no ensaio deve reproduzir a recomendada para o armazenamento das amostras, normalmente igual a -20°C, mas temperaturas mais baixas como -70°C também são recomendadas para prevenir problemas de degradação em temperaturas mais altas. Os resultados devem ser comparados com a média daqueles verificados no primeiro dia do estudo. Para verificação dessa propriedade, são aplicadas no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico (Buick *et al.*, 1990).

3- Estabilidade das soluções-padrão

A estabilidade das soluções-padrão do fármaco e do seu padrão interno no líquido biológico, à temperatura ambiente, deve ser avaliada a partir de, no mínimo, seis horas após a sua preparação. Tais soluções devem ser refrigeradas ou congeladas por sete a quatorze dias, ou outro período apropriado; os resultados desse teste devem ser comparados com aqueles obtidos utilizando-se soluções recentemente preparadas do analito e padrão interno no líquido biológico (Buick *et al.*, 1990).

Qualquer que seja o método estatístico utilizado para avaliar os resultados dos estudos de estabilidade, este deverá estar descrito claramente nos manuais de padrão de procedimentos operacionais.

• Robustez

A robustez é um parâmetro que refere-se à reprodutibilidade de uma metodologia analítica sob diferentes condições experimentais (Shan *et al.*, 1992; Jackson, A.J 1994; Swartz e Krull, 1998).

Normalmente, a robustez pode ser avaliada experimentalmente através de alterações das condições experimentais do ensaio analítico (Youden & Steiner, 1975 ; Swartz e Krull, 1998).

No caso de um método de validação sensível, o objetivo principal é determinar *à priori*, se diferentes condições analíticas irão afetar efetivamente a metodologia proposta. Dessa forma, o emprego de uma validação cruzada torna-se necessária, onde os novos parâmetros analíticos são aplicados e os dados obtidos serão avaliados para determinar se estas novas condições poderão causar alterações significativas no ensaio analítico (Shan *et al.*, 1992). Portanto, a validação cruzada envolverá a produção de resultados obtidos sob novas condições e como consequência a comparação em relação aos resultados da validação original (Shan *et al.*, 1992; Anderson, R.L 1987).

É desejável que um procedimento analítico seja capaz de resistir frente às alterações das condições experimentais. Constatando a suscetibilidade nos parâmetros analíticos (precisão, exatidão, linearidade, etc.), estes deverão ser adequadamente controlados ou será necessário à inclusão de novas precauções na metodologia (Shan *et al.*, 1992; Swartz e Krull, 1998 e Jackson A.J 1994). Para minimizar os efeitos da variabilidade no método analítico, é necessário investigar e documentar influências

durante o processo de validação analítica, as quais podemos citar (Dadgar *et al.*, 1995; Shan *et al.*, 1992 ; Jackson, A.J 1994):

- Mudanças das condições da temperatura ambiente
- Alterações do corpo de analistas
- Mudanças de equipamentos
- Tempo de extração
- Variações típicas em cromatografia líquida como:
 - ✓ Influência da variação de pH da fase móvel
 - ✓ Influência da variação da composição da fase móvel
 - ✓ Diferentes colunas cromatográficas
 - ✓ Temperatura
 - ✓ Velocidade de fluxo

Portanto, a avaliação destas influências acima citadas, fornecerá indicativo da habilidade da metodologia de se manter estável frente às alterações das condições analíticas (Dadgar *et al.*, 1995).

De acordo com a ICH, a robustez deve ser considerada na fase de desenvolvimento e será convenientemente monitorada durante o ensaio analítico, observando possíveis mudanças na linearidade e nos resultados das amostras de controle de qualidade (Jackson, A.J 1994; Dadgar *et al.*, 1995; Swartz e Krull, 1998 e Shan *et al.*, 1992).

• Critérios de aceitação da validação metodológica

Para que um método analítico seja considerado completamente validado, os critérios a seguir devem ser considerados.

1. **Precisão** : O coeficiente de variação inter-ensaio para os pontos de calibração baixo, médio e alto devem estar abaixo de 15%, e 20% para

amostras de controle de qualidade do LOQ, utilizando no mínimo três lotes.

2. **Exatidão** : A média dos valores inter-ensaio devem estar abaixo de 15% do valor nominal das concentrações de controle de qualidade baixa, média e alta e não deve desviar mais que 20% do LOQ, utilizando no mínimo três lotes.
3. **Sensibilidade** : O ponto de calibração de menor concentração é aceito como LOQ do método analítico quando o coeficiente de variação inter-ensaio das amostras de controle de qualidade do LOQ for menor ou igual a 20%.
4. **Especificidade** : A resposta do pico de interferência no tempo de retenção do analito (droga e ou metabólito) deve ser menor que 20% da resposta do LOQ. Respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20% e 5% da resposta na concentração utilizada.
5. **Estabilidade** : Dados de estabilidade em condições à longo e curto prazo, congelamento e descongelamento, solução de estoque, e “autosampler” devem estar de acordo com os critérios específicos presentes em manuais de procedimentos operacional padronizados.

Capítulo II

Estudo de Bioequivalência de duas formulações comprimidos de pantoprazol em voluntários sadios de ambos os sexos

Há 100 anos, tomamos conhecimento que a presença de ácido é essencial para a formação das úlceras duodenais e gástricas e para o desenvolvimento da doença do refluxo gastroesofágico. Foi apenas nos últimos 20 anos que a terapêutica médica foi capaz de controlar a secreção ácida de forma suficientemente adequada para conseguir o controle dessas três doenças.

No início do século passado, o tratamento confiável de doenças ácido-pépticas dependia principalmente da cirurgia. Os procedimentos cirúrgicos eram sempre indicados para reduzir a secreção ácida, seja através da gastrectomia parcial ou total, ou por vários outros tipos de vagotomia, reduzindo assim a estimulação da secreção ácida pelo estômago.

O extrato de beladona contendo atropina e hioscina, era a única medicação que reduzia a taxa de secreção ácida. Entretanto, os efeitos colaterais tais como a turvação visual e boca seca limitavam intensamente seu uso. Por outro lado, os antiácidos eram capazes de aliviar os sintomas e, quando administrados em doses altas e freqüentes, eram eficazes nas formas mais brandas da doença ácido-péptica.

Foi o histologista italiano *Camillo Golgi* quem deduziu que a secreção ácida pelo estômago se originava a partir das células parietais, descoberta feita no final do século 19, através das alterações morfológicas que ocorreram com a estimulação da secreção (Golgi, 1893).

No primeiro quarto do século vinte, os três estímulos mais importantes para a secreção ácida foram reconhecidos como sendo a gastrina, a acetilcolina e a histamina. Outros cinquenta anos se passaram até que se

conseguiu uma definição mais exata sobre o modo em que atuavam, bem como sua função na estimulação da célula parietal. De fato, esta definição dependia largamente da síntese da primeira droga anti-secretora bem tolerada, um antagonista de receptores H_2 , a cimetidina (Black *et al.*, 1972).

Contudo, ainda continuava a pesquisa de antagonistas eficazes da gastrina, e, até agora, nenhum antagonista colinérgico que não apresente efeitos colaterais foi descoberto. Na teoria e na prática, a inibição de apenas um único estimulante pode inibir apenas parcialmente a secreção ácida.

Nos anos 70, a descoberta da bomba ácida do estômago, seu mecanismo de ação e de regulação (Sachs *et al.*, 1976; Ganser e Forte, 1973), prepararam o cenário para o desenvolvimento de uma nova classe de inibidores anti-secretórios, os derivados benzimidazólicos, cuja ação se concentrava especificamente na bomba ácida (Fellenius *et al.*, 1981).

A inibição da etapa terminal da secreção ácida deveria ser mais eficaz e confiável na resposta de redução total da mesma. De fato, grande quantidade de dados clínicos demonstrou que a classe dos derivados benzimidazólicos é a terapia médica mais eficaz disponível até agora para a redução da acidez do estômago.

A questão sobre quanto da secreção ácida precisa ser inibida para se obter uma ótima cicatrização e para o alívio da dor nas três doenças mais importantes relacionadas à acidez, pode ser respondida por análise retrospectiva de um grande número de estudos clínicos com várias drogas indicadas para a úlcera duodenal e gástrica e o refluxo gastroesofágico (Bell *et al.*, 1992; Burget *et al.*, 1990; Howden e Hunt, 1990).

Esta análise indica que, tão logo um índice adequado de elevação de pH é atingido, elevações posteriores não aumentarão a taxa de cicatrização já atingida. Para o tratamento mais eficaz da úlcera duodenal, a acidez tem de ser inibida em mais de 90%(pH>3) por 18 horas ao dia, enquanto que na cicatrização da doença do refluxo (estágio II a IV) a acidez tem de estar

inibida em pelo menos 99%(pH>4) por 18 horas ao dia. Notoriamente, para atingir esta inibição com um tratamento de dose única, é preciso utilizar um inibidor de longa duração.

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs), como o pantoprazol, são hoje, reconhecidamente a terapia de eleição para todas as doenças ácido-pépticas, pois proporcionam a necessária redução ácida de forma segura, numa dose-dependente, sem o desenvolvimento de intolerâncias.

Portanto, os IBPs não são apenas mais efetivos, mas possuem uma ação prolongada devido à sua ligação irreversível com a bomba protônica. A duração da ação perdura além das 24 horas. Com o pantoprazol, por exemplo, após 25 horas a inibição de 52% da secreção ácida estimulada pelo alimento ainda ocorre, perdurando até 48 horas. Re-síntese das bombas e o completo retorno da secreção ácida dão-se apenas após 96 horas de suspensão da droga (Modlin e Sachs, 1998). Levando em consideração o fato de que o pantoprazol é rapidamente eliminado da circulação sanguínea, efeitos anti-secretórios permanecem presentes após 24 horas da administração (Simon *et al.*, 1990). Assim, o longo tempo de ação é devido à ligação covalente entre a droga ativada e a bomba ácida presente na face luminal das células parietais (Steinijans *et al.*, 1996).

O pantoprazol, também conhecido como um derivado benzimidazólico 5-(difluorometoxi)-3-[[[3,4dimetoxi-2-piridinil]sulfinil]-1H-benzimidazol, faz parte da nova geração de componentes químicos do grupo dos IBPs (Huber *et al.*, 1996; Kohl *et al.*, 1992 ; Sturm *et al.*, 1987). O mesmo atua como um inibidor irreversível e de longa duração na secreção gástrica, sendo indicados no tratamento da hiperacidez relacionada às doenças gastroduodenais. Em comum com as outras drogas de sua classe, como por exemplo, o omeprazol e lansoprazol, podemos observar que em modelos animais, o pantoprazol produz efeito dose-dependente na redução da secreção ácida através da inibição da bomba protônica ($H^+ / K^+ \text{-ATPase}$) das

células parietais gástricas (Fitton e Wiseman, 1996; Simon *et al.*, 1990 e Kromer *et al.*, 1990).

O mecanismo de ação do pantoprazol se dá pela sua ativação em condições de pH de extrema acidez, onde o mesmo facilmente acumula-se nas microvilosidades dos canalículos secretores das células parietais estimuladas (Shin, Besancon, Simon *et al.*, 1993). Assim, neste meio ácido, o pantoprazol é convertido rapidamente para forma ativa, a sulfonamida cíclica, que se liga covalentemente aos grupos cisteínicos da bomba H^+/K^+ -ATPase presente nas superfícies caniculares das células parietais, formando um composto dissulfeto. Deste modo, ocorre a inibição total da função da bomba protônica levando ao bloqueio da etapa final da produção do ácido gástrico (Shin, Besancon, Simon *et al.*, 1993; Simon, Keeling, Laing *et al.*, 1990; Sturm *et al.*, 1987; Senn-Bilfinger *et al.*, 1987, Lindberger *et al.*, 1986 e Figala *et al.*, 1986).

Portanto, a ativação ácida induzida é uma das características principais e mais comuns da classe dos derivados benzimidazólicos, o qual nos fornecerá bases para investigação de sua ação seletiva sobre a bomba gástrica (Beil, Staar e Sewing, 1992; Figala *et al.*, 1986).

Embora estes compostos sejam rapidamente ativados sob condições de extrema acidez ($pH \leq 3,0$), o pantoprazol sendo considerado uma base fraca ($pK_a = 3,9$), é quimicamente mais estável em relação ao omeprazol ou o lansoprazol em condições de pouca acidez ou neutralidade; além disso, o mesmo é dificilmente ativado nestas condições, visto que, sua ativação somente ocorre em meio extremamente ácido (Beil, Staar e Sewing, 1992 ; Kohl, Sturm, Senn-Bilfinger *et al.*, 1992; Simon, Keeling, Laing *et al.*, 1990). Tais características vão refletir no seu baixo poder de inibição da bomba protônica quando comparado com o omeprazol nas condições de pouca acidez (Simon, Keeling, Laing *et al.*, 1990).

Com estas informações, pode-se concluir que o pantoprazol é particularmente específico para as células parietais do estômago sendo, portanto, mais seletivo que o omeprazol e o lansoprazol (Fitton e Wiseman, 1996; Huber *et al.*, 1996; Kromer *et al.*, 1990 ; Parsons, 1996).

Assim, comprova-se que sua alta organoespecificidade é uma característica vantajosa frente aos outros IBPs, pois o mesmo é incapaz de bloquear outras ATPases do organismo fora da célula parietal gástrica, contribuindo com menores riscos de efeitos adversos e maior segurança terapêutica em modelos humanos e animais (Shin *et al.*, 1994).

Também, a ativação ácida induzida é facilitada "*in vitro*" pela ação bactericida do pantoprazol, sugerindo que este efeito seja similarmente mediado através ligações covalentes, nos sítios das membranas de certas espécies de bactérias. Dessa forma, a ativação da ATPase é um tipo de ação normalmente associada em células eucariontes que tem sido bem identificados nas membranas do *Helicobacter pylori* "*in vitro*" em condições ácidas (pH4,0), e portanto a mesma é fortemente inibida pela ação do pantoprazol (Mauch *et al.*, 1993; Pedersen *et al.*, 1987).

• **Propriedades Farmacodinâmicas e Terapêuticas**

As propriedades farmacodinâmicas e terapêuticas do pantoprazol em humanos têm sido investigadas através de séries de modelos experimentais em animais e estudos clínicos (Huber *et al.*, 1996; Schepp *et al.*, 1994; Mohamed e Hunt, 1994; Classen e Della Fave, 1994; Judmaier *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 1990 a, b, c; Kromer *et al.*, 1990). Também, em diversas revisões, os efeitos farmacodinâmicos e terapêuticos do pantoprazol foram avaliados em comparação com outros IBPs (Huber *et al.*, 1995; Kromer 1995).

Conforme mencionado, a ação farmacodinâmica do pantoprazol é exclusivamente através do acúmulo seletivo nas células parietais gástricas por ligações covalentes com a bomba protônica; levando à inibição da fase final da secreção gástrica. Dessa forma, comprova-se consistentes conclusões com base nos resultados de modelos experimentais clínicos, uma forte evidência quanto à eficiência no tratamento de úlceras pépticas através de administração tanto via oral quanto via endovenosa (Judmaier *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1992).

A eficácia de inibição ácida em comparação com outro IBP, o omeprazol, foi comprovada "in vivo" em nove modelos de ratos e cães (Kromer *et al.* 1990a). O pantoprazol inibiu de forma dose-dependente a secreção gástrica ácida, independente do tipo de estímulo (pentagastrina, betanecol, impromida, 2-dexoxy-D-glucose). Além disso, pode-se concluir em relação a um estudo clínico envolvendo voluntários sadios, que o pantoprazol produziu esta mesma inibição da secreção gástrica e também da pentagastrina estimulada pelo ácido gástrico livre (Simon *et al.*, 1990 a, b, c) após a administração tanto via oral quanto endovenosa (Schulz, Hartmann, Steinijans, Huber *et al.*, 1996).

Em estudos com ratos, o pantoprazol mostrou-se mais potente do que o omeprazol em valores de ID₅₀ (dose requerida para se obter a metade da inibição máxima da secreção de ácido). De maneira geral, ambos os compostos mostraram ser equipotentes. O desempenho similar comparável de ambas as drogas foi também confirmado "in vitro" pela avaliação da inibição da produção de ácido em glândulas fúndicas de coelhos (Simon *et al.*, 1990 e 1991a).

O cálculo dos valores anti-secretórios de ID₅₀, na correlação via oral e endovenosa, mostrou um fator de 1.5, confirmando a alta biodisponibilidade, onde também foram encontrados em estudos farmacocinéticos em humanos.

Em outra série de experimentos utilizando ratos, o efeito cicatrizador de úlcera do pantoprazol foi comparado ao de outras drogas antiulcerosas (um inibidor de próton, um antimuscarínico seletivo M-1 e um antagonista de receptores H₂). O pantoprazol promoveu cicatrização dose dependente da úlcera duodenal induzido com ácido acético (úlceras gástricas e duodenais). O ED₅₀ mais baixo (dose necessária para a obtenção da metade do efeito máximo) foi obtido para o pantoprazol, indicando assim a mais alta potência em comparação às outras drogas (Kromer *et al.*, 1990b).

Até janeiro de 1994, o pantoprazol foi investigado em mais de 50 estudos de fase I, envolvendo mais de 660 voluntários sadios e aproximadamente 100 pacientes de subgrupos especiais (por exemplo, idosos, pacientes com problemas renais e hepáticos) (Zeeh *et al.*, 1993).

Vários estudos usando técnicas de pH-metria de 24 horas foram realizados com o objetivo de investigar a inibição da secreção gástrica de ácido pelo pantoprazol sob condições de normalidade.

Em todos os estudos, voluntários sadios ou pacientes portadores de úlceras duodenais receberam pantoprazol oral por cinco a sete dias, com o objetivo de alcançar condições de equilíbrio.

Num estudo de dose-resposta, a administração de 20, 40 e 80 mg de pantoprazol mostrou um aumento de pH intragástrico dose-dependente. O efeito de 40 mg foi significativamente superior quando comparado com o de 20 mg. Os efeitos de 40 e 80 mg não foram diferentes (Reill *et al.*, 1993 a).

Estes resultados são compatíveis aos resultados do estudo de definição de dose realizado em pacientes com úlceras duodenais, nos quais 40 mg foi também identificado como a dose ótima (Shamburek *et al.*, 1993).

Para se determinar o tempo de dosagem ótima, mediu-se o efeito de 40 mg de pantoprazol administrado pela manhã ou à tarde. Uma inibição acentuada de acidez gástrica foi encontrada após ambos esquemas de administração. Entretanto, o efeito foi mais pronunciado quando o

pantoprazol foi administrado pela manhã (Müssig e Witzel, 1993). Assim, uma dose diária pela manhã é o esquema indicado.

O pantoprazol aumentou intensamente o pH intragástrico em voluntários sadios sem afetar o ritmo circadiano fisiológico da secreção ácida. O pantoprazol aumentou principalmente o pH durante o dia mais do que durante a noite. Junto com as excelentes taxas de cicatrização obtidas pelo pantoprazol em estudos de terapia clínica, este achado proporciona evidência adicional que a supressão ácida durante 24 horas determina o sucesso terapêutico, ao invés da inibição exclusiva ácida noturna (Johnson *et al.*, 1989, Bianchi Porro *et al.*, 1990 e Savarino *et al.*, 1991).

Consistente com as conclusões obtidas através dos estudos farmacológicos em animais, a equipotência de 40 mg endovenoso e 40 mg por via oral foi demonstrada em estudos no homem. Pantoprazol 40 mg aumentou a mediana do pH intragástrico para 3,7 (endovenoso) e 3,6 (via oral), respectivamente (Londong, 1994).

Em estudos subseqüentes, o pantoprazol foi comparado a ranitidina, antagonista de receptor H_2 , e com o omeprazol, com objetivo de definir sua potência de inibição da acidez em comparação com estes representantes de diferentes classes de drogas antiulcerosas (Beker *et al.*, 1995; Witzel *et al.*, 1995; Schepp *et al.*, 1994; Judmaier *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1992). O efeito de 40 mg de pantoprazol administrados pela manhã provou ser significativamente mais forte do que 300 mg de ranitidina administrados como recomendado, à hora de dormir (Hotz *et al.*, 1995).

A mediana do pH durante as 24 horas aumentou de 1,6 (placebo) para 4,2 com o pantoprazol, quando comparado com 2,7 com a ranitidina (Reill *et al.*, 1993b).

Em comparação com a dose recomendada de omeprazol (20 mg), a dose padrão de 40 mg de pantoprazol aumentou o pH para nível significativamente mais elevado durante as 24 horas, levando a supressão

de 98% da acidez gástrica após administração repetida (Hartmann *et al.*, 1993b). O omeprazol promoveu apenas 80% de inibição, o que está dentro da faixa admitida de 53 a 90% (Cederberg *et al.*, 1993, Sharma *et al.*, 1984).

Também foram investigados, o início e a duração da secreção ácida depois da estimulação da pentagastrina, em voluntários sadios.

Após a primeira administração oral de 40mg de pantoprazol a inibição da secreção ácida tinha já atingido 51%. Após tratamento de 7 dias, 85% da inibição foi conseguida. A secreção gástrica foi suprimida em 66% mesmo 25 horas após a última dose, indicando ampla eficácia até a próxima dose. A secreção ácida retornou aos níveis de pré-tratamento, sete dias após a suspensão do tratamento (Simon *et al.*, 1990b). O aumento observado na inibição da secreção ácida gástrica, após doses diárias repetidas se é ao modo de ação dos benzimidazólicos substituídos, no caso do pantoprazol, e é similarmente documentada para outras substâncias desta classe de drogas concorrentes disponíveis para a terapia (Lind *et al.*, 1983 e Müller *et al.*, 1989).

A avaliação preliminar de estudo pH-métrico de 24 horas, incluindo 19 pacientes com úlcera duodenal, também revelou efeito pronunciado de 40mg de pantoprazol sobre a secreção ácida nesses pacientes. Em média, o pH aumentou para um nível acima de 3 por mais de 19 horas e para o pH 4 por mais de 18 horas. Isto indica que o pantoprazol preenche totalmente as recomendações de Burger *et al.* 1990, para um grau adequado de supressão ácida em pacientes com úlcera duodenal.

Em estudos clínicos, 40 mg de pantoprazol ao dia (Steinijans *et al.*, 1996), resultou numa alta taxa de cicatrização em úlceras duodenais agudas, 89% após 2 semanas e 99% após 4 semanas de tratamento, e ainda rápida melhora da sintomatologia de úlcera duodenal (Müller *et al.*, 1992). Com relação a ambas taxas de cicatrização em úlceras duodenais agudas e o alívio da dor abdominal, 40 mg de pantoprazol provou ser

superior em relação a 300 mg de ranitidina (Cremer *et al.*, 1995; Judmaier *et al.*, 1994; Schepp *et al.*, 1994).

Em terapia de cicatrização de úlceras gástricas por 4 semanas, o pantoprazol foi superior em relação ao omeprazol com taxas de cicatrização de 88% e 77%, respectivamente (Schepp *et al.*, 1994; Witzel *et al.*, 1995).

Em estudo de controle da doença de refluxo esofágico, as taxas de cicatrização foi maior após 4 a 8 semanas com a terapia de pantoprazol 40 mg uma vez ao dia, obtendo valores de 69 e 82%, respectivamente, em relação a terapia com a ranitidina 150 mg duas vezes ao dia, que alcançou valores de 57 e 67%, respectivamente (Koop *et al.*, 1995).

• **Propriedades Farmacocinéticas**

Tendo em vista que o pantoprazol é extensivamente absorvido após a administração oral (Fitton e Wiseman, 1996 e Huber, Kohl, Sachs, Senn-Bilfinger *et al.*, 1995), pode-se considerar uma equipotência tanto na administração por via oral e endovenosa é encontrada (Fuder *et al.*, 1997). Dessa forma, a quantidade da droga que chega à célula parietal independente de via de administração, não se altera durante a absorção e distribuição no organismo. Isso explica a sua excelente biodisponibilidade em média de 80%, desde a primeira até a última administração com característica linear (Peeters, Oosterhuis, Taminga *et al.*, 1995; Pue, Larouche, Meinek, de Mey *et al.*, 1993; Fitton e Wiseman, 1996; Huber, Hartmann, Bliesath *et al.*, 1996 e Huber, Kohl, Sachs, Senn-Bilfinger *et al.*, 1995).

Também, estudos sobre biodisponibilidade e de pH-metria comprovaram esta equipotência do pantoprazol por via endovenosa em relação ao por via oral. As duas formas, quando administradas na mesma dose, têm o mesmo efeito sobre o pH do estômago, tanto em intensidade

quanto em qualidade sendo portanto equipotentes. Portanto, a passagem do pantoprazol por via endovenosa para via oral não implica em ajuste posológico. (Fuder *et al.*,1997; Hartman *et al.*,1998).

A farmacocinética do pantoprazol é considerada linear até a dose de 80 mg, isto significa que os níveis plasmáticos e a concentração máxima da droga aumentam de maneira proporcional à dose administrada, independente do esquema posológico e da via de administração (Huber, Kohl, Sachs *et al.*,1995; Simon, Müller, Hartmann *et al.*, 1990; Reill, Erhardt *et al.*, 1994; Steinijans *et al.*,1994 e Huber *et al.*1996).

Também, esta linearidade foi demonstrada em estudo com humanos onde a administração oral de 20 e 40 mg de pantoprazol foi realizada durante sete dias consecutivos. Os resultados obtidos comprovaram não existir diferenças significantes nos parâmetros farmacocinéticos em relação ao esquema de administração (dose única ou repetidas) e a quantidade administrada, sugerindo também a não evidência da ocorrência de acúmulos da droga no organismo quanto a sua ação anti-secretória (Simon, Müller, Hartmann *et al.*, 1990).

Em um outro estudo "randomizado", uni-cego de 4 períodos envolvendo 20 voluntários sadios, também foi avaliada a linearidade entre as doses de 10, 20, 40 ,80 mg de pantoprazol e.v. e seus parâmetros farmacocinéticos $ASC_{(0-\infty)}$ e $C_{m\acute{a}x}$ através do método de regressão intra-individual, dentro da faixa terapêutica para doenças gastro-duodenais. Os resultados obtidos,confirmaram formalmente a equivalência entre as dosagens de ajuste para ASC após as doses de 20, 40, e 80 mg, respectivamente. Outros parâmetros farmacocinéticos como $t_{1/2}$, Cl e Vd não sofreram alterações significativas nas diferentes doses (Bliesath, Huber, Hartmann *et al.*,1996).

O pantoprazol é rapidamente absorvido após administração oral de 40 mg em comprimidos revestidos, onde a concentração sérica máxima ($C_{m\acute{a}x}$)

alcançada em média é de 2,1mg/L (2,0 – 3,1 mg/L) no tempo máximo (tmáx) em média de 2,7h (2,0 – 4,0 hs) e também apresentando uma $ASC_{(0-\infty)}$ de aproximadamente 5mg x h/L (Pue, Larouche, Meinek *et al.*, 1993; Fitton e Wiseman, 1996; Huber, Hartmann, Bliesath *et al.*, 1996 e Simon, Müller, Marinis *et al.*, 1990).

Quando o pantoprazol é administrado concomitantemente com a ingestão de alimentos, nenhuma influência significativa foi observada na sua biodisponibilidade, bem como o aparecimento de possíveis efeitos de retardamento do alimento na taxa de absorção, conferindo uma ação anti-secretória prolongada e duradoura (Huber, Kohl *et al.*, 1995; Fitton e Wiseman, 1996).

O declínio das concentrações séricas de pantoprazol é monofásico após administração oral de 40 mg, apresentando uma meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) em torno de 0,9 – 1,9 h (Steinijans *et al.*, 1996; Huber, Hartmann, Bliesath *et al.* 1996; Ehrlich *et al.* 1996; Huber, Kohl, Sachs *et al.* 1995; Pue, Larouche, Meinek *et al.* 1993 e Simon, Müller, Marinis *et al.* 1990;). Apesar de apresentar curta meia vida de eliminação, a inibição da secreção ácida uma vez alcançada, é longa e duradoura, persistindo após a droga ter sido completamente eliminada da circulação sanguínea (Fitton e Wiseman, 1996).

Em virtude do seu alto grau de ligação às proteínas plasmáticas, em torno de 98% (Huber, Kohl, Sachs *et al.*, 1995 e Ehrlich *et al.*, 1996), o pantoprazol possui, relativamente, baixo volume de distribuição (Vd), cuja média é de 0,16L/Kg em estudos "steady-state", considerando como limite de distribuição tissular; além disso, também apresenta baixo clearance no valor de 0,1L/h/Kg (Ferron *et al.*, 1999; Steinijans *et al.*, 1996; Huber, Hartmann, Bliesath *et al.*, 1996; Breuel, Hartmann e Bondy *et al.*, 1994 e Benet e Zech, 1994).

O pantoprazol é amplamente metabolizado no fígado através da via do sistema enzimático oxidativo, principalmente pela citocromo P450. Seu principal metabólito, o desmetil-pantoprazol, é formado através da reação de o-desmetilação na posição 4 do anel piridínico, seguido de conjugação com o radical sulfato. Entretanto, ainda o mesmo possui atividade desconhecida (Tucker, 1994; Erlich *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1995 e Steinijans *et al.*, 1996).

A sua via de eliminação, é predominantemente renal, onde 80% da dose oral e ou endovenosa é excretada na forma de metabólitos urinários e o restante pode ser encontrado nas fezes, originados primariamente pela secreção biliar (Huber *et al.*, 1996a; Steinijans *et al.*, 1996 e Peeters, Oosterhuis, Zech *et al.*, 1993).

Os parâmetros farmacocinéticos do pantoprazol não são alterados significativamente em pacientes portadores de insuficiência renal (Fitton e Wiseman, 1996; Parsons, M.E 1996; Steinijans *et al.*, 1996 e Lins, de Clercq, Hartmann *et al.*, 1994). Além disso, procedimentos de hemodiálises também não influem na farmacocinética da droga em pacientes com distúrbios renais ou que apresentam o estágio de falência renal; sendo assim não há necessidade de ajuste na dosagem (Fitton e Wiseman, 1996).

Em comum com os outros IBPs, o metabolismo do pantoprazol é prejudicado em pacientes portadores de disfunção ou cirrose hepática, resultando numa meia vida de eliminação mais prolongada, variando de 7 a 9 horas após a administração de doses (única e consecutivas) por via oral ou endovenosa (Fitton e Wiseman, 1996; Steinijans *et al.*, 1996 e Brunner, Hartmann *et al.*, 1994). Entretanto, foi observado aumento nos valores da ASC e C_{máx}, porém de menor importância, sendo desnecessário ajuste da dosagem na terapia de pacientes com insuficiência e cirrose hepática (Fitton e Wiseman 1996; Huber, Kohl, Sachs *et al.*, 1995 e Brunner, Hartmann *et al.*, 1994,).

Em pacientes idosos, por apresentarem decréscimo do fluxo sanguíneo hepático, possuem um metabolismo diminuído (Skauninc *et al.*, 1978 e Wynne *et al.*, 1990), contudo, a meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) é aproximadamente 1,25h, sendo dado farmacocinético sem importância (Huber *et al.*, 1996 a e Steinijans *et al.*, 1996).

Em estudo envolvendo voluntários jovens e idosos sadios, foram avaliados os parâmetros farmacocinéticos após dose única de 40 mg de pantoprazol por via oral e endovenosa (Breuel, Hartmann, Bondy *et al.*, 1994). Neste estudo foi observado que no grupo dos idosos ocorreu leve aumento na ASC e na $C_{m\acute{a}x}$ em relação ao grupo dos jovens, porém, este fato foi clinicamente irrelevante, sendo desnecessário ajuste na dose de administração (Huber, Hartmann *et al.*, 1996).

• Interações Medicamentosas

A classe dos derivados benzimidazólicos demonstra alto grau de afinidade com as enzimas citocromos (CYP) presentes no fígado, os quais são inibidores potentes do metabolismo oxidativo de várias drogas (Dickins e Bridges, 1982). Entretanto, através de investigações clínicas envolvendo animais e também humanos, o pantoprazol têm demonstrado uma menor interação com o sistema enzimático (CYP), em especial pela citocromo P450, quando comparado com o omeprazol e o lansoprazol (Simon, Budigen, Fahr *et al.*, 1991; Hanauver *et al.*, 1991 e Kromer, Postius, Riedel *et al.*, 1990a).

Além disso, ao contrário dos outros derivados imidazólicos como o omeprazol e os antagonistas dos receptores H_2 , em particular a cimetidina (Anderson, T. 1991 ; Greene, W. 1984), o pantoprazol não têm demonstrado interação considerável com variedades de substratos do sistema enzimático hepático, tais como citocromos CYP1A, 2C e a subfamília da isoenzima 3A

(Hartmann, Bliesath, Zech *et al.*, 1995 ; Steinijans, Huber, Hartmann *et al.*, 1994).

Diversos estudos clínicos, apresentaram baixo potencial de interferência nos parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos na terapêutica associada com pantorazol e drogas primariamente metabolizadas pelas citocromos CYP2C19 (Diazepam), CYP2C9 (diclofenaco, fenprocumona, feníioína e warfarina), CYP3A4 (antipirina, nifedipina, carbamazepina e cisaprida) e outras através das isoenzimas citocrômicas a saber: cafeína, metropolol, teofilina e digoxina (Ferron *et al.*, 1999; Steinijans *et al.*, 1994 e 1996; Duursema *et al.*, 1995; Ehrlich *et al.*, 1995 e 1996; Gugler *et al.*, 1992; Gugler & Jansen, 1985 e 1987; Schulz *et al.*, 1991; Bliesath *et al.*, 1994, 1995 e 1996; de Mey *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 1993, 1994 e 1995; Fitton & Wiseman 1996).

Levando em consideração o percentual de pacientes que farão uso dessas medicações, a curto e longo prazo, em algum momento da terapêutica anti-secretória e por outras doenças concomitantes, o uso do pantoprazol possibilita uma terapêutica eficaz e sem riscos de interações medicamentosas, com maior segurança e tolerabilidade ao paciente.

Outro aspecto importante, é que o pantoprazol não aparenta comprometer a eficácia contraceptiva da associação de hormônios sintéticos (Ethinylestradiol e levonorgestrel). Em co-administração de 40 mg de pantoprazol uma vez ao dia, com baixa dose da combinação de hormônios contraceptivos, não foi observado alterações significantes nos níveis séricos de progesterona e ou na indução da ovulação, no estudo clínico envolvendo voluntárias saudáveis (Middle, Müller, Schall *et al.*, 1995; Fitton & Wiseman, 1996).

Por outro lado, autores (Hartmann *et al.*, 1994 e 1995; de Mey *et al.*, 1994; Middle *et al.*, 1995 e Schulz *et al.*, 1991) também consideram que os parâmetros farmacocinéticos do pantoprazol, em especial quanto a sua

extensão de absorção, não são afetados significativamente na co-administração de drogas antiácidas, fenitoína, antipirina, digoxina e teofilina.

• **Segurança e Tolerabilidade**

Inúmeros estudos têm confirmado o excelente perfil de segurança e tolerabilidade na terapia do pantoprazol. Estudos de farmacovigilância já incluíram mais de 100.000 pacientes. Milhões de pacientes vêm recebendo pantoprazol com tempo de tratamento por volta de cinco anos, sem relatos de efeitos adversos superior a 5 anos do uso prolongado, como a acloridria ou desenvolvimento de tumor endócrino (carcinóide) (Athmann *et al.*, 1998; Arnold, R. 1994 ; Solcia *et al.*, 1997).

Os efeitos colaterais descritos com a administração de pantoprazol 40 mg são de baixa incidência e, na maioria dos casos, de leve intensidade, como diarreia, cefaléia, dor abdominal, náuseas e vômitos (Fitton & Wiseman, 1996). Entretanto a administração de pantoprazol 20 mg parece ter um perfil de tolerabilidade ainda maior (Ramirez-Barba, Di Silvio *et al.*, 1998).

Objetivos

Como principal objetivo, a realização de um estudo para determinar e avaliar a bioequivalência de duas formulações de pantoprazol (Pantozol, comprimidos, 40mg do Laboratório Byk Química Farmacêutica como formulação referência, *versus* Pantoprazol, comprimidos, 40mg do Laboratório Merck Farmacêutica, utilizado como formulação teste) baseada na comparação dos valores obtidos dos parâmetros farmacocinéticos de cada formulação calculados a partir de medida das concentrações plasmáticas de pantoprazol.

Dessa forma, empregamos a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase-reversa, com detecção por Espectrometria de Massa, utilizando a carbamazepina como padrão interno, com propósito de:

- 1) Validar a metodologia analítica por LC-MS/MS na quantificação das concentrações de pantoprazol em amostras de plasma humano.
- 2) Obtenção dos principais parâmetros farmacocinéticos a partir da curva de concentração plasmática *versus* tempo.

1. ETAPA CLÍNICA

1.1 Seleção Dos Voluntários

Doze voluntários adultos sadios do sexo masculino com idade de 18 a 40 anos (média $\pm$ DP = 30 ± 1 ano), peso corporal entre 49,7 a 96,6 Kg (média $\pm$ DP = 70 ± 4 Kg) e dez voluntárias adultas sadias do sexo feminino com idade de 18 a 40 anos (média $\pm$ DP = 30 ± 1 ano) foram selecionados. A seleção foi realizada através de consulta médica, incluindo anamnese e exame físico, no ambulatório de farmacologia clínica.

Na avaliação clínica os voluntários masculinos e as voluntárias femininas não apresentaram sinais ou sintomas evidentes de doença cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica, ou psiquiátrica. Foram considerados os seguintes critérios de inclusão na avaliação clínica inicial:

- a) Sexo Masculino e Sexo Feminino
- b) Idade compreendida entre 18 e 45 anos
- c) Peso corporal entre 55 e 100 Kg ou dentro da faixa de 15% do peso ideal para a idade e altura
- d) Ausência de significativa doença cardíaca, hepática, renal, pulmonar, gastrointestinal, hematológica, neurológica, afastadas por uma história clínica, exame físico, além de exames complementares de diagnóstico rotineiros
- e) Disponibilidade para complementar o estudo
- f) Capacidade para compreender e assinar livremente o termo de consentimento

Os seguintes critérios de exclusão também foram considerados durante a avaliação clínica:

- a) Homens com idade < 18 anos e > 40 anos
- b) Mulheres com idade < 18 anos e > 40 anos
- c) Ingestão de qualquer medicamento por pelo menos duas semanas antes do início do estudo
- d) Teste positivo para hepatite B, Hepatite C , HIV e gravidez
- e) Incapacidade para compreender e para assinar o termo de consentimento
- f) Resultados dos exames complementares de diagnóstico fora dos limites normais, desde que, considerados com significado clínico
- g) Participação em qualquer estudo experimental nos três meses que precedem o ensaio clínico
- h) História de uso regular ou abusivo de drogas e/ou álcool, ou ainda ingestão de álcool nas 48 horas que antecedem o estudo
- i) Hospitalização por qualquer razão nas 8 semanas anteriores ao início do estudo
- j) História de doença hepática, doença renal, doença hematopoética ou episódios de epilepsia
- k) História de doença cardíaca ou sintomas de origem cardíaca
- l) Hipotensão ou hipertensão arterial de qualquer etiologia, requerendo tratamento farmacológico
- m) Infarto do miocárdio, angina do peito e ou insuficiência cardíaca congestiva
- n) Prolapso de Válvula Mitral com evidência de refluxo para o átrio
- o) Pressão arterial abaixo de 90/50 mmHg em posição supina e ou frequência cardíaca menor que 50 bpm, durante exame clínico inicial

- p) Queda da pressão arterial maior que 20 mmHg, em posição ortostática, e aumento da frequência cardíaca maior que 20 bpm, após 2 minutos em posição ereta
- q) Perda de mais que 450 mL de sangue nos três meses anteriores ao início do estudo
- r) História de hipersensibilidade a qualquer tipo de droga
- s) Qualquer outra condição clínica, que a critério médico, impossibilite a participação no estudo

Os voluntários também apresentaram normalidade para os exames laboratoriais que colaboraram para a confirmação do estado de hígidez. Na avaliação clínica inicial, exames hematológicos compreendendo hemograma completo, contagem de plaquetas e velocidade de hemossedimentação foram realizados, assim como sorologia para hepatite B, hepatite C e anti-HIV. Exames hormonais no caso para mulheres na determinação de gravidez como β HCG. Os exames bioquímicos consistiram na determinação dos níveis sangüíneos de uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicemia de jejum, fosfatase alcalina, transaminase glutâmico pirúvica (TGP), sódio, potássio, ácido úrico e gama glutamil transferase (Gama GT). Um exame sumário de urina (Urina tipo I) e exame parasitológico de fezes também foi realizado. Todos os exames, com exceção do parasitológico de fezes, sorológicos para hepatites B, C e anti-HIV, foram efetuados antes e após cada internação para administração do Pantoprazol.

Eletrocardiograma pelo sistema Holter, com registro por 24 horas em duas derivações, realizado em gravador Cardiotechcorder III – Um Cardio Data Systems, New Jersey – USA, foi efetuado em todos os voluntários na avaliação clínica inicial, excluindo do estudo portadores de provável cardiopatia. A análise foi realizada em equipamento

computadorizado, utilizando software Holter Analysis – Dynamis V5.06 da Daignostic Medical Instruments, Inc, Syracuse – USA.

Na avaliação clínica inicial, a pressão arterial diastólica e sistólica, a frequência de pulso e a frequência respiratória foram aferidas utilizando tensiômetro aneróide, com o voluntário deitado em decúbito dorsal, sentado e 2 minutos após o mesmo encontrar-se em ortostase.

1.2 Protocolo clínico

Ensaio clínico seguindo delineamento aleatório cruzado, aberto, de dois períodos, com intervalo de 15 dias entre as doses, de Pantoprazol administradas em voluntários sadios de ambos os sexos para a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos.

Os 12 voluntários masculinos e 10 voluntárias femininas selecionados foram distribuídos em 2 grupos e não mais do que uma dose foi administrada a um mesmo voluntário. O grupo 1 foi composto por 12 indivíduos do sexo masculino; o grupo 2, por 10 indivíduo do sexo feminino;e, conforme apresentado na tabela 01.

Grupo	Internação (1)	internação (2)	Nº de voluntários
1 Dose	40mg	40mg	12
2 Dose	40mg	40mg	10

Tabela 01 – Distribuição final dos grupos com base na diferença de sexo com a mesma dose de Pantoprazol nos períodos de internação: (1), (2) .

- Grupo 1, Voluntários do sexo masculino.
- Grupo 2, Voluntários do sexo feminino.

Os voluntários e voluntárias foram hospitalizados(as) na véspera do início do estudo, quando receberam assistência e cuidados médicos e de enfermagem especializados.

Receberam dieta geral até as 23:00 horas, quando iniciaram jejum visando o início do ensaio clínico previsto para as 07:00 h do dia seguinte.

Após 8 horas de jejum, foi realizado uma administração de uma única por via oral de um comprimido de 40mg de Pantoprazol. A administração da droga em estudo seguiu rigorosamente o protocolo de administração da dose. Os voluntários e voluntárias receberam dieta geral após a administração de Pantoprazol, sendo que foi descartado bebidas contendo xantinas tais como chás ,café e coca-cola).

Alta hospitalar foi concedida após 24 horas da administração do Pantoprazol e preenchimento do formulário de “Alta Médica”, quando o número de pontos atribuídos foi maior ou igual a 7. Quando esta

pontuação não era alcançada o voluntário deveria permanecer hospitalizado e novamente o critério de alta seria avaliado com base na pontuação.

1.3 Protocolo de administração

Cada voluntário recebeu uma única dose com intervalo de pelo menos uma semana compreendido entre as doses. A tabela 02 apresenta os dois períodos de administração para o pantoprazol, seguindo um delineamento aleatório cruzado, com intervalo de quinze dias entre as doses de Pantoprazol-teste (Pantoprazol®) e Pantoprazol-referência (Pantozol®) administrada aos 22 voluntários selecionados.

Grupo	Voluntário	Internação 1	Internação 2
1	01	Pantozol	Pantoprazol
1	02	Pantozol	Pantoprazol
1	03	Pantoprazol	Pantozol
1	04	Pantozol	Pantoprazol
1	05	Pantoprazol	Pantozol
1	06	Pantozol	Pantoprazol
1	07	Pantozol	Pantoprazol
1	08	Pantoprazol	Pantozol
1	09	Pantozol	Pantoprazol
1	10	Pantoprazol	Pantozol
1	11	Pantoprazol	Pantozol
1	12	Pantoprazol	Pantozol
2	13	Pantozol	Pantoprazol
2	14	Pantoprazol	Pantozol
2	15	Pantozol	Pantoprazol
2	16	-	-
2	17	-	-
2	18	Pantoprazol	Pantozol
2	19	Pantoprazol	Pantozol
2	20	Pantozol	Pantoprazol
2	21	Pantoprazol	Pantozol
2	22	Pantozol	Pantoprazol
2	23	Pantoprazol	Pantozol
2	24	Pantozol	Pantoprazol

Tabela 02 – Tabela de randomização.

- Pantoprazol®-Merck S.A : pantoprazol-teste.
- Pantozol®-ByK Quim Farmacêutica : pantoprazol-referência.

1.4 Forma Farmacêutica e Apresentação

Os comprimidos de 40mg de pantoprazol foram obtidos do laboratório Merck Pharmaceuticals Inc., São Paulo, Brasil (formulação-teste, Pantoprazol® - 40 mg , lote: 99G08) e do laboratório Byk Química Farmacêutica Inc., São Paulo, Brasil (formulação-referência, Pantozol® - 40 mg, lote: 199212).

1.5 Coleta de amostras

As amostras de sangue foram coletadas através de escalpe em veia superficial do antebraço do voluntário, imediatamente antes do início da administração de pantoprazol e nos seguintes intervalos: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 e 12 horas. Em cada tempo pré-determinado de coleta, 10 mL de sangue foram retirados com seringa, através do escalpe, e colocado em um tubo limpo heparinizado. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm (Centrifuga FANEM Excelsa Baby II – São Paulo, Brasil). O plasma foi separado em tubos de plástico com tampa rosqueável e anel de vedação identificados e armazenados em freezer a - 20° C, para posterior análise.

2. METODOLOGIA ANALÍTICA

2.1 Princípios Do Método

As concentrações plasmáticas de Pantoprazol foram determinadas por metodologia analítica empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase-reversa, acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS). O composto Pantoprazol e seu padrão interno

carbamazepina foram extraídos do plasma humano por uma extração em fase líquida-líquida, empregando dietileter:diclorometano (70:30v/v) como solvente extrator.

2.1.1 Análises das Concentrações Plasmáticas

As amostras de um único voluntário foram analisadas no mesmo dia, evitando assim variações interensaio. A concentração plasmática de pantoprazol foi medida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa, e os picos foram monitorados através de detector de espectrometria de massa (MS/MS).

2.2 Materiais e Reagentes

O método empregado utilizou de materiais e reagentes que foram devidamente documentados para a realização do procedimento operacional padrão.

- **Materiais**

Pipetas ajustáveis (100, 200, 1000 e 5000 μ L), Gilson DistrimanTM; France.

Pipetador ajustável de repetição, Gilson DistrimanTM; France.

Agitador automático de tubos, modelo AP56, Phoenix Equipamentos Científicos São Paulo; Brazil.

Coluna analítica C8, Genesis C8 4 μ m (150 x 4.6mm i.d.), Jones Chromatography (part n.15960E); England.

Guarda coluna C8, Genesis C8 4 μ m (10 x 4mm i.d.), Jones Chromatography (part n. FH1960-2); England.

Ponteiras de plástico descartáveis de 5-200 µl, part n.94300120 and 200-1000 µl, part n. 94300220, Unilab, São Paulo; Brasil.

Tubos de ensaio 120 x 11mm, Unilab, Sao Paulo; Brasil.

Eppendorf, Unilab, Sao Paulo; Brasil.

Vials para Injetor automático (1.1 CTVG) e tampas para vials Chromacol; USA.

pH-metro Quims, modelo Q400P, part n. 610874; Singapore.

Centrífuga refrigerada Beckman, modelo GPS, part n. 349702; USA.

Sistema de HPLC, Hewlett-Packard 1100, cromatógrafo líquido:

Modelo	part n.	Componentes
G1316A	US72102831	Componentes da coluna
G1329A	DF73300308	Injetor automático
G1330A	DE73300312	Termostato do Injetor automático
G1322A	JP73007583	Degaseificador
G1312A	US72102050	Sistema binário de bombas

Espectrômetro de massa, Micromass Quattro II, com "electrospray source" empregando um "crossflow counter electrode", part. n. 6418E.

Sistema de aquisição de dados: Computador Digital Celebris GL 6200, Software MassLynx (versão 2.3) para Windows NT (versão 4.0).

• Reagentes

Acetonitrila – Para análise - HPLC , Mallinckrodt (part n. UN1648)

Éter-dietil, Nuclear (part n. 1583)

Diclorometano, Mallinckrodt (part n. 7528)

Ácido Trifluoroacético, Sigma

Água Deionizada (Sistema Milli-Q ou Elga UHQ)

Bolsas de plasma humano para o preparo das curvas de calibração e das concentrações utilizadas como controle de qualidade, adquiridos do Hospital Universitário da USP.

- **Padrões**

Padrões de Pantoprazol foram fornecidos por Merck Pharmaceuticals Inc., São Paulo, Brasil.

- **Preparo de soluções padrões**

Todas as soluções padrões preparadas foram acondicionadas a + 4°C em tubos de vidro revestidos com silicone e devidamente identificados com a concentração final da solução padrão obtida, bem como a sua data de preparo.

Pantoprazol – Solução Padrão

Solução padrão estoque de Pantoprazol foi preparada dissolvendo 10 mg da droga em 10 mL em metanol:água (50:50), obtendo uma concentração final de 1,0 mg/mL.

Soluções padrões de Pantoprazol foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de Pantoprazol (1,0 mg/mL) em metanol:água (50:50) obtendo concentrações finais de Pantoprazol, conforme mostrado na tabela 03.

Concentração da Solução padrão		Preparo (Volume e Concentração da solução padrão utilizado)	Fator de diluição
A	10 µg/ml	100 µL of 1mg/ml to 10ml	100

Tabela 03 – Soluções padrões Pantoprazol.

Observações

- Nos experimentos de validação a solução A foi preparada no dia do uso, mas prévia experiência tem sugerido que esta solução pode ser armazenada durante 2 meses a 4°C, não ocorrendo degradação da droga. Assim, durante os experimentos de validação foi observado que não houve degradação significativa sob estas condições empregadas. Todas as soluções foram preparadas em metanol:água (50:50).
- As soluções padrões de Pantoprazol foram preparadas em vials de vidro revestidos com silicone em metanol:água (50:50)
- Todas as soluções foram mantidas a 4°C, até o momento da utilização quando então foram deixadas à temperatura ambiente (~22°C) para descongelar e entrar em equilíbrio, antes de serem utilizadas.

Carbamazepina – Solução Padrão

A solução padrão estoque de Carbamazepina foi preparada dissolvendo 10 mg da droga em 10 mL de metanol:água (50:50), obtendo uma concentração final de 1,0 mg/ mL.

A solução padrão de Cabamezepina foi preparada a partir da diluição da solução estoque de Carbamazepina (1,0 mg/ mL) em metanol:água (50:50) obtendo concentrações finais de carbamazepina, conforme mostrado na tabela 04.

Concentração da Solução padrão		Preparo (Volume e Concentração da solução padrão utilizado)	Fator de diluição
A	100 µg/ml	1000 µL of 1mg/ml to 10ml	10
B	1µg/ml	100 µL of A to 10ml	100

Tabela 04 - Soluções padrões de Carbamazepina.

Obs:

- i. Nos experimentos de validação esta solução foi preparada no dia do uso, mas prévia experiência tem sugerido que estas soluções podem ser armazenadas durante 2 meses a 4°C, não ocorrendo degradação da droga. Assim, durante os experimentos de validação foi observado que não houve degradação significativa sob estas condições empregadas. Todas as soluções foram preparadas em metanol:água (50:50).
- ii. As soluções padrões de Cabamazepina foram preparadas em tubos de vidro revestidos com silicone em metanol:água (50:50)

- iii. Todas as soluções foram mantidas a 4°C, até o momento da utilização, quando então foram deixadas à temperatura ambiente (~22°C) para descongelar e entrar em equilíbrio, antes de serem utilizadas.

- **Preparo de outras soluções**

Todas as soluções preparadas foram acondicionadas em frascos de vidro devidamente etiquetados com identificação descritiva e data para cada respectiva solução. As soluções foram acondicionadas a +4°C, sendo substituídas após dois meses de preparo.

Solvente extrator Dietileter –Diclorometano (70:30)

70 mL de dietileter foi transferido para uma proveta volumétrica graduada de 100 mL, em seguida o volume final da proveta foi completado com diclorometano, obtendo um solvente extrator com 70% de dietileter e 30% de diclorometano.

Fase móvel (80% de acetonitrila, TFA 0.1%, 20% água)

Uma solução de 80% de acetonitrila foi preparada adicionando 1000 µL de ácido trifluoracético(TFA) a um proveta volumétrica (1000 mL) contendo 200 mL de água Milli-Q, em seguida o volume foi completado para 800 mL com acetonitrila. A fase móvel foi cuidadosamente misturada, sendo desgaseificada por ultra-som e filtrada a vácuo em membrana de náilon com 0,45 µm de porosidade não sendo necessário o ajuste de pH da mesma.

2.3 Preparo da curva de calibração e amostras de controle de qualidade

A curva de calibração assim como as concentrações de controle de qualidade tem como função de prever a variação dos valores analíticos. Portanto, estas concentrações estão relacionadas com a dose padronizada na qual este método foi desenvolvido. A utilização com outras doses padronizadas pode ocorrer uma correção destas concentrações se a variação prevista dos valores analíticos não for a mesma.

A curva de calibração e as concentrações de controle de qualidade são preparados em matrix biológica assim como as amostras que serão analisadas.

- **Preparo da curva de calibração**

As curvas de calibração foram contruídas a partir da contaminação de plasma humano controle com soluções padrões contendo Pantoprazol. Cada curva de calibração foi composta de duas amostra branco (matriz biológica isenta do padrão do fármaco e do padrão interno), duas amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de sete pontos em duplicata contendo concentrações conhecidas de Pantorazol e padrão interno. O preparo de cada ponto da curva de calibração e suas respectivas concentrações obtidas são apresentados na tabela 05.

Quando a curva de calibração é preparada á partir de soluções padrões de estoque, as correspondentes soluções de trabalho são utilizadas. Quando a mesma é preparada com base em diluição dos pontos da curva previamente preparados somente o fator de diluição é utilizado.

As curvas de calibração e brancos foram preparados para cada dia da realização do ensaio.

STD	Concentração no plasma	Volume e Concentração de solução padrão ou curva de padronização previamente preparada para diluição	Volume de plasma adicionado	Volume total de plasma	Fator de diluição
7	1000 ng/mL	2.0 mL de A (10.0 µg/mL)	18 mL	20 mL	10
6	500 ng/mL	1.0 mL de A (10.0 µg/mL)	19 mL	20 mL	20
5	200 ng/mL	4.0 mL de 7(1000.0 ng/mL)	16 mL	20 mL	5
4	100 ng/mL	4.0 mL de 7(500.0 ng/mL)	16 mL	20 mL	5
3	70 ng/mL	2.8 mL de 6(500.0 ng/mL)	17.2 mL	20 mL	7.143
2	50 ng/mL	5.0 mL de 5(200.0ng/mL)	15 mL	20 mL	4
1	35 ng/mL	7.0 mL de 4(100.0ng/ml)	13 mL	20 mL	2.857
Z	Branco e PI	—	—	—	—
B	Branco	—	—	—	—

Tabela 05 - Curva de calibração: Volume das soluções padrões de Pantoprazol utilizados para obtenção da curva de calibração.

- **Preparo das amostras de controle da qualidade (CQ)**

As amostras de controle de qualidade foram definidas de acordo com o manual de padronização de procedimentos para a metodologia empregada tendo duas distintas propostas:

- As amostras de concentrações que foram identificadas com o prefixo “L” foram designadas para se determinar o limite de quantificação (LOQ) para cada ensaio.
- As outras concentrações foram identificadas por números são utilizadas para monitorar a precisão e a exatidão do método analítico de quantificação empregado durante o ensaio.

As amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas a partir da contaminação de plasma humano controle com concentrações conhecidas de Pantoprazol; três amostras de controle de qualidade em diferentes concentrações foram obtidas:

QCA – 120,0 ng/mL

QCB – 800,0 ng/mL

QCC – 600,0 ng/mL

Os controles de qualidade foram preparados em quantidade suficiente para a monitorização contínua da precisão e exatidão do método analítico, conforme demonstrado na tabela 06. Após o preparo os controles foram aliquotados em tubos eppendorf e estocados a - 20°C até posterior análise.

Durante a realização do estudo cada uma das três concentrações, estocadas em tubo eppendorf, foi descongelada e analisada em duplicata conjuntamente com as demais amostras a intervalos adequados e dependendo do número total de amostras.

QC	Concentração do QC (ng/ml)	Volume and Concentração Da solução padrão	Volume de plasma	Volume total de
L1	35.0 ng/mL	10.0 mL de QCL3 (70.0 ng/mL)	10 mL	20 mL
L2	50.0 ng/mL	1.25 mL de QCB (800.0 ng/mL)	18.75 mL	20 mL
L3	70.0 ng/mL	1.75 mL de QCB (800.0 ng/mL)	18.25 mL	20 mL
A	120.0 ng/mL	3.0 mL de QCB (800.0 ng/mL)	17 mL	20 mL
B	800.0 ng/mL	1.6 mL de A (10µg/ml)	18.4 mL	20 mL
C	600.0 ng/mL	1.2 mL de A (10µg/ml)	18.8 mL	20 mL

Tabela 06 - Preparo dos controles de qualidade.

2.4 Validação do Método Analítico

A validação do estudo foi realizada para monitorar a precisão e exatidão do método em um único dia de análise (Intra-ensaio) e em diferentes dias de análise (Interensaio).

A precisão e exatidão do Intra-ensaio, realizado no mesmo dia, foram determinadas através da análise de cada uma das três diferentes concentrações dos controles de qualidade (QCA, QCB e QCC), em 9 diferentes lotes. A precisão e exatidão do Interensaio, realizado em dias sucessivos, foram determinadas através da análise de seis amostras de controle de qualidade (Duas QCA, duas QCB e duas QCC) juntamente com as demais amostras em estudo, a intervalos de dez em dez amostras e dependendo do número total de amostras.

Cada lote da validação analítica deve conter os itens à seguir que dever estar dispostos deste forma:

- Uma curva de calibração, construída com uma amostra branco (matriz biológica isenta do padrão do fármaco e do padrão interno), uma amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e os sete pontos da curva em duplicata definidos de acordo com o sub-item "Preparo da curva de calibração" anteriormente descrito.
- As amostras de concentrações de limite de quantificação QL1, QL2, QL3 em duplicata.
- Amostra analítica à ser quantificada em duplicata.
- As amostra de controle de qualidade QCA, QCB, QCC dispostas entre si com dez amostra de cada concentração assim determinada.

Qualquer variação na lista deve ser adequadamente relatada.

2.5 Extração de Amostras

- 0,5 mL de amostras de plasma dos voluntários (em paralelo com os pontos da curva de calibração, os controles de qualidade e os limite de quantificação) foram adicionados em tubos de ensaio.
- 0,05 mL de uma solução contendo padrão interno (1,0 µg/mL) foi adicionado em cada tubo empregando pipeta automática Gilson, os tubos foram brevemente agitados no agitador automático e em seguida deixado em repouso a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 4 mL de dietileter-diclorometano (70:30) foi adicionado utilizando Pipetador ajustável de repetição Gilson DistrimanTM, em seguida as amostras foram agitadas por 30 segundos no agitador automático.
- Após centrifugação a fase orgânica foi cuidadosamente removida através de pipetas de Pasteur e transferida para tubos de ensaio revestidos com silicone.

- v. Em seguida os tubos de ensaio revestidos com silicone contendo a fase orgânica foram colocados no banho-maria a 37°C sob fluxo constante de nitrogênio.
- vi. Após a evaporação da fase orgânica as amostras foram resuspendidas com 200µL de fase móvel e agitadas brevemente no agitador automático.
- vii. Posteriormente as amostras foram transferidas para os Vials do Injetor automático empregando pipetas de pasteur revestidas com silicone.
- viii. Tampas para vials Chromacol foram utilizadas e as amostras acondicionadas no injetor automático para posterior análise.

2.6 Condições Cromatográficas

Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase-reversa - Hewlett-Packard 1100 USA equipado com uma coluna analítica (Genesis C8 4µm (150 x 4.6mm i.d.) e um guarda-coluna (Genesis C8 4µm - 10 x 4mm i.d.) adquiridos de Jones Chromatography, Inglaterra foram utilizados. A coluna foi operada a uma temperatura de 40°C e uma coluna de transferência foi utilizada para desviar o excesso de eluente em apropriado tempo. A fase móvel (Acetonitrila 80%, contendo 0.1% de TFA) foi bombeada através da coluna em um fluxo constante de 1.0 mL/min. Uma fenda de aproximadamente 1:10 foi selecionada, assim somente aproximadamente 100 µl/min do eluente proveniente da coluna entrou no espectrometro de massa. A temperatura do injetor automático foi mantida a 10°C e alíquotas de 40 µl foram injetadas automaticamente no cromatógrafo líquido..

O total tempo de corrida para cada amostra do ensaio foi de 4 minutos.

Típicos padrões de tempo de retenção são apresentados conforme a tabela 07 á seguir.

Padrão		Tempo de Retenção (min)
Pantoprazol	(MRM de 366.1>91.50)	1.86
Carbamazepina	(MRM de 236.89>194.09)	2.2

Tabela 07-Típicos tempos de retenção.

A quantificação das amostras dos voluntários foi obtida por plotar as razões da altura do pico de pantoprazol/cabamazepina com aquelas amostras de plasma branco contaminado com quantidades conhecidas de pantoprazol (35, 50, 70, 100, 200, 500, 1000ng/ml) e 1000ng/ml de carbamazepina.

2.7 Condições do Espectrômetro de Massa

O Espectrômetro de massa empregado utilizou um "Quattro II triple stage quadrupole mass spectrometer" equipado com um "atmospheric pressure ionization (API) electrospray", operando no modo iônico positivo (MS+) e usando um "crossflow counter electrode". O espectrometro de

massa foi calibrado com uma solução de iodeto de sódio/iodeto de cério selecionando um intervalo de m/z de 20 a 1000, de acordo com as especificações do instrumento. A otimização das condições espectrométricas de massa para os compostos estudados (Regulagem e dissociação induzindo energia de colisão) foi realizada através de uma bomba de infusão conectada diretamente na sonda do spray de elétrons (electrospray probe).

O espectrometro de massa foi selecionado no modo operante reação múltipla de monitorização (multiple reaction monitoring (MRM)), e os seguintes íons foram selecionados descritos conforme a tabela 08 a seguir.

Padrão	Channel Mass	Daughter	Dwell (s)	Coll. Energy (eV)	Cone (V)
Pantoprazol	366.1	91.50	0.2	35	50
Carbamazepina	236.9	194.2	0.2	15	25

Tabela 08 - Ions Monitorados.

Foi realizado teste de infusão das soluções padrões de pantoprazol e carbamazepina, preparadas conforme especificado na tabela 09, com finalidade de assegurar a integridade do desempenho cromatográfico e espectrométrico de massa antes de iniciar o ensaio analítico.

Soluções padrões	
Analito	Concentração (ng/mL)
Pantoprazol	120.0
Carbamazepina	1.0

Tabela 09 - Soluções padrões.

2.8 Cálculo das Concentrações

Os dados foram processados e elaborados utilizando um computador GL 6200 PC com o software MassLynx (Versão 2.3). A equação das curvas de calibração foram determinadas por regressão linear empregando MassLynx. As curvas de calibração foram construídas a partir dos dados obtidos entre as diferentes concentrações das soluções padrões versus a razão (*R*) entre as áreas dos picos correspondentes a droga e ao padrão interno. As concentrações de pantoprazol "amostras desconhecidas" foram calculadas pelo emprego da equação ($y = ax + b$), onde *x* é a concentração da droga no plasma (ng/ml), *y* é a razão (*R*) entre a área do pico da droga e a área do pico do padrão interno, *a* é a inclinação da reta e *b* é o valor do intercepto.

2.9 Estabilidade

Testes realizados indicaram que amostras de pantoprazol em processo mantiveram sua estabilidade em temperatura de autosampler

até 48hs, que é maior que o antecipado tempo de corrida para tamanho de lote utilizados em estudos.

Testes realizados indicaram que todas as soluções de estoque de pantoprazol podem ser estocadas até 4°C por dois dias sem ocorrer degradação.

As duas formulações de pantoprazol foram bem toleradas na dose administrada para os voluntários durante a realização do estudo. Não houve qualquer relato de efeitos adversos e os parâmetros bioquímicos não sofreram alterações, permanecendo dentro dos valores de referência.

A figura 1 apresenta típicos cromatogramas de monitoramento de reação de massas (Mass reaction monitoring – MRM), demonstrando uma amostra de plasma normal, lipêmico e hemolisado obtidos de seis voluntários durante a realização do teste de especificidade. Nenhum pico interferente foi observado no cromatograma de massas durante o tempo de retenção do pantoprazol e seu padrão interno (carbamazepina), para as amostras de plasma normal, lipêmico e hemolisado, respectivamente conforme observado nas figuras 1a, 1b e 1c.

Típicos cromatogramas de monitoramento de reação de massas (Mass reaction monitoring – MRM) foram obtidos para o limite de quantificação (35 ng/mL) para pantoprazol e seu padrão interno, conforme apresentados nas figuras 2a e 2b, respectivamente. O tempo de retenção para o pantoprazol e carbamazepina foi 1,86 e 2,20 minutos, conforme apresentado nas figuras fig 2a e 2b, respectivamente.

A fig 3 e 4 apresentam típicos cromatogramas de monitoramento de reação de massas (Mass reaction monitoring – MRM) referentes ao C_{max} de um voluntário para as formulações teste e referência, respectivamente, após a administração de uma única dose de 40 mg de pantoprazol. A concentração máxima de pantoprazol para a formulação teste foi de 145 ng/mL (fig 3a) e para a formulação referência foi 99 ng/mL (fig 4a).

O espectrometro de massa programado no modo de busca positivo apresentou os seguintes íons moleculares protonados $[M+H]^+$ m/z 366,1 e 236,9 respectivamente, para pantoprazol e carbamazepina, via primeiro quadrupolo (Q1) com energia de colisão induzindo fragmentação em Q2 e monitorando os seguintes produtos iônicos em Q3: m/z 366.1 e 237.2 respectivamente. Estes produtos iônicos foram selecionados para monitorização da fragmentação e medida quantitativa (Fig 5 e Fig 6).

Uma típica curva de calibração obtida a partir da contaminação de plasma humano com concentrações de 35 a 1000 ng/mL para pantoprazol e uma concentração fixa de 50 ng/ mL para carbamazepina é apresentada na Fig 6 .

O limite de quantificação (LQ), aqui definido como a menor concentração da curva padrão (35ng/mL) apresentou um coeficiente de variação de 11.20% e uma exatidão de -6.24% foi obtido a partir da realização do interensaio para as curvas de calibração (Tabela 10).

A precisão e exatidão obtidas durante o interensaio para as curvas de calibração são apresentadas na tabela 10. A precisão do interensaio foi de 6.41 a 21.54%, e a exatidão estimada entre -6.24 a 5.22% sobre os diferentes pontos da curva de calibração.

Os controles de qualidade (CQ) foram analisados juntamente com as demais amostras de concentração não conhecida a um intervalo de dez em dez amostras. A tabela 11 apresenta os principais valores. A precisão do intra – ensaio foi $\leq 10.18\%$ para o QCA, $\leq 18.99\%$ para o QCB $\leq 18.22\%$ para o QCC. A precisão do interensaio foi ≤ 14.99 , 14.83, e 14.69% para o QCA, QCB, QCC respectivamente. A exatidão do interensaio foi ± 2.37 , -5.47, e - 5.96% respectivamente para o QCA, QCB e QCC.

As curvas das médias das concentrações plasmáticas de pantoprazol em função do tempo obtidas após a administração oral de cada formulação de pantoprazol 40 mg são apresentadas na figura 07.

A tabela 12 mostra os valores das médias geométricas e os intervalos de confiança de 90% para ASC [0-12], ASC[0-∞], Ke, T_{1/2}, C_{max}, assim como os valores das medianas de T_{max} para cada formulação.

A tabela 13 mostra a análise estatística das razões individuais teste/referência da ASC[0-12], ASC[0-∞], C_{max}, C_{max}/ASC, Ke, T_{1/2}, bem como a inclusão dos intervalos de confiança de 90% (IC 90%) para as médias geométricas dentro da faixa de bioequivalência de 80 – 125%. As diferenças individuais de T_{max} entre as formulações de pantoprazol foram estatisticamente diferentes de zero, como mostrado pelo fato de que o IC 90% para diferenças individuais teste – referência não inclui o valor zero.

As curvas individuais de concentrações plasmáticas de pantoprazol 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 pantoprazol versus tempo de 0 – 12h (ASC_{0-12h}), foi calculada pelo método trapezoidal.

A extrapolação das ASC_{0-12h} ao infinito ASC_(0-∞) foi realizado pela adição do valor C₁₂/Ke às ASC_{0-12h} calculadas (onde C₁₂ = concentração plasmática 12 horas após a dose, calculada a partir da equação de regressão linear obtida para estimar as Ke).

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

A bioequivalência entre as formulações foi avaliada através do cálculo das razões individuais teste/referência para $ASC_{[0-12]}$, $ASC_{[0-\infty]}$, 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 88 – 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.

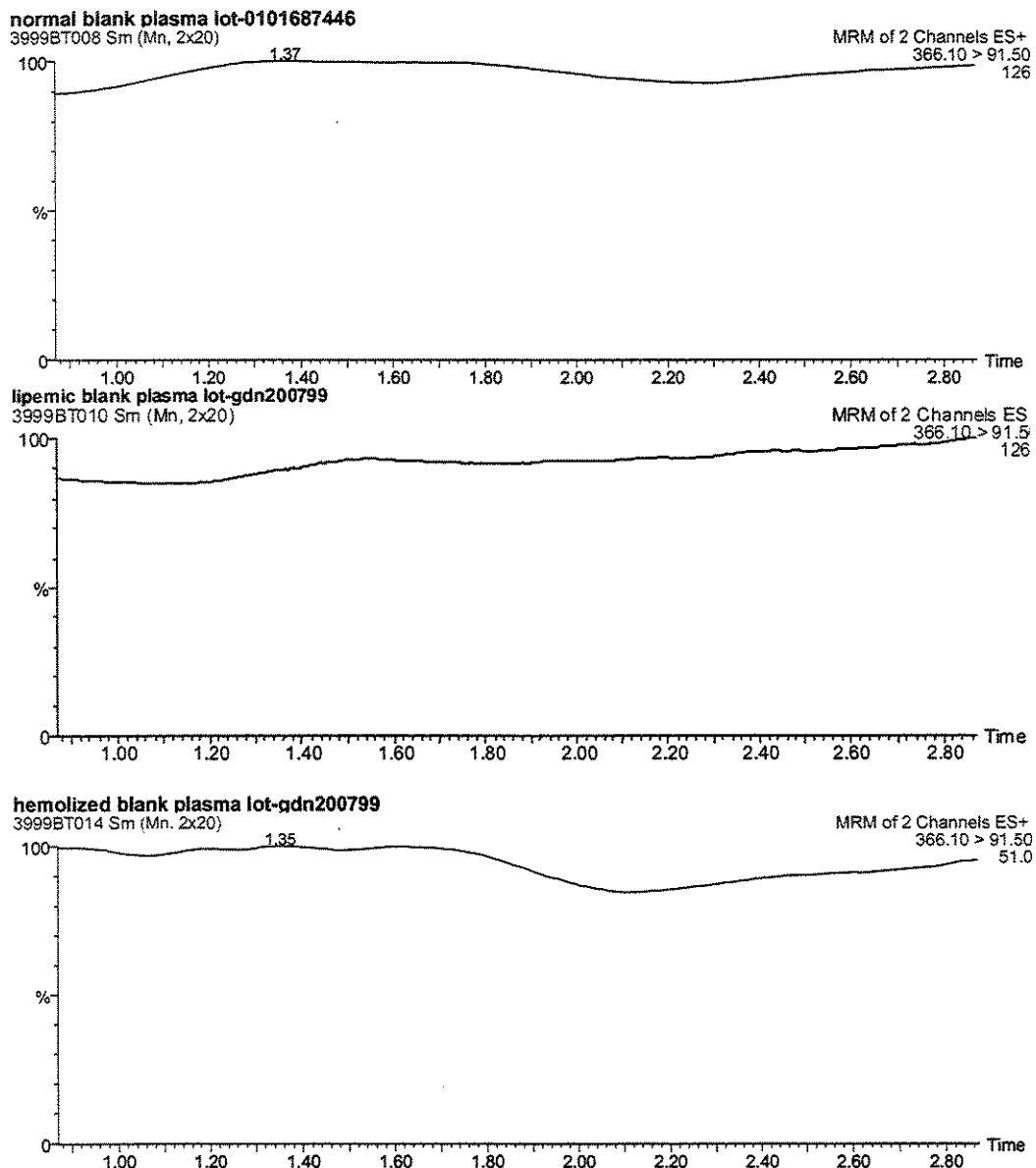


Figura1 – Cromatogramas de íons (MRM): (A) Plasma humano branco (MRM: 366,10>91,50). (B) Plasma humano lipêmico (MRM: 366,10>91,50). (C) Plasma humano hemolisado (MRM: 366,10>91,50).

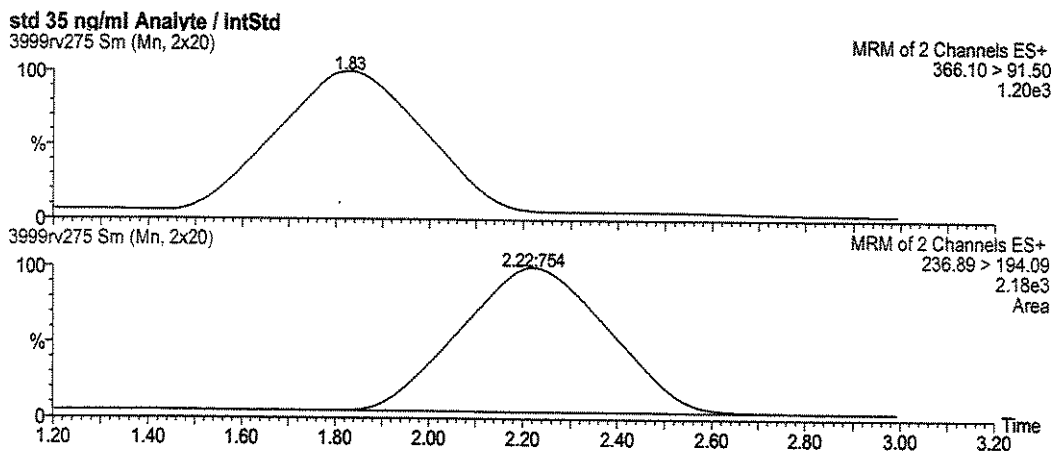


Figura 2 - Cromatogramas de íons (MRM): (A) Limite de quantificação (35ng/mL), (MRM: 366,10>91,50). (B) Padrão interno carbamazepina (50 ng/mL), (MRM: 236,89>194,09).

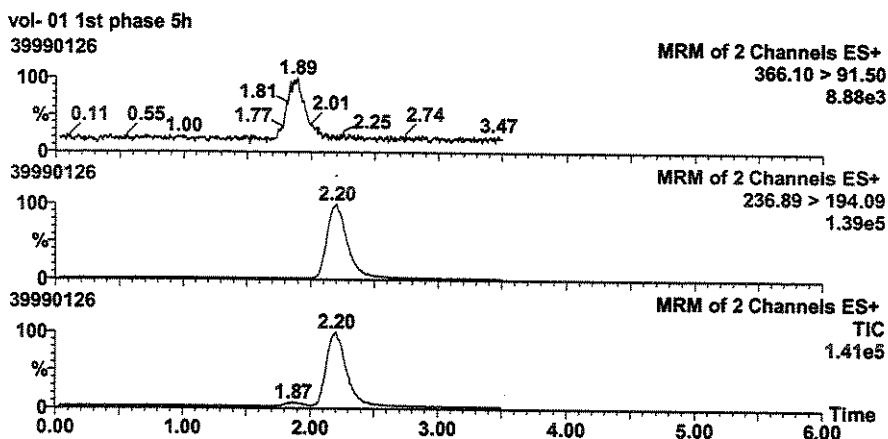


Figura 3 - Cromatogramas de íons (MRM): (A) Amostra de plasma de um voluntário coletada 5 horas após administração da formulação teste (40 mg de pantoprazol) (MRM: MRM: 366,10>91,50). (B) Plasma humano contaminado com o padrão interno carbamazepina (50 ng/mL) (MRM: 236,89>194,09). (C) Concentração plasmática máxima (99 ng/mL), pantoprazol (MRM: 366,10>91,50) e seu padrão interno, carbamazepina (50 ng/mL) (MRM: 236,89>194,09).

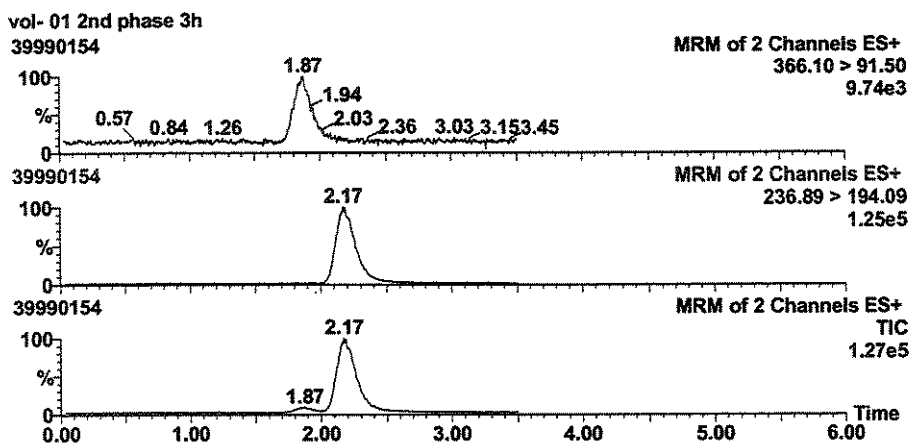
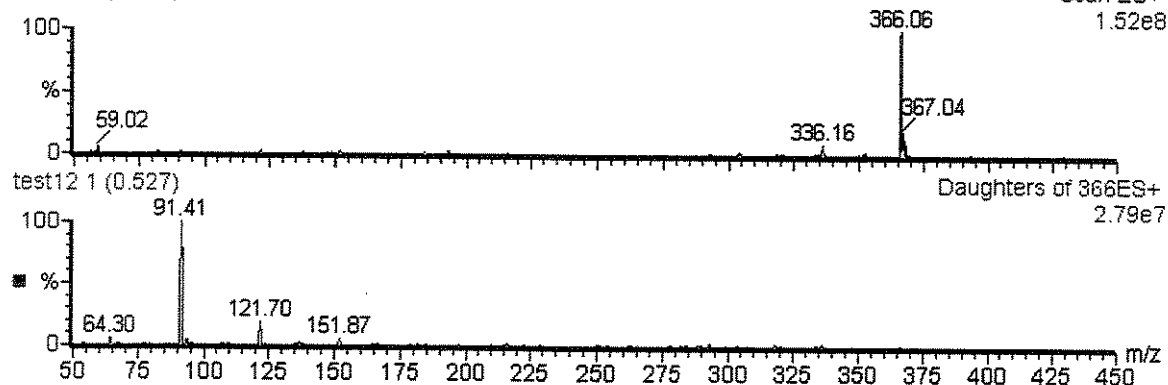


Figura 4 - Cromatogramas de íons (MRM): (A) Amostra de plasma de um voluntário coletada 3 horas após administração da formulação teste (40 mg de pantoprazol) (MRM: 366,10>91,50). (B) Plasma humano contaminado com o padrão interno carbamazepina (50 ng/mL) (MRM: 236,89>194,09). (C) Concentração plasmática máxima (145 ng/mL), pantoprazol (MRM: 366,10>91,50) e seu padrão interno, carbamazepina (50 ng/mL) (MRM: 236,89>194,09).

Pantoprazole in MP Inf 10uL/mL Cone 50 + TFA 0.01% msms 35

test11 1 (0.502)

Scan ES+
1.52e8



test12 1 (0.527)

Daughters of 366ES+
2.79e7

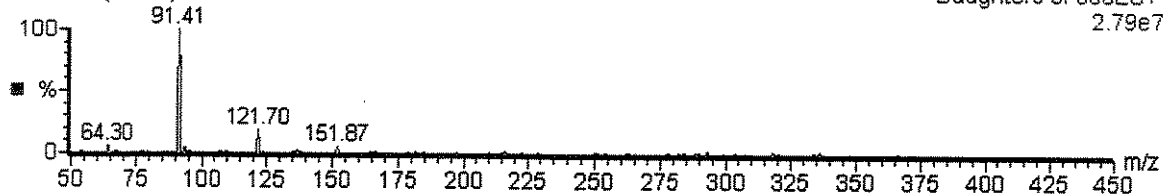


Figura 5 - Espectro de massa: (A) Espectro do Pantoprazol adquirido em Q1, energia do cone = 50v. (B) Espectro dos produtos de íons do pantoprazol adquirido em Q2 após colisão induzindo dissociação, energia do cone = 50v e energia de colisão= 35 eV.

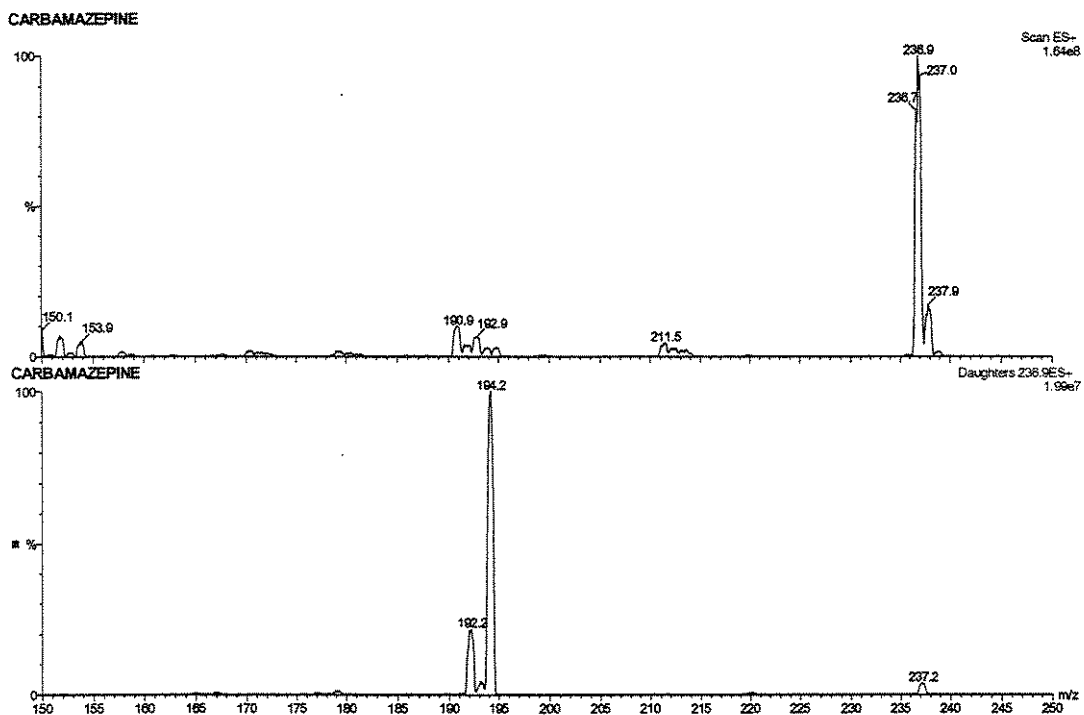


Figura 6 - Espectro de massa: (A) Espectro da carbamazepina adquirido em Q1, energia do cone = 30v. (B) Espectro dos produtos de íons da carbamazepina adquirido em Q2 após colisão induzindo dissociação, energia do cone = 25v e energia de colisão= 15 eV.

Compound 1 name: pantoprazol
Coefficient of Determination: 0.991042
Calibration curve: $0.00395875 * x + 0.0187051$
Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x. Axis trans: None

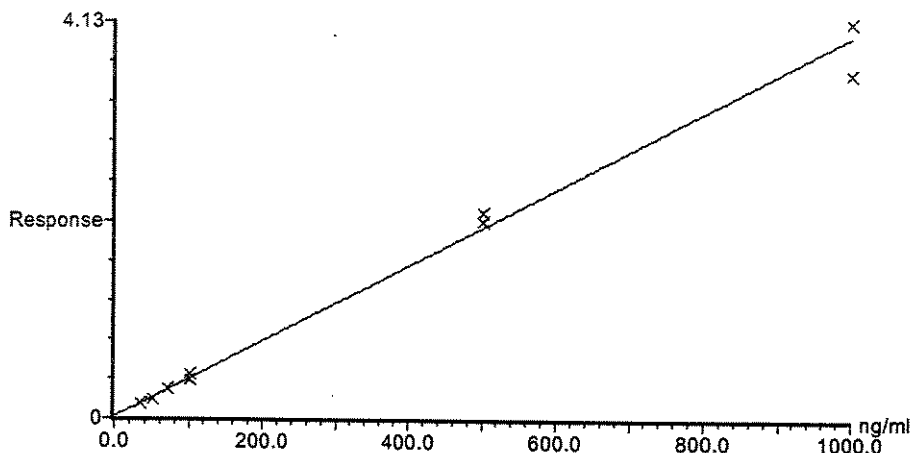


Figura 7 - Curva de calibração obtida após a contaminação de plasma humano com Pantoprazol (35.0 – 1000 ng/ mL) e Carbamazepina (50.0 ng/ mL).

Curvas	35.0	50.0	70.0	100.0	200.0	500.0	1000.0	r ²
Lote 01	32.34	59.24	70.83	92.46	140.85	505.15	1022.08	0.9900
Lote 02	33.25	43.78	75.39	105.31	213.43	497.64	946.25	0.9940
Lote 03	34.23	50.74	68.38	120.89	220.78	528.72	972.93	0.9962
Lote 04	29.79	41.51	66.33	111.72	227.00	526.44	934.24	0.9920
Média	32.81	49.86	70.00	105.22	200.51	515.81	975.94	0.9930
DP	3.67	10.74	6.26	14.83	37.44	33.22	62.58	0.0026
RDP (%)	11.20	21.54	8.95	14.10	18.67	6.44	6.41	
RE (%)	-6.24	-0.26	0.00	5.22	0.26	3.16	-2.40	

Tabela 10 – Diferentes curvas obtidas após a contaminação de plasma humano com pantoprazol (35.0 – 1000 ng/mL) e carbamazepina (50.0 ng/mL) durante a realização do interensaio.

QCA	n	Média	DP	DPR (%)	ER (%)
Lote 01	2	129.11	0.99	0.76	7.59
Lote 02	4	111.15	10.34	9.30	-7.36
Lote 03	4	117.48	9.67	8.23	-2.09
Lote 04	4	126.91	11.02	8.68	5.76
Lote 05	7	117.63	10.10	8.59	-1.96
Lote 06	7	112.44	8.31	7.39	-6.29
Lote 07	3	124.93	5.00	4.00	4.11
Lote 08	3	170.39	17.35	10.18	41.99
Inter - Ensaio	34	122.85	18.41	14.99	2.37
QCB	n	Média	DP	DPR (%)	ER (%)
Lote 01	2	923.44	70.31	7.61	15.43
Lote 02	6	855.92	44.18	5.16	6.99
Lote 03	5	719.67	43.56	6.05	-10.04
Lote 04	5	757.77	88.56	11.68	-5.27
Lote 05	8	765.78	73.48	9.59	-4.27
Lote 06	5	581.37	34.91	6.00	-27.32
Lote 07	4	727.61	97.92	13.45	-9.04
Lote 08	4	794.73	150.93	18.99	-0.65
Inter - Ensaio	39	756.20	112.21	14.83	-5.47
QCC	n	Média	DP	DPR (%)	ER (%)
Lote 01	2	638.31	71.84	11.25	6.38
Lote 02	3	580.80	105.84	18.22	-3.19
Lote 03	3	545.02	24.05	4.41	-9.16
Lote 04	7	599.86	105.57	17.59	-0.02
Lote 05	7	595.11	65.25	10.96	-0.81
Lote 06	5	436.30	31.15	7.14	-27.28
Lote 07	3	572.59	102.04	17.82	-4.56
Lote 08	4	536.26	65.00	12.12	-10.62
Inter - Ensaio	34	564.23	82.90	14.69	-5.96

DP., Desvio Padrão; DRR., Desvio Padrão Relativo; ER, Erro Relativo.

Tabela 11 – Intra – ensaio e interensaio.

Concentração Média

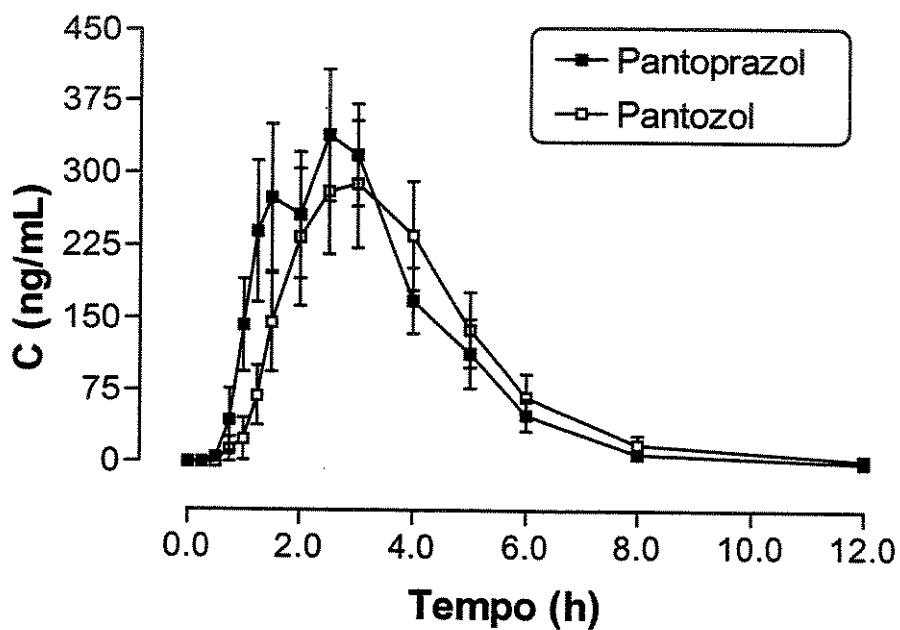


Figura 8 - Concentrações plasmáticas (médias aritméticas $\pm$ EP) de pantoprazol em função do tempo para as duas formulações de pantoprazol (40mg) administradas em 22 voluntários sadios de ambos os sexos.

Pantoprazol: quadrados cheios; Pantozol: quadrados vazios.

Parâmetros	Pantoprazol	Pantozol
ASC _[0-12] (ng.h.mL ⁻¹)	949.9	908.7
Média Geométrica	726.2 – 1242.6	683.5 – 1208.1
90% IC		
ASC _[0-∞] (ng.h.mL ⁻¹)	971.2	1071.1
Média Geométrica	755.6 – 1247.3	831.0 – 1380.0
90% IC		
C _{max} (ng.h.mL ⁻¹)	524.2	525.2
Média Geométrica	416.8 – 659.1	400.1 – 689.5
90% IC		
C _{max} / ASC _[0-12] (ng.h.mL ⁻¹)	0.6	0.6
Média Geométrica	0.5 – 0.7	0.6 – 0.7
90% IC		
t _{1/2} (h)	0.949	0.882
Média Geométrica	0.797 – 1130.0	0.725 – 1073.0
90% IC		
Ke (h ⁻¹)	0.729	0.775
Média Geométrica	0.614 – 0.867	0.642 – 0.936
90% IC		
t _{max} (h)	2.3	2.5
Mediana	1.0 – 5.0	1.0 – 5.0
Faixa		

Tabela 12 – Parâmetros farmacocinéticos de pantoprazol obtidos após a administração de cada uma das formulações de pantoprazol (40mg) nos 22 voluntários.

Parâmetros	% das razões Pantoprazol/Pantozol	
	Paramétrico	Não Paramétrico ^a
ASC _[0-12] (ng.h.mL ⁻¹)		
Média Geométrica	105.5	104.3
90% IC	95.2 – 116.8	93.9 – 117.7
ASC _[0-∞] (ng.h.mL ⁻¹)		
Média Geométrica	102.6	102.0
90% IC	91.5 – 115.1	89.1 – 114.8
C _{max} (ng.h.mL ⁻¹)		
Média Geométrica	99.8	98.9
90% IC	88.2 – 112.8	88.3 – 114.2
C _{max} / ASC _[0-12] (ng.h.mL ⁻¹)		
Média Geométrica	105.6	105.4
90% IC	99.7 – 111.9	97.9 – 112.4
t _{1/2} (h)		
Media Geométrica	108.5	106.1
90% IC	89.9 – 130.8	96.6 – 118.3
K _e (h ⁻¹)		
Média Geométrica	107.0	105.5
90% IC	89.4 – 128.0	93.4 – 118.0
t _{max} (h)		
Média Geométrica	-0.542 ^b	-5.00
90% IC	-1.057-0.027 ^c	-1.25 – 0.00

^aDe acordo com *Hauschke et. al.*, resultados não paramétricos são expressos como ponto estimado e 90% do IC das razões individuais, exceto para o t_{max} (expresso como ponto estimado e 90% do IC das diferenças individuais) (1990);

^bMédia Aritmética das diferenças individuais

^c90% das diferenças individuais

Tabela 13 – Análise estatística das razões individuais teste/referência da ASC 0-12h, ASC_{0-∞}, C_{max}, e das diferenças teste – referência de T_{max} entre ambas as formulações de pantoprazol.

O monitoramento da fase clínica de fármacos em estudos de bioequivalência requer métodos analíticos altamente sensíveis e seletivos para determinação com precisão das concentrações plasmáticas. A associação entre HPLC e MS tem se apresentado como uma eficaz técnica para a obtenção de informações de caráter estrutural de diversos compostos de natureza orgânica, bem como uma melhor sensibilidade para a quantificação de níveis plasmáticos mínimos (Covey *et al.*, 1986; Mück, 1999). Uma grande variedade de técnicas de ionização possibilitou uma maior interface entre estas duas metodologias, e o emprego de Tandem mass spectrometry (MS/MS) (sucessão de espectros de massa) uma maior especificidade analítica (Sakairi e Kambara, 1988a; Bruins, 1991a; Bruins, 1994a).

A metodologia descrita no presente estudo para a determinação dos níveis plasmáticos do pantoprazol confirmou que o sistema LC-MS/MS apresentou excelente sensibilidade, especificidade, precisão e rapidez. O tempo de retenção alcançado pelo pantoprazol, seu padrão interno e o não aparecimento de picos tardios permitiram que todas as amostras de um único voluntário fossem analisadas num mesmo dia de trabalho a fim de evitar variações do inter-ensaio.

As equações das curvas de calibração calculadas por regressão linear apresentam boa linearidade na faixa de concentração utilizada (35,0 a 1000,0 ng/mL de pantoprazol), sendo que a média dos coeficientes de regressão linear (r) maior que 0.993.

O limite de quantificação, estabelecido através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes até o menor nível determinado foi de 35 ng/mL, apresentando precisão e exatidão aceitáveis. Assim o método permitiu que fossem detectadas e quantificadas concentrações plasmáticas de pantoprazol ao longo de 12 horas após a administração em dose única de 40 mg em comprimido do fármaco.

Os valores dos coeficientes de variação (cv%) para a precisão e exatidão do interensaio da linearidade estão de acordo com os limites de aceitabilidade, exceto para as concentrações nominais de 50 e 200 ng/mL. Entretanto, as recomendações dos Órgãos Regulamentadores de Saúde consideram que 4 das 6 concentrações nominais incluindo o LOQ e o ponto de calibração de maior concentração devem cumprir com os critérios de aceitabilidade para a validação de métodos analíticos (Shan *et al.*, 1992; FDA – Guideline for Industry / Bioanalytical Method Validation final draft, 1998 e 2001). Todos os valores dos coeficientes de variação (cv%) para a precisão e exatidão do interensaio das concentrações nominais dos controles de qualidade são menores que 15%, considerando aceitáveis para a validação de métodos analíticos (Braggio *et al.*, 1996; Kames *et al.*, 1991; Shan *et al.*, 1992; FDA – Guideline for Industry / Bioanalytical Method Validation final draft, 1998 e 2001).

Baseados nestas considerações, e de acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que a metodologia empregada apresentou uma validação metodológica aceitável com valores satisfatórios dentro das exigências presentes nos guias dos Órgãos Oficiais de Saúde (FDA – Guideline for Industry / Bioanalytical Method Validation final draft, 1998 e 2001; ANVISA – RDC nº 39 de 1999 e RDC nº 10 de 2001).

Conforme demonstrado na tabela 12, não foi observado nenhuma diferença significativa na média dos valores de AUC_[0-12], AUC _[0-∞], C_{máx} e t_{máx} obtidas para cada formulação, onde os mesmos foram avaliados

através da sobreposição entre seus intervalos de confiança de 90% para as médias geométricas.

Os valores observados de $t_{1/2}$ e $t_{máx}$ estão de acordo com aqueles relatados por outros autores para este tipo de formulação (Simon *et al.*, 1990; Pue *et al.*, 1993; Steinijans *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1995 e 1996; Ehrlich *et al.*, 1996 e Fitton e Wiseman, 1996), porém os resultados obtidos de AUC [0-12], AUC [0- ∞] e $C_{máx}$ não estão em concordância em relação os valores presentes na literatura.

A tabela 13 mostra que os intervalos de confiança de 90% das médias das razões individuais de AUC [0-12], AUC [0- ∞] e $C_{máx}$ (após a transformação pelo logarítmico), estão incluídos totalmente dentro da faixa de bioequivalência de 80 – 125% quando analisados sejam por métodos paramétricos e não paramétricos.

Estes resultados mostram que ambas formulações são claramente bioequivalentes para extensão de absorção como requerido pela U.S FDA (1985, 1993)

Contudo, as diferenças individuais de $t_{máx}$ são estatisticamente diferentes de zero, assim demonstrado pelos intervalos de confiança de 90% obtidos por testes paramétricos e não paramétricos. Portanto, estes resultados fazem com que as conclusões sejam reforçadas da não bioequivalência em relação à velocidade de absorção e portanto, devam ainda ser discutidas. Apesar de $C_{máx}$ e $t_{máx}$ serem considerados como indicadores da velocidade de absorção, muitos autores têm questionado a utilidade e as limitações desses parâmetros para decidir sobre o problema da bioequivalência, dados os efeitos que o esquema de amostragem tem sobre eles. Neste sentido, Endrenyi *et al.* 1991, têm demonstrado que $C_{máx}$ não apenas reflete a velocidade de absorção, mas também a extensão como evidenciado pela alta correlação observada entre este parâmetro e AUC, assim propôs a razão $C_{máx}/AUC$ como melhor indicador da velocidade de

absorção. Neste estudo, a média geométrica e o intervalo de confiança de 90% para as razões individuais teste/referência para $C_{\text{máx}}/\text{AUC}$ e $C_{\text{máx}}$ estiveram totalmente incluídos dentro da faixa de bioequivalência de 80-125%. Com base nos resultados, as conclusões sobre a presença de bioequivalência para a velocidade de absorção seriam opostas aos resultados observados com referência às diferenças significantes dos $t_{\text{máx}}$ entre ambas formulações. De acordo com os requerimentos da *European Community*, a importância de $t_{\text{máx}}$ como um índice de velocidade de absorção “somente faz sentido de houver necessidade clinicamente relevante para a liberação rápida ou ação ou sinais de relação entre concentração e efeitos adversos (Salmonson 1996)”.

Conforme apresentado na tabela 12, as medianas de $t_{\text{máx}}$ para as duas formulações de comprimidos de pantoprazol de 40mg são de 2.3 e 2.5 h, com largos intervalos de valores de 1.0 – 5.0 h para ambas formulações. Assim, concluímos que as diferenças de $t_{\text{máx}}$ entre ambas formulações são de mínima relevância clínica.

A Food and Drug Administration dos Estados Unidos da América (US FDA, 1985), estabelece que a biodisponibilidade *in vivo* de uma dada formulação farmacêutica pode ser determinada pela medida dos níveis plasmáticos da molécula da droga, ingrediente ativo ou metabólitos ativos em função do tempo, ou através da quantificação de algum efeito farmacológico agudo.

Neste trabalho, avaliamos a bioequivalência de duas formulações de comprimidos de pantoprazol através da medida das concentrações plasmáticas da droga em função do tempo, de acordo com as normas do FDA.

Concluir sobre a bioequivalência das duas ou mais formulações que contém a mesma droga e a mesma dosagem administrada pela mesma via consiste em comparar as biodisponibilidades relativas. Então, a existência de

biodisponibilidade implica que não deve haver diferenças estatísticas entre as formulações. Por isso, são usados vários testes estatísticos para comparar tais biodisponibilidades. Os testes estatísticos paramétricos geralmente assumem que os dados têm uma distribuição normal. A transformação dos dados de AUC, C_{máx}, K_e e t_{1/2} pela aplicação do logarítmico são realizados, desse modo os dados transformados distribuem-se normalmente.

A análise de variância (ANOVA) testa as fontes de variabilidade assim como se existem diferenças entre e dentro dos tratamentos, os períodos de estudo e os grupos.

O “Two One-sided Tests” (paramétrico: Schuirmann (1997), não – paramétrico: Hauschke *et al.*, 1990), é o método empregado para determinar grandes diferenças (por exemplo maior que 20%) entre as médias dos parâmetros. Os intervalos de confiança são estimados para as médias das amostras, baseado na distribuição de Student dos dados. Neste teste requerido pelo FDA, o intervalo de confiança de 90% da razão das médias das duas formulações deve estar dentro de $\pm 20\%$ (Steinijans *et al.*, 1988) para medida da velocidade de absorção da droga. O limite inferior do intervalo de confiança de 90% para a razão das médias não pode ser menor que 0.80, enquanto que o superior não pode ser maior que 1.25. Então o intervalo de confiança de 90% é uma função do tamanho da amostra e variabilidade do estudo, incluído a variabilidade inter e intra-indivíduo.

Baseados nestas considerações, e de acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que a formulação teste Pantoprazol é bioequivalente à formulação de referência Pantozol tanto quanto para a velocidade quanto para a extensão de absorção.

The aim of this study was to evaluate, on human volunteers, the performance of one Pantoprazol tablet formulation (Pantoprazol[®], tablets, 40mg, by Merck, Brazil) against one standard Pantoprazol tablet formulation (Pantozol[®], tablets, 40mg, by Byk Quimica, Brazil).

Twenty four healthy male and female volunteers, as assessed by clinical and laboratory test evaluations, were enrolled in the study. The study was a single dose, two way randomized crossover design comparing one Pantoprazol tablet formulation, (Pantoprazol[®], tablets, 40mg, from Merck) to another Pantoprazol tablet formulation (Pantozol[®], tablets, 40mg, from Byk Quimica). Two volunteers (Vols. 16 and 17) dropped out during the study due to personal reasons.

Plasma samples for determination of Pantoprazol were obtained pre-dose and at frequent intervals for up to 12 hours post-dose. Pantoprazol plasma concentrations were quantified by a validated method employing high-pressure liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS-MS).

The subjects were monitored throughout the study.

Systolic and diastolic blood pressure and pulse rate measurement were taken pre-dose and at intervals up to 12h.

Tolerance of both products was good. One volunteer (Vol. 15) during the first confinement had severe urticaria during the first confinement and facial eritema during the first and second confinement, whose symptom relation to the formulation is unknown. He has been treated with betamethasone during the first confinement.

The maximum concentration reached ($C_{\max}$) and the Areas Under the Curve (AUC_{0-12h}) were compared.

Pantoprazol® 40mg tablets formulation $C_{\max}$ geometric mean ratio was 99.8% (90% CI= 88.2 – 112.8) of Pantozol®. Pantoprazol® 40mg

1. tablets formulation $AUC_{(0-12h)}$ geometric mean ratio was 105.5% (90% CI= 95.2 – 116.8) of Pantozol®.
2. Since the 90% CI for both $C_{\max}$ and AUC ratio where inside the 80-125% interval proposed by the *Food and Drug Administration*, it is concluded that Pantoprazol® 40mg tablets is bioequivalent to Pantozol® 40mg tablets for both the rate and the extent of absorption.

Referências Bibliográficas

AARONS, L.; TOON, S. *et al.* Validation of assay methodology used in pharmacokinetic studies. ***J Pharmacol. Methods* 17: 337 – 346, 1987.**

AARONS, L. ***Analyst* 106: 1249 – 1254, 1981.**

ADAMEK, R.J.; SZYMANSKI, C.; PFAFFENBACH, B., *et al.*: Kurzzeit-Tripel-Therapie mit Pantoprazol, Clarithromycin und Metronidazol zur Heilung der Helicobacter-pylori-Infektion. ***Dtsch Med Wochenschr.* 120:358-360, 1995.**

ADAMOVICS JA. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. ***Chromatographic Sciences Series N° 52, Marcel Dekker, New York, 1990.***

ADEC: Australian Drug Evaluation Committee: Medicines in Pregnancy - An Australian Categorisation of Risk of Drug Use in Pregnancy, 3rd ed. ***Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia, 1996.***

ANDERSON, R.L. ***Practical Statistics for Analytical Chemists, Van Nostrand, New York, 1987.***

ANDERSSON, T.: Pharmacokinetics, metabolism and interactions of acid pump inhibitors: focus on omeprazole, lansoprazole, and pantoprazole. ***Clin Pharmacokinet.* 31:9-28, 1996.**

ANDERSSON, T. Omeprazole drug interaction studies. ***Clin. Pharmacokinet.* 21: 195 – 212, 1991.**

ARNOLD, R. Safety of proton pump inhibitors – an overview. ***Aliment. Pharmacol. Ther.* 8(suppl1) 65 – 70, 1994.**

ARNOUX, P. AND MORRISON, R. Drug analysis of biological samples. A survey of validation approaches in chromatography in the UK pharmaceutical industry. ***Xenobiotica* 22(7): 757 – 764, 1992.**

ATHMANN, C.; MANDER, I.; BRUNNER, G. *et al.* Histology and safety parameters during long-term maintenance pantoprazole in severe acid-peptic disease. ***Gastroenterol.* 114(4): G, 1998.**

BARRIENTOS-ASTIGARRAGA, R.E.; VANNUCHI, Y.B. *et al.* Quantification of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence studies. ***J. Mass Spectrom.* 36: 1281-1286, 2001.**

BASSON, R.P.; CERIMELE, B.J; DESANTE, K.A.; HOWEY, D.C. T_{max} : An unconfound metric for rate of absorption in single dose bioequivalence studies. In: "Bio International: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics," International Conference of F.I.P. "Bio-International 96" held in Tokyo, Japan, april 22-24. ***Midha & Nagai.* pp.90-93, 1996.**

BEIL, W.; STAAR, U. & SEWING, K-F: Pantoprazole: a novel H⁺/K⁺-ATPase inhibitor with an improved pH stability. ***Eur. J. Pharmacol.* 218:265-271, 1992.**

BEKER, J.A.; PORRO, G.B.; BIGARD, M.A. *et al.* ***Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 7: 407 – 410, 1995.**

BELL, N.J.V.; BURGET, D.; HOWDEN, C.W. *et al. Digestion* 51: 59 – 67, 1992.

BENET, L.Z. & ZECH, K. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 8(suppl 1): 25 – 32, 1994

BIANCHI PORRO, G.; PARENTE, F. *et al. Gut.* 31: 397 – 400, 1990.

BLACK, J.W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, C.J.; GANELLIN, C.R. *et al. Nature* 236: 385 – 390, 1972.

BLIESATH, H.; HUBER, R.; HARTMANN, M.; LÜHMANN, R. AND WURST, W. Dose Linearity of the pharmacokinetics of the new H⁺/ K⁺ ATPase inhibitor pantoprazole after single intravenous administration. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 32(1): 44-50 / 34 Suppl (1): S18-S24, 1996.

BLIESATH, H.; HUBER, R.; HARTMANN, M.; LÜHMANN, R. AND WURST, W. *Clin. Drug. Invest.* 9(2): 72 – 78, 1995.

BLIESATH, H.; HUBER, R.; HARTMANN, M.; LÜHMANN, R. AND WURST, W. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 32(1): 44 – 50, 1994.

BLIESATH, H.; HUBER, R.; STEINIJANS, V.W.; KOCH, H.J.; KUNZ, K.; WURST, W. Pantoprazole does not interact with nifedipine in man under steady-state conditions. *Int J Clin Pharmacol. Ther.* 34(5)(1): 81-85, 1996.

BLIESATH, H.; HUBER, R.; STEINIJANS, V.W.; KOCH, H.J.; WURST, W.; MASCHER, H. Lack of pharmacokinetic interaction between pantoprazole and diclofenac. *Int J Clin Pharmacol Ther* 34(5)(1): 76-80, 1996.

BRAGGIO, S.; BARNABY, R.J.; GROSSI, P.; CUGOLA, M. A strategy for validation of bioanalytical methods. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 14: 375-88, 1996.

BRESSOLLE, F.; BRES, J. AND MOULIN, A. High-performance liquid chromatographic determination of 4-amino-5-chloro- N- [(1-ethylimidazol-2-yl) methyl] -2- methoxybenzamide and its metabolite in biological fluids, applications in pharmacokinetics studies. **J. Pharm. Sci.** 79: 534, 1990.

BREUEL, H.P.; HARTMANN, M.; BONDY, S. *et al.* Pantoprazole in the elderly: no dose-adjustment [abstract]. **Gut.** 35 Suppl (4): 77, 1994.

BRITAIN, H.G. Validação de Métodos Analíticos não Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology** 2 (3): 4 – 9, 1998.

BROOKS, M.A. AND WEINFELD, R.E. A validation process for data from the analysis of drugs in biological fluids. **Dug. Dev. Ind. Pharm.** 11: 1703 – 1728, 1985.

BRUNNER, G.; CHANG, J.; HARTMANN, M. *et al.* Pharmakokinetik von Pantoprazole bei Patienten mit Leberzirrhose. **Med. Klin.** 89 Suppl (1): 189, 1994.

BRUINS, A.P. Liquid chromatography – mass spectrometry with ionspray and electrospray interfaces in pharmaceutical and biomedical research. **J. Chromatogr.** 554: 38 – 46, 1991a.

BRUINS, A.P. Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry. II. Applications in pharmacy, biochemistry and general chemistry. ***Trends Anal. Chem.* 3: 81 – 90, 1994a.**

BRUNNER, G.; HARTMANN, M.; CHANG, J. *et al.* ***Med. Klinik.* 89(suppl 1): 189, 1994.**

BUICK, A.R.; DOING, M.V.; SEAL, S.C. *et al.* Method Validation in the bioanalytical laboratory. ***J. Pharm. Biomed. Anal* 8: 629 – 637, 1990.**

BURGET, D.W.; CHIVERTON, S.G. *et al.* ***Gastroenterology* 99: 345 – 351, 1990.**

BURROWS, J.L. ***J.Pharm. Biomed. Anal.* 11: 523 – 531, 1993.**

CARR, G.P. AND WAHLICH, J.C. A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis. ***J. Pharm. Biomed. Anal.* 8: 613 – 618, 1990.**

CARTWRIGHT, A.C; GUNDERT-REMY, V.; ROUWS, G. *et al.* International harmonization and consensus DIA meeting on bioavailability and bioequivalence testing requirements and standards. ***Drug Information Journal* 25: 471 – 482, 1991.**

CAUSEY, A.C.; HILL, H.M. *et al.* Evaluation criteria for the acceptance of bioanalytical data. ***J. Pharm. Biomed. Anal.* 8: 625, 1990.**

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis – Viewpoint and discussion. ***J. Chromatography B* 689: 175 – 180, 1997**

CEDERBERG, C.; RÖHSS, K.; LUNDBORG, P. *et al.* **Scand. J. Gastroenterol.** 28: 179 – 184, 1993.

CLASSEN, M. & DELLA FAVE, G. Management of acid-related diseases: Focus on pantoprazole. **Aliment Pharmacol. Ther.** 8(suppl1): 1 – 70, 1994.

COMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS. **Note for Guidance Validation of Analytical procedures III/5626/94 – final, 1994.**

COVEY, T.R.; LEE, E.D.; BRUINS, A.P. *et al.* Liquid chromatography – mass spectrometry. **Anal. Chem.** 58: 1451A – 52A, 1986.

CREMER, M.; LAMBERT, R.; LAMERS, C.B.H. *et al.* A double-blind study of pantoprazole and ranitidine in treatment of acute duodenal ulcer. A multicenter trial. **Dig. Dis. Sci.** 40: 1360 – 4, 1995.

DADGAR, D.; BURNETT, P. *et al.* Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 13(2): 89 – 97, 1995.

DADGAR, D. AND BURNETT, P. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 14: 23 – 31, 1995.

DADGAR, D. AND SMITH, M.R. Validation of chromatographic methods of analysis of drugs in biological samples. **Trends in Analytical Chemistry** 5: 115 – 117, 1986.

DALLA, G.E.; WILKINSON, L. An analytical approximation to the distribution of Lilliefors's test statistic for normality. ***Am. Statistician* 40: 294-296, 1986.**

DE OLIVEIRA, C.H.; BARRIENTOS-ASTIGARRAGA, R.E. *et. al.* Terbinafine Quantification in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry: Application to a Bioequivalence Study. ***Therapeutic Drug Monitoring* 23: 709-716, 2001.**

DE MEY, C.; MEINEKE, I.; STEINIJANS, V.W.; HUBER, R.; HARTMANN, M.; BLIESATH, H.; WURST, H.: Pantoprazole lacks interaction with antipyrine in man, either by inhibition or induction. ***Int J Clin Pharmacol Ther* 34(5)(1): 58-66, 1996.**

DE MEY, C.; MEINEKE, I.; STEINIJANS, V.W.; HUBER, R.; HARTMANN, M.; BLIESATH, H.; WURST, H.: Pantoprazole lacks interaction with antipyrine in man, either by inhibition or induction. ***Int J Clin Pharmacol Ther* 32: 98 - 106, 1994.**

DICKINS, M. & BRIDGES, J.W. The relationship between the binding of 2-n-alkylbenzimidazoles to rat hepatic microsomal cytochrome P-450 and the inhibition of monooxygenation. ***Biochem. Pharmacol.* 31: 1315 – 20, 1982.**

DIGHE, S.V. AND ADAMS, W.P. In Pharmaceutical Bioequivalence. ***Marcel Dekker, New York*, pp. 347, 1991.**

DOIG, M.V. AND JONES, A.E. Analysis of Drugs and Metabolites Including Anti-infective Agents. ***Royal Society of Chemistry , Reid E and Wilson ID Eds., Cambridge*, pp. 157 – 162, 1990.**

DOYLE, E.; MC DOWALL, R.D.; MURKITT, G.S.; PICOT, V.S. AND ROGERS, S.J. Two systems for the automated analysis of drugs in biological fluids using high –performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. 527: 67-77, 1990.**

DOYLE, E.; HUBER, R. AND PICOT, V.S. Direct injection / h.p.l.c methods for the analysis of drugs in biological samples. **Xenobiotica 22(7): 765-774, 1992.**

DUURSEMA, L.; MÜLLER, F.O.; SCHALL, R. *et al.* Lack of pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of warfarin. **Br. J. Clin. Pharmacol. 39: 700 – 3, 1995.**

ENDRENYI, L.; FRISTSCH, S.; YAN, W. C_{max}/AUC is a clearer measure than C_{max} for absorption rates investigations of bioequivalence. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 29: 394-399, 1991.**

EHRlich, A.; FUDER, H.; HARTMANN, M. *et.al.* Lack of pharmacodynamic and pharmacokinetic interaction between pantoprazole and phenprocoumon in man. **Eur. J. Clin. Pharmacol. 51: 277-281, 1996.**

EHRlich, A.; FUDER, H.; HARTMANN, M. *et.al.* Pantoprazole lacks pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction with phenprocoumon in man. **Gut. 37 (suppl 2): 1133, 1995.**

FACHINFORMATION: Pantozol (R), pantoprazole. **Byk-Gulden, Konstanz, 1995.**

FELLENius, E.; BERGLINDH, T.; SACHS, G. *et al.* **Nature 290: 159 – 161, 1981**

- FERRON *et al.* Lack of Pharmacokinetics Interaction between Oral Pantoprazole and Cisapride in Healthy Adults. *J. Cli. Pharmacol.* 39: 945-950, 1999.
- FIGALA, V.; KLEMM, K.; KOHL, B.; KRÜGER, U. *et al.* *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 124 – 127, 1986.
- FITTON, A. AND WISEMAN, L. A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Acid-Related Disorders. *Drugs* 51(3): 460-482, 1996.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION . In vivo bioequivalence guidances. *Pharmacopeial Forum* 19: 6501-6508, 1993.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION . Bioavailability and Bioequivalence Requiriments. *Federal Register* part 320: 154-173, 1985.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. *Guidance for Industry- final draft*, 1998.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. *Guidance for Industry –final draft*, 2001.
- GAFFNEY, M. Variance components in comparactive bioavailability studies. *J. Pharm. Sci.* 81: 315, 1992
- GANSER, A.L. & FORTE, J.G. *Biochim. Biophys. Acta* 307: 169 – 180, 1973.

GELPI, E. Bioanalytical Aspects on Method Validation. *Life Sciences* 41: 849 – 852, 1987.

GOLGI, C. *Arch. Ital. Biol.* 19: 448 – 453, 1893.

GREENE, W. Drug interactions involving cimetidine – mechanisms, documentation, implications. *Drug Metabol. Drug Interact* 5: 25 – 51, 1984

GUGLER, R.; HARTMANN, M.; RUDI, J. *et al.* Lack of pharmacokinetic interaction of pantoprazole with diazepam in man. *Br J Clin Pharmacol* 42:249-252, 1996.

GUGLER, R.; HARTMANN, M.; RUDI, J. *et al.* Lack of pharmacokinetic interaction of pantoprazole with diazepam in man. *Gastroenterol.* 102: A77, 1992.

GUGLER, R.; JENSEN, J.C. *Gastroenterol.* 89: 1235- 41, 1985.

GUGLER, R.; JENSEN, J.C. *Pharmac. Ther.* 33: 133 - 137, 1987.

HANAUER, G.; GRAF, U. *et al.* In vivo: cytochrome P-450 interactions of the newly developed H⁺/ K⁺ ATPase inhibitor pantoprazole (BY 1023/SK&F 96022) compared to other antiulcer drugs. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 13: 63 – 7, 1991.

HARTMANN, M.; THEISS, U.; BLIESATH, H. *et al.* *Gastroenterol.* 104(suppl 4): A 95, 1993 (b).

HARTMANN, M.; HUBER, R.; BLIESATH, H. *et al.* Lack of interaction between pantoprazole and digoxin at therapeutic doses in man. In: Management of acid – related diseases: Focus on pantoprazole. **Congress Abstract, Charité, Berlin, pp. 34 – 35, 1993.**

HARTMANN, M.; BLIESATH, H.; ZECH, K. *et al.* Lack of induction of CYP1A2 activity in man by pantoprazole [abstract]. **Gut. 37(suppl 2): 363, 1995.**

HARTMANN, M.; BLIESATH, H.; HUBER, R. *et al.* Lack of influence of antacids on the pharmacokinetics of the new gastric H⁺/ K⁺ ATPase inhibitor pantoprazole. **Gastroenterol. 106 (suppl): A91, 1994.**

HARTMANN, M.; HUBER, R.; BLIESATH, H.; STEINIJANS, V.W.; KOCH, H.J.; WURST, W.; KUNZ, K. Lack of interaction between pantoprazole and digoxin at therapeutic doses in man. **Int J Clin Pharmacol Ther 34(5)(1): 67-71, 1996.**

HARTMANN, M.; HUBER, R.; BLIESATH, H.; STEINIJANS, V.W.; KOCH, H.J.; WURST, W.; KUNZ, K. Lack of interaction between pantoprazole and digoxin at therapeutic doses in man. **Int J Clin Pharmacol Ther 33: 481- 5, 1995.**

HARTMANN, C. **Analisis 22: M19 – M21, 1994.**

HARTMANN, C.; MASSART, D.L.; MC DOWALL, R.D. *et al.* An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. **J. Pharm. Biomed. Anal. 12(11): 1337 – 1343, 1994.**

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J. *et al.* Validation of Bioanalytical chromatographic methods. **J. Pharm. Biomed. Anal. 17: 193 – 218, 1998.**

HARTMANN, C.; PENNINGCKX, W.; VANDER HEYDEN, Y.; VANKEERBERGHEN, P. *et al.* Bio – International 2. **Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart**, pp. 331 – 346, 1995.

HATLEBAKK, J.G. & BERSTAD, A.: Pharmacokinetic optimisation in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease. **Clin Pharmacokinet** 31:386-406, 1996.

HAUSCHKE, D.; STEINIJANS, V.M.; DILETTI, E. A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.** 28: 72-78, 1990.

HILL, H.M.; CAUSEY, A.G.; LESSARD, D. *et al.* Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis, vol 22. **Royal Society of Chemistry** , pp. 111 – 118, 1992.

HOOPER, J.W.; BLUME, H.H.; MIDHA, K.K. *et al.* Biointernational 2. **Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart**, pp. 347 – 355, 1995.

HOTZ, J.; PLEIN, K.; SCHÖNEKÄS, H. *et al.* **Scand. J. Gastroenterol.** 30: 111 – 115, 1995.

HOWDEN, C.W. & HUNT, R.H. **Aliment. Pharmacol. Ther.** 4: 25 – 33, 1990.

HUANG, H.C.; WACHS, T.; CONBOY, J.J.; HENION, J.D. The quantification of drugs in biological matrices by LC/MS/MS is becoming more usual, improving sensitivity and selectivity of methods. **Anal. Chem.** 62(13): 713, 1990.

HUBER, R. AND MÜLLER, W. High-performance liquid chromatographic determination of the H⁺/ K⁺ ATPase inhibitor (BY 1023/SK&F 96 022) and its sulphone metabolite in serum or plasma by direct injection and fully automated pre-column sample clean-up. **J. Chromatogr. 529: 389-401, 1990.**

HUBER, R.; HARTMANN, M.; BLIESATH, H.; LÜHMANN, R.; STEINIJANS, V.W.; ZECH, K. Pharmacokinetics of pantoprazole in man. **Int J Clin Pharmacol Ther 34(5): 185-194, 1996 (a).**

HUBER, R.; HARTMANN, M.; BLIESATH, H.; LÜHMANN, R.; STEINIJANS, V.W.; ZECH, K. Pharmacokinetics of pantoprazole in man. **Int J Clin Pharmacol Ther 34(suppl 1): S7 - S16, 1996.**

HUBER, R.; HARTMANN, M.; BLIESATH, H.; LÜHMANN, R.; STEINIJANS, V.W.; ZECH, K. Pharmacokinetics of pantoprazole in man. **Int J Clin Pharmacol Ther 34(5)(1): 7-16, 1996.**

HUBER, R.; KOHL, B.; SACHS, G.; SENN BILFINGER, J.; SIMON, W.A.; STURM, E. Review article: the continuing development of proton pump inhibitors with particular reference to pantoprazole. **Aliment Pharmacol Ther 9(4): 363-78, 1995.**

INMAN, E.L.; FRISHMANN, J.K. *et al.* General meted validation guidelines for pharmaceutical samples. **J. Pharm. Sci. 25: 252 – 256, 1987.**

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Guideline for Validation of Analytical Procedures: Methodology – final draft, 1996**

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Accuracy (trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. **ISO/DIS 5725-1 to 5725-3, Geneve, 1994.**

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Accuracy (trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. **ISO/DIS 5725-1 to 5725-3- Drafts versions, 1990-1991.**

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Guideline for Validation of Analytical Procedures: Methodology – final draft, **1996.**

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis, II. ***Anal. Chemistry* 48: 2294 – 2296, 1976.**

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. ***Compendium of Analytical Nomenclature, Pergamon, Oxford, pp. 117, 1976.***

JACKSON, J.A. Analytical Aspects of Bioequivalency Testing. ***Generics and Bioequivalence, CRC Press Inc. Florida. pp 69- 86, 1994***

JASPERSEN, D.; DIEHL, K-L; SCHOEPPNER, H. *et al.* A comparison of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole in the maintenance treatment of severe reflux oesophagitis. ***Aliment Pharmacol Ther* 12:49-52, 1998.**

JOHNSON, E.L.; REYNOLDS, D.L.; WRIGHT, D.S. *et al.* Biological sample preparation and data reduction concepts in pharmaceutical analysis. ***J. Chromtogr. Sci.* 26: 372 – 379, 1988.**

JOHNSON, D.A.; JANKOWSKI, J.; PENSTON, J.G. *et al.* **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.** 1: 187 – 191, 1989.

JUDMAIER, G.; KOELZ, H.R. *et al.* Comparision of pantoprazole and ranitidine in the treatment of acute duodenal ulcer. **Aliment Pharmacol. Ther.** 8: 81 – 86, 1994.

KARNES, H.T.; SHIU, G.; SHAN, V.P. Rewiew: Validation of Bioanalytical Methods. **Pharmaceutical Research** 8(4): 421-426, 1991.

KARNES, H.T. AND MARCH, C. Calibration and validation of linearity in chromatographic biopharmaceutical analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal** 9 (10-12): 911- 918, 1991.

KOHL, B.; STURM, E.; SENN-BILFINGER, J.; SIMON, W.A. *et al.* **J. Med. Chem.** 35: 1049 – 1057, 1992.

KROMER, W.; GOENNE, S.; RIEDEL, R. *et al.* Direct comparison between the ulcer-healing effects of two H⁺-K⁺- ATPase inhibitors, one M(1)-selective antimuscarinic and one H(2) receptor antagonist in the rat. **Pharmacology** 41:333-337, 1990b.

KROMER, W., POSTIUS, S.; RIEDEL, R. *et al.* BY 1023/SK&F 96022 INN pantoprazole, a novel gastric proton pump inhibitor, potently inhibits acid secretion but lacks relevant cytochrome P450 interactions. **J Pharmacol Exp Ther** 254:129-135, 1990(a).

- KROMER, W. Similarities and differences in the properties of substituted benzimidazoles: a comparison between pantoprazole and related compounds. ***Digestion* 56: 443 – 454, 1995.**
- KOOP, H.; SCHEPP, W.; DAMMANN, H.G. *et al.* Comparative trial pantoprazole and ranitidine in the treatment of reflux esophagitis: results of a German multicenter study. ***J. Clin. Gastroenterol.* 20: 192 – 5, 1995.**
- LIND, T.; CEDERBERG, P.; EKENVED, G. *et al.* ***Gut.* 24: 270 – 276, 1983.**
- LINDBERG, P.; NORDBERG, P.; ALMINGER, T. *et al.* ***J. Med. Chem.* 29(18): 1327 – 1329, 1986.**
- LINS, R.L.; DE CLERCQ, I.; HARTMANN, M. *et al.* Pharmacokinetics of the proton pump inhibitor pantoprazole in patients with several renal impaired [abstract]. ***Gastroenterology* 106: 126, 1994.**
- LONDONG, W. ***Aliment. Pharmacol. Ther.* 8(suppl 1) 39 – 46, 1994.**
- MACDOUGLAS, D. AND CRUMMET, W. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. ***Analytical Chemistry* 52: 2242 – 2249, 1980.**
- MARTINS, M.L.; PIEROSSO, M.A.; MORAES, L.A.; RIBEIRO, W. *et al.* Comparative bioavailability of two atenolol tablet formulations in healthy male volunteers after a single dose administration. ***Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 35(8): 324-328, 1997.**

MARZO, A. Bioequivalence. An updated reappraisal to applications of interchangeable multi-source pharmaceutical products. **Arzneim-Forsch. Drug Res.** 45: 109-15, 1995.

MASSART, D.L.; HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MCDOWALL, R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 17: 193 – 218, 1998.

MASSART, D.L.; ANDEGINSTE, B.G.M.; DEMING, S.N. *et al.* In Chemometrics Textbook. **Elsevier, New York, 1988**

MAUCH, F.; BODE, G. *et al.* Identification and characterization of an ATP-ase system of *Helicobacter pylori* and the effect of proton pump inhibitors [letter]. **Am. J. Gastroenterol.** 88: 1801 – 102, 1993.

MCCOLL, K.E.L.; EL NUJUMI, A.M.; DORRIAN, C.A. *et al.* Helicobacter pylori and hypergastrinaemia during proton pump inhibitor therapy. **Scand J Gastroenterol** 27:93-98, 1992.

MEARS, J.M. & KAPLAN, B.: Proton pumps inhibitors: new drugs and indications. **Am Fam Physician** 53: 285 - 292, 1996.

MENTHA, A.C. The validation criteria for analytical methods used in pharmacy practice research. **J. Clin. Pharm. Ther.** 14(6): 465 – 473, 1989.

MENTHA, A.C. Drug determination in biological fluids: a approaches to method validation. **Talanta** 34: 609 – 613, 1987.

MENTHA, A.C. Therapeutic monitoring of free (unbound) drug levels: analytical aspects. ***Trends in Analytical Chemistry* 8: 107 – 112, 1989.**

MENTHA, A.C. Trace Measurement. ***Laboratory Practice* 38: 29 – 30, 1989.**

MIDHA, K.K.; MCKAY, G.; CHAKRABORTY, B.S. *et al.* Bioequivalence of two thiorazine tablet formulations using radioimmunoassay and gas chromatographic-mass spectrometric methods. ***J. Pharm. Sci.* 79: 196, 1990.**

MIDDLE, M.V.; MÜLLER, F.O.; SCHALL, R.; GROENEWOUD, G.; HUNDT, H.K.L.; HUBER, R.; BLESATH, H.; SETINIJANS, V.W. No influence of pantoprazole on the pharmacokinetics of phenytoin. ***Int J Clin Pharmacol Ther* 34(5)(1): 72-75, 1996.**

MIDDLE, M.V.; MÜLLER, F.O.; SCHALL, R. *et al.* Effect of pantoprazole on ovulation suppression by a low-dose hormonal contraceptive. ***Clin. Drug Invest.* 9: 54 – 6, 1995**

MILLER, J.C. AND MILLER, J.N. ***Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1988.**

MILLER, J.N. Matrix and sensitivity constraints in trace organics analysis. ***Analytical Proceedings* 19: 114 – 117, 1982.**

MOESSNER, J.; HOELSCHER, A.H.; HERZ, R. *et al.* A double-blind study of pantoprazole and omeprazole in the treatment of reflux oesophagitis: a multicentre trial. ***Aliment Pharmacol Ther* 9:321- 326, 1995.**

MODLIN, I.M. & SACHS, G. Inhibition of the gastric acid pump. *In: Acid related diseases. Biology and treatment*, Schnetztor – Verlag GmbH Konstanz, pp. 126 – 45, 1998.

MOHAMED, A.H. & HUNT, R.H. The rationale of acid suppression in the treatment of acid-related diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 8(suppl 1): 3 – 10, 1994.

MORAES, L.A.; LERNER, F.E.; MORAES, M.E.; MORAES, M.O.; CORSO, G.; DE NUCCI, G. Fluconazole Bioequivalence Study: Quantification by Tandem Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring* 21: 200-207, 1999.

MUCK, W. Quantitative analysis of pharmacokinetic study samples by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Pharmazie* 54: 639 – 45, 1999.

MÜLLER, P.; DAMMANN, H.G.; LEUCHT, U. *et al.* *Aliment. Pharmacol. Ther.* 3: 193 – 198, 1989.

MÜLLER, P.; SIMON, B.; KHALIL, H. *et al.* Dose-range finding study with the proton pump inhibitor pantoprazole in acute duodenal ulcer patients. *Z Gastroenterol* 30:771-775, 1992.

MUSCARÁ, M.N.; DE NUCCI, G. Comparative bioavailability of single doses of tablet formulations of cetirizine dihydrochloride in healthy male volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 33: 27-31, 1995.

MÜSSIG, S. & WITZEL, L. *Gastroenterology* 104(suppl 4): A 154, 1993.

PACHLA, L.A.; WRIGHT, D.S. *et al.* Bioanalytical considerations for pharmacokinetics and biopharmaceutic studies. ***J. Clin. Pharmacol.* 26: 332 – 335, 1986.**

PARSONS, M.E. Pantoprazole, a new proton-inhibitor, has a precise and predicable profile of activity. ***Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8(suppl 1): S15 – S20, 1996.**

PEDERSEN, P.L.; CARAFOLI, E. *et al.* Ion motive ATPases. 1. Ubiquity. Properties and significance to cell function. ***Trends Biologi. Sci.* 12: 146 – 50, 1987.**

PEETERS, P.A.M.; OOTERHUIS, B.; ZECH, K. *et al.* Pantoprazole pharmacokinetics and metabolism after oral and intravenous administration of ¹⁴C labeled pantoprazole to young healthy male volunteers [abstract]. ***Pharm. World. Sci.* Dec 17 15 Suppl: L-L7, 1993.**

PEETERS, P.A.M.; OOTERHUIS, B.; TAMMINGA, W.J. *et al.* Pharmacokinetics and metabolite profile of pantoprazole after single oral and intravenous administration of a ¹⁴C labelled dose in man. ***Clin. Pharmacokinet* 9 submitted), 1995.**

PENNINCKX, W.; HARTMANN, A. ; MASSART, D.L. *et al.* ***J. At. Spectrom.* 11: 237 – 246, 1996.**

PRODUKT MONOGRAPHIE: Pantozol(R), pantoprazole. ***Byk Gulden Pharmazeutika, Konstanz, 1994.***

PUE, M.A.; LAROCHE, J.; MEINEKE, I. AND DE MEY, C. Pharmacokinetics of pantoprazole following single intravenous and oral administration to healthy male subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **44** (6): 575-578, 1993.

RAMIREZ-BARBA, E.J.; DI SILVIO, M. *et al.* Superiority of 20 mg pantoprazole versus 150 mg x 2 ranitidine in healing and symptom relief of patients with mild reflux esophagitis. *Gastroenterol.* **114**(4): G 1085, 1998.

REILL, L.; ERHARDT, F.; FISCHER, R. *et al.* *Gut.* **34**(4): F 251, 1993(a).

REILL, L.; ERHARDT, F.; FISCHER, R. *et al.* *Gastroenterol.* **104** (4): A 177, 1993(b).

REILL, L.; ERHARDT, F.; FISCHER, R. *et al.* Dose –response of pantoprazole 20, 40, 80 mg on 24 hours intragastric pH, serum pantoprazole and serum gastrin in man. *Gastroenterol* **106** (suppl 1): A 165, 1994.

RUTLEDGE, D.R. AND GARRICK, C. Determination of metoprolol and its alpha-hydroxide metabolite in serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci* **27**: 561, 1989.

SACHS, G.; CHANG, H.H.; RABON, E. *et al.* *J.Biol. Chem.* **251**(23): 7690 – 7698, 1976.

SAKAIRI, M. & KAMBARA, H. Determination of drugs in human serum by liquid chromatography – atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Sci.* **4**: 199 – 201, 1988a.

SALMONSON, T. Current of BA/BE requirements for immediate release products in the EU. Abstract Proceedings from "Bio International: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics," *International Conference of F.I.P. "Bio-International 96"* Tokyo, Japan: **Business Center for Academic Societies; pp 16-19, 1997.**

SAVARINO, V.; MELA, G.S.; ZENTILIN, P. *et al.* ***Digestion* 48: 141 – 148, 1991.**

SCHEPP, W.; REHNER, W. *et al.* A review of treatment of duodenal and gastric ulcers – pantoprazole vs. omeprazole. ***Aliment Pharmacol. Ther.* 8(suppl 1): 53 – 57, 1994.**

SCHULZ, H.U.; HARTMANN, M.; STEINIJANS, V.W.; HUBER, R.; LÜHRMANN, B.; BLIESATH, H.; WURST, W. ***Int J Clin Pharmacol Ther Tox* 29(9): 369 - 75, 1991.**

SCHULZ, H.U.; HARTMANN, M.; STEINIJANS, V.W.; HUBER, R.; LÜHRMANN, B.; BLIESATH, H.; WURST, W. Lack of influence o pantoprazole on the disposition kinectis of theophylline in man. ***Int J Clin Pharmacol Ther* 34(5)(1): 51- 57, 1996.**

SENN-BILFINGER, J.; KRÜGER, U.; STURM, E.; FIGALA, V. *et al.* ***J.Org. Chem.* 52: 4582 – 4592, 1987.**

SHAMBUREK, R.D.; SCHUBERT, M.L. *et al.* ***Ballieres. Clin. Gastroenterol.* 7(1); 23 – 54, 1993.**

SHAN, V.P.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.V. *et al.* Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics Studies (Conference Report). ***Pharmaceutical Research* 9: 588-592, 1992.**

SHAN, V.P.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.V. *et al.* Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics Studies. ***Conference Report, Washington DC, 3-5 December 1990, 1991.***

SHAN, V.P.; MIDHA, K.K.; FINDLAY, J.W.A.; HILL, H.M. *et al.* Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. ***Pharmaceutical Research* 17 (12): 1551-1557, 2000.**

SHAN, V.P. Analytical methods used in bioavailability studies. A regulatory viewpoint. ***Clinical Research Practices and Drug Regulatory Affairs* 5: 51 – 60, 1987.**

SHARMA, B.K.; WALT, R.P.; POUNDER, R.E.; GOMES, M. DE F. A. *et al.* ***Gut*. 25: 957 – 964, 1984.**

SHIN, J.M.; BESANCON, M.; SIMON, A. *et al.* ***Biochim. Biophys. Acta*. 1148: 223 – 233, 1993.**

SHIN, J.M.; BESANCON, M.; PRINZ, C. *et al.* ***Aliment. Pharmacol. Ther.* 8(suppl 1): 11 – 23, 1994.**

SIMON, W.A.; KEELING, D.J.; LAING, S.M.; FALLOWFIELD, C.; TAYLOR, A.G. BY 1023/SK&F 96022: biochemistry of a novel (H⁺+ K⁺)- ATPase inhibitor. ***Biochem. Pharmacol.* 39: 1799-1086, 1990.**

SIMON, W.A.; BÜDINGER, H.F. *et al.* **Biochem. Pharmacol.** 42(2): 347 – 355, 1991.

SIMON, B.; MÜLLER, P.; HARTMANN, M. *et al.* Pentagastin-stimulated gastric acid secretion and pharmacokinetics following single and repeated intravenous administration of the gastric H⁺, K⁺ -ATPase-inhibitor pantoprazole (BY1023/SK&F96022) in healthy volunteers. **Z Gastroenterol** 28: 443- 447, 1990(b).

SIMON, B.; MÜLLER, P.; BLIESATH, H.; LÜHMANN, R.; HARTMANN, M.; HUBER, R.; WURST, W. Single intravenous administration of the H⁺, K⁺-ATPase inhibitor BY 1023 / SF&F 96022 – inhibitor pentagastrin – stimulated gastric acid secretion and pharmacokinetics in man. **Aliment. Pharmacol. Ther.** 4: 239-245,1990(a).

SIMON, B.; MÜLLER, P.; MARINIS, E. *et al.* Effect of repeated oral administration of BY 1023 SK&F 96022 – a new substituted benzimidazole derivative – on pentagastrin-stimulated gastric acid secretion and pharmacokinetics in man. **Aliment. Pharmacol. Ther.** 4: 373-379, 1990(c).

SIMON, B.; STURM, E.; KOHL, B. *et al.* **Arch. Pharmacol.** 343: A 295, 1991(a).

SKAUNIC, V.; HULEK, P. *et al.* Changes in kinetics of exogenous dyes in the ageing process. *In: Kitani (ed) Liver and ageing*, Elsevier, Amsterdam, pp. 115 – 130, 1978.

SNYDER, L.R.; GLAJCH, J.L. *et al.* Practical HPLC Method Development. **John Wiley & Sons, New York**, 1988.

SNYDER, L.R. AND KIRKLAND, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. **Wiley Interscience, New York, 1979.**

SOLCIA, E.; VILLANI, L.; LUNETTI, O. *et al.* Proton pump inhibitors enterochromafins cells and Helicobacter pylori gastritis. **Aliment Pharmacol Ther. Suppl 1: 25 – 88, 1997.**

STEINIJANS, V.W.; HARTMANN, M.; HUBER, R.; RADTKE, H.W. Lack of pharmacokinetic interaction as an equivalence problem. **Int J Clin Pharmacol Ther 34(5)(1): 25-30, 1996.**

STEINIJANS, V.W.; HUBER, R.; HARTMANN, M.; ZECH, K.; BLIESATH, H.; WURST, W.; RADTKE, H.M. Lack of pantoprazole drug interactions in man: an updated review. **Int J Clin Pharmacol Ther 34(5)(1): 31- 50, 1996.**

STEINIJANS, V.W.; HUBER, R.; HARTMANN, M.; ZECK, K. *et al.* **Inter. J.Clin. Pharmacol. Ther. 32(8): 385 – 399, 1994.**

STURM, E.; KRÜGER, U.; SENN-BILFINGER, J.; FIGALA, V. **J. Org. Chem. 52: 4573 – 4581, 1987.**

SUERBAUM, S.; LEYING, H.; KLEMM, K. *et al.* Antibacterial activity of pantoprazole and omeprazole against Helicobacter pylori. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis 10:92-93, 1991.**

SWARTZ, M.E. AND KRULL, I.S. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharmaceutical Tecnology 2 (3): 12 – 20, 1998.**

TANAKA, M. AND YAMAZAKI, H. Direct Determination of Pantoprazole Enantiomers in Human Serum by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Using a Cellulose-Based Chiral Stationary Phase and Column-Switching System as a Sample Cleanup Procedure. ***Anal. Chem.* 68: 1513-1513, 1996.**

TANAKA, M.; YAMAZAKI, H. AND HAKUSUI, H. Direct HPLC Separation of Enantiomers of Pantoprazole and Other Benzimidazole Sulfoxides Using Cellulose-Based Chiral Stationary Phases in Reversed-Phase mode. ***Chirality* 7: 612-615, 1995.**

TANAKA, M. *et al.* Stereoselective pharmacokinetics of pantoprazole, a proton pump inhibitor, is extensive and poor metabolizers of S-mephenytoin. ***Clin. Pharmacol. & Ther.* 69(3): 108-113, 2001.**

TAYLOR, J.K. Validation of analytical methods. ***Analytical Chemistry* 55: 601 – 608, 1983.**

TAYLOR, J.K. ***Quality Assurance of Chemical Measurements*, Lewis, Chelsea, Mich, 1987.**

TIMM, U.; WALL, M. AND DELL, D. A new Approach for Dealing with the Stability of Drugs in Biological Fluids. ***J. Pharm. Sci.* 74 (9): 972 – 977, 1985.**

TUCKER, G.T. The interaction of proton pump inhibitors with cytochromes P450. ***Aliment Pharmacol. Ther.* 8 Suppl (1): S33-S38, 1994.**

USP XXIII (UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, ROCKVILLE, MD, 1995).pp. 1982- 1984.

USP XXII (UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, ROCKVILLE, MD, 1990) **pp. 1710 – 1712.**

WALTER-SACK, I.E; BLIESATH, H.; STOTZER, F. *et al.* Lack of pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between pantoprazole and glibenclamide in humans. ***Clin Drug Invest* 15:253-260, 1998.**

WITZEL, L.; GUETZ, H.; HUETTEMANN, W. *et al.* Pantoprazole versus omeprazole in the treatment of acute gastric ulcers. ***Aliment Pharmacol Ther* 9:19-24, 1995.**

WYNNE, H.A.; GOUDEVENOS, J.; RAWLINS, M.D. *et al.* Hepatic drug clearance: the effect of age using indocyanine green as a model compound. ***Br. J. Clin. Pharmacol.* 30: 634 – 637, 1990.**

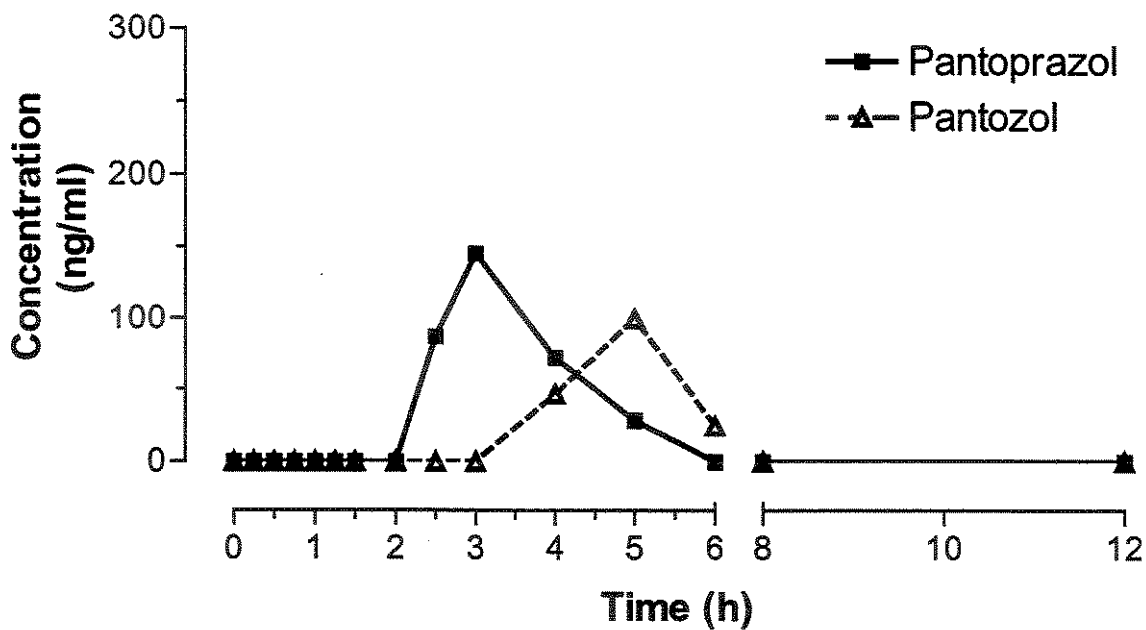
YODEN, W.J. AND STEINER, E.H. ***Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists, Washhington DC, 1975***

ZEEH, J.; PLATT, D. *et al.* ***Fortschr. Med.* 111(3): 33 – 36, 1193.**

Anexos I

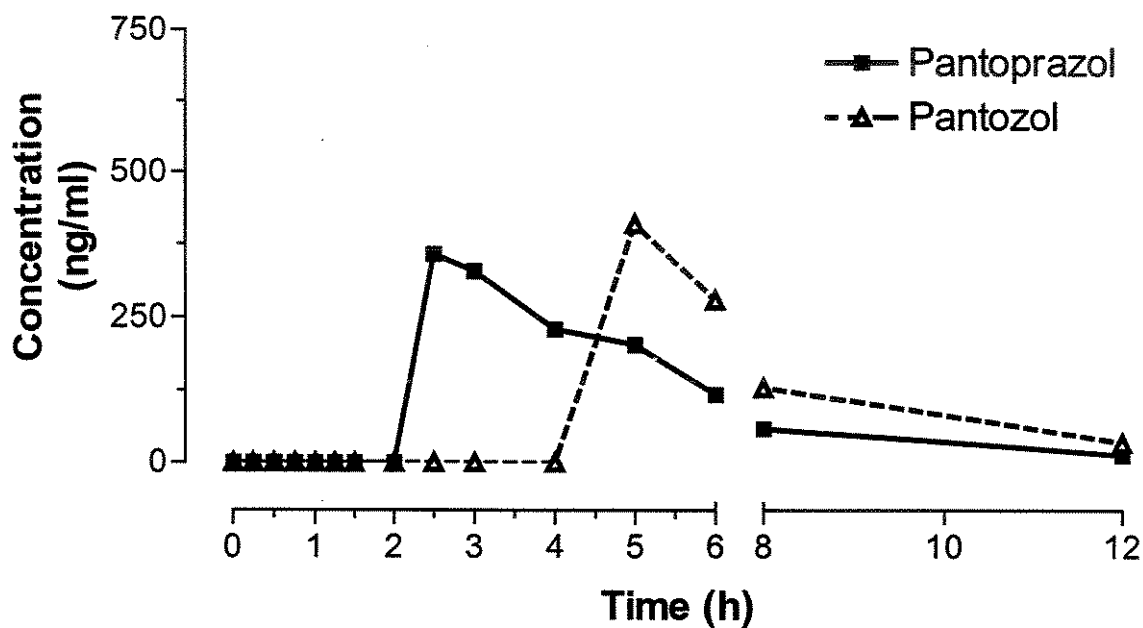
Curvas *individuais* de concentração plasmática de pantoprazol em função do tempo e parâmetros farmacocinéticos derivados.

Vol. I - MDY



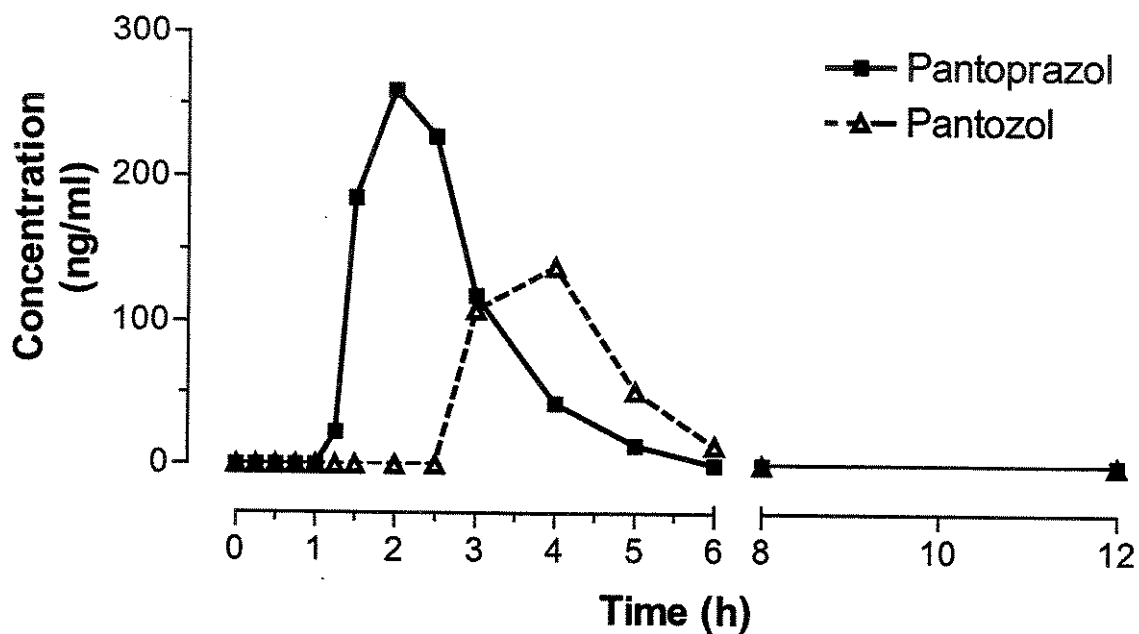
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	224	146
AUC Inf ([ng * h]/ml)	538	0
AUCall (0-12h) / Inf (%)	41.7	-
Cmax (ng/ml)	145	99
Tmax (h)	3.0	5.0
T _{1/2} (h)	3.4	0.0
Ke (1/h)	0.21	0.00

Vol. II - MG



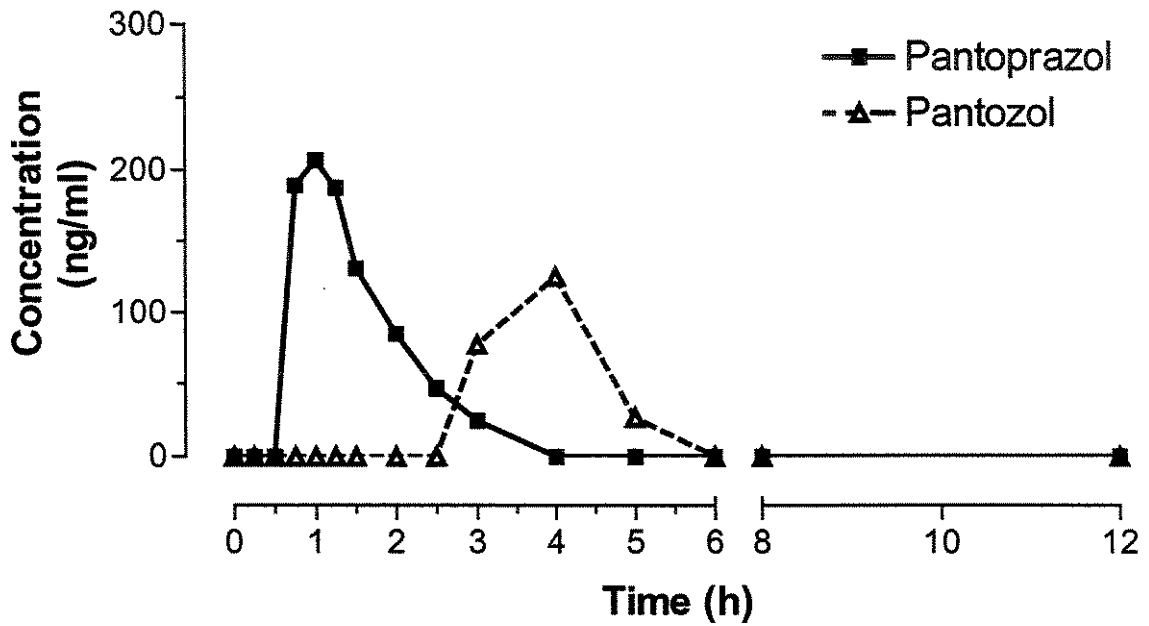
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1215	1290
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1277	1390
AUCall (0-12h) / Inf (%)	95.2	92.8
Cmax (ng/ml)	358	410
Tmax (h)	2.5	5.0
T _{1/2} (h)	2.1	2.0
Ke (1/h)	0.33	0.35

Vol. III - CRF



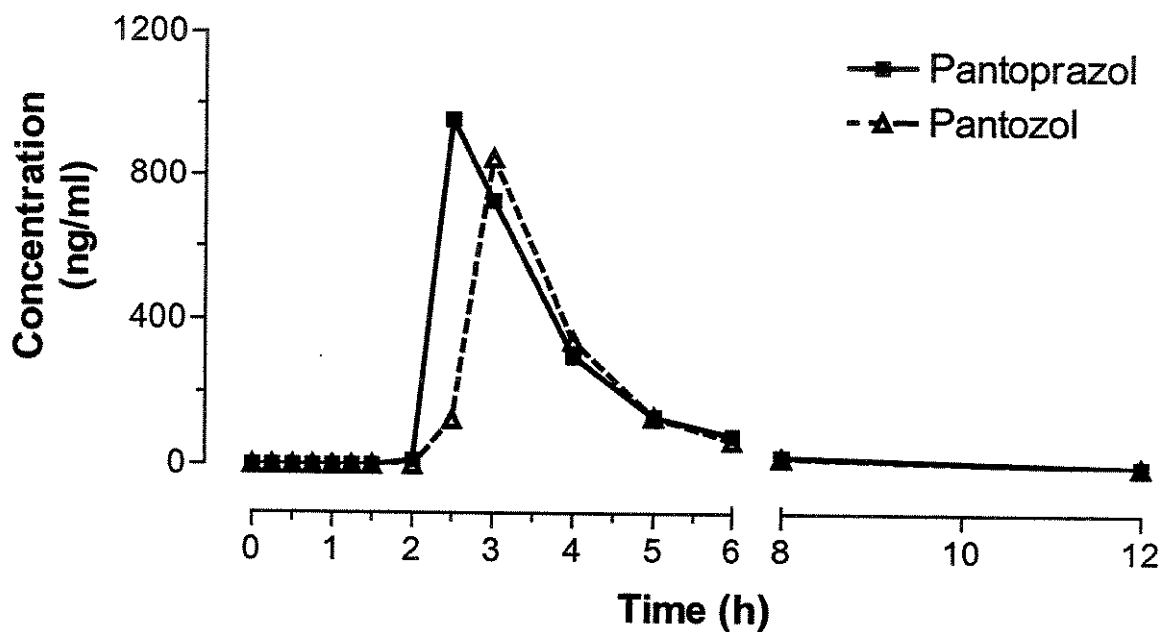
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	445	271
AUC Inf ([ng * h]/ml)	463	383
AUCall (0-12h) / Inf (%)	96.1	70.6
Cmax (ng/ml)	260	138
Tmax (h)	2.0	4.0
T _{1/2} (h)	0.6	1.9
Ke (1/h)	1.09	0.37

Vol. IV - ESBA



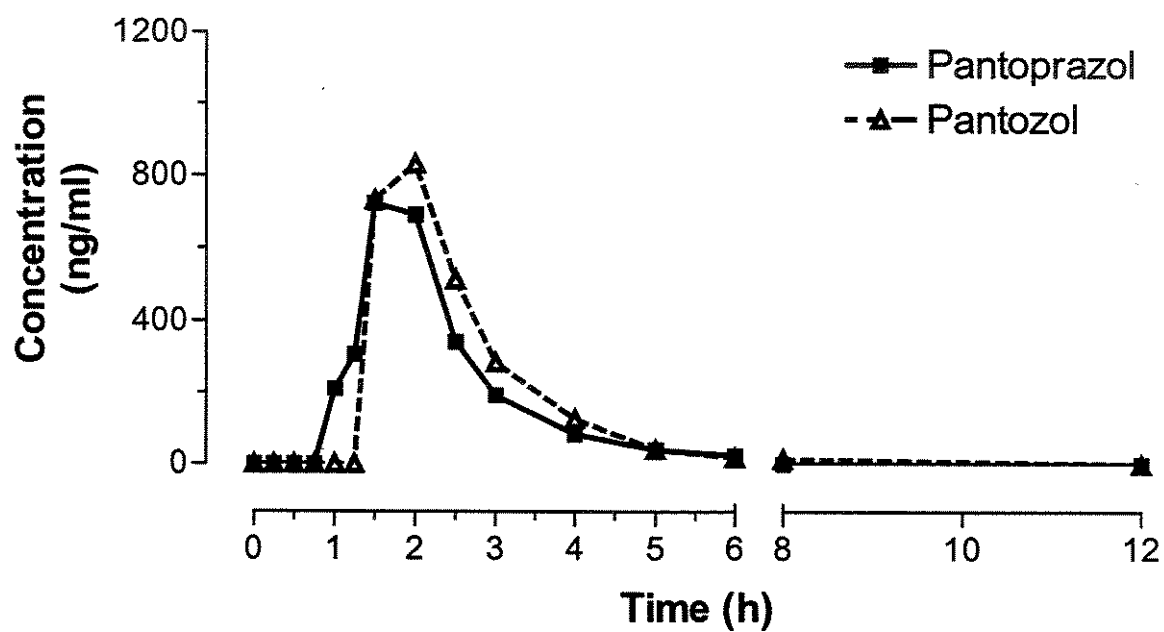
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	261	182
AUC Inf ([ng * h]/ml)	293	0
AUCall (0-12h) / Inf (%)	89.1	-
Cmax (ng/ml)	207	125
Tmax (h)	1.0	4.0
T _{1/2} (h)	0.6	0.0
Ke (1/h)	1.07	0.00

Vol. V - MVS



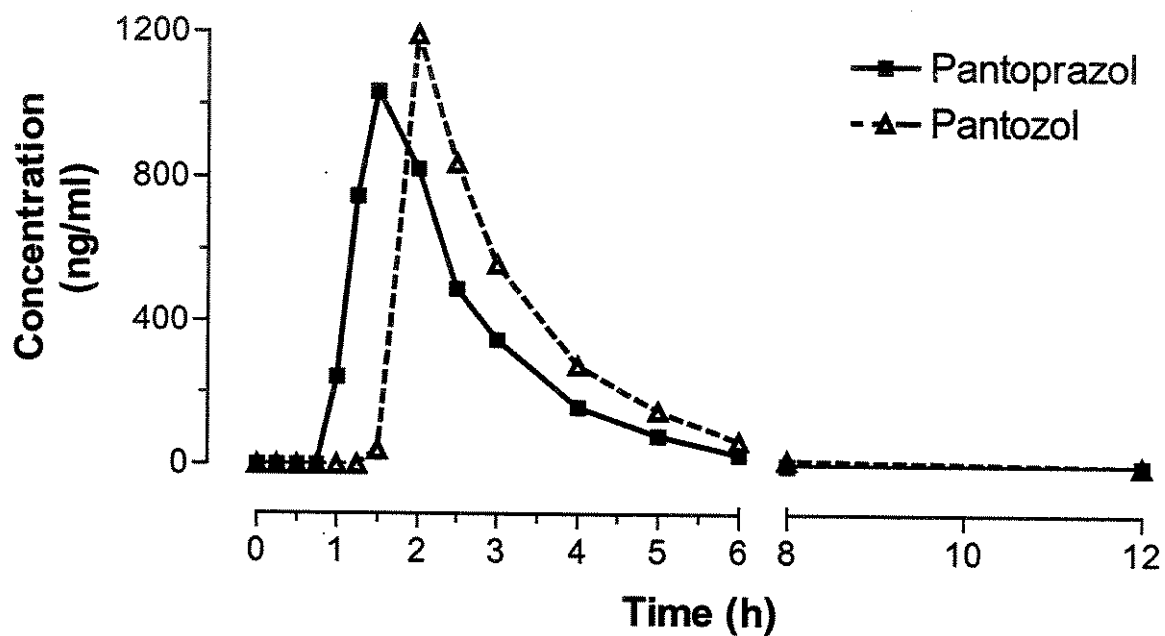
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1585	1279
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1616	1292
AUCall (0-12h) / Inf (%)	98.1	99.0
Cmax (ng/ml)	958	849
Tmax (h)	2.5	3.0
T _{1/2} (h)	0.9	0.8
Ke (1/h)	0.73	0.84

Vol. VI - RGS



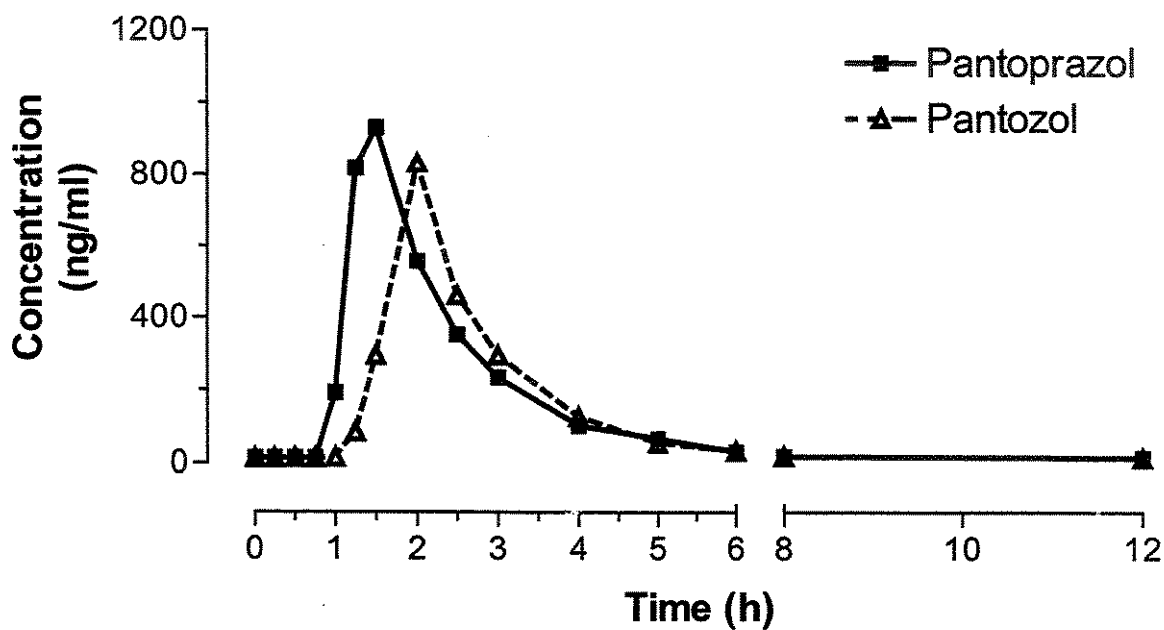
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1187	1326
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1218	1346
AUCall (0-12h) / Inf (%)	97.4	98.5
Cmax (ng/ml)	723	830
Tmax (h)	1.5	2.0
T _{1/2} (h)	0.9	0.7
Ke (1/h)	0.78	0.99

Vol. VII - ERB



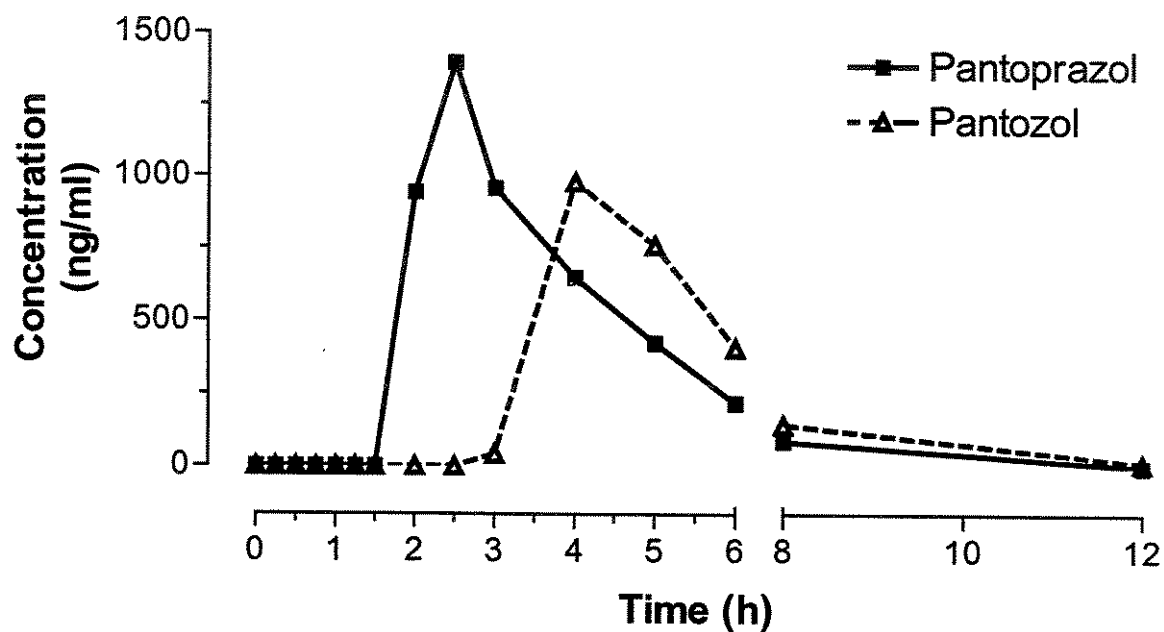
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1798	1976
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1871	2003
AUCall (0-12h) / Inf (%)	96.1	98.6
Cmax (ng/ml)	1036	1192
Tmax (h)	1.5	2.0
T _{1/2} (h)	1.0	1.0
Ke (1/h)	0.72	0.71

Vol. VIII - DAC

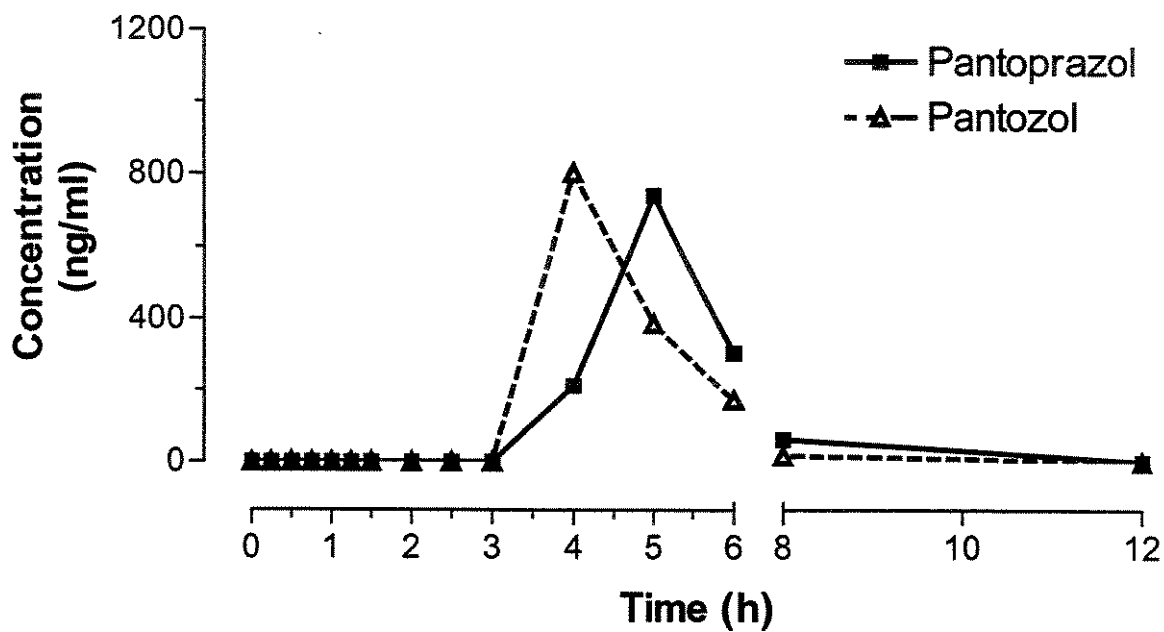


	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1404	1183
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1462	1222
AUCall (0-12h) / Inf (%)	96.0	96.8
Cmax (ng/ml)	931	832
Tmax (h)	1.5	2.0
T _{1/2} (h)	0.9	0.8
Ke (1/h)	0.73	0.83

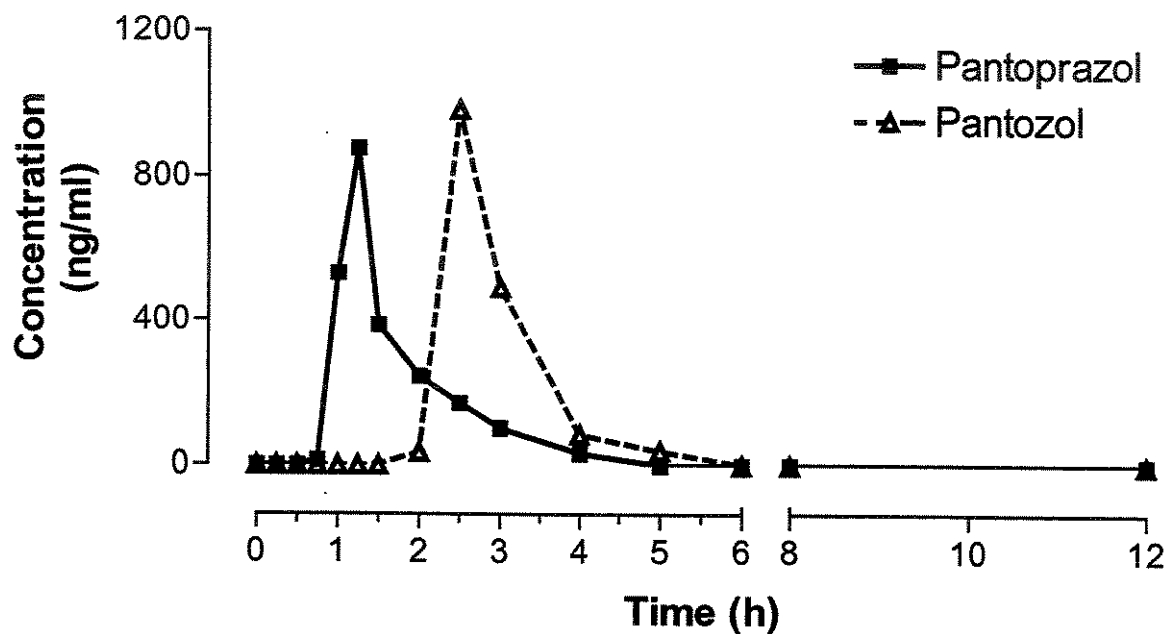
Vol. IX - GDR



	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	3555	2815
AUC Inf ([ng * h]/ml)	3557	2791
AUCall (0-12h) / Inf (%)	100.0	100.9
Cmax (ng/ml)	1397	979
Tmax (h)	2.5	4.0
T _{1/2} (h)	1.4	1.3
Ke (1/h)	0.50	0.55

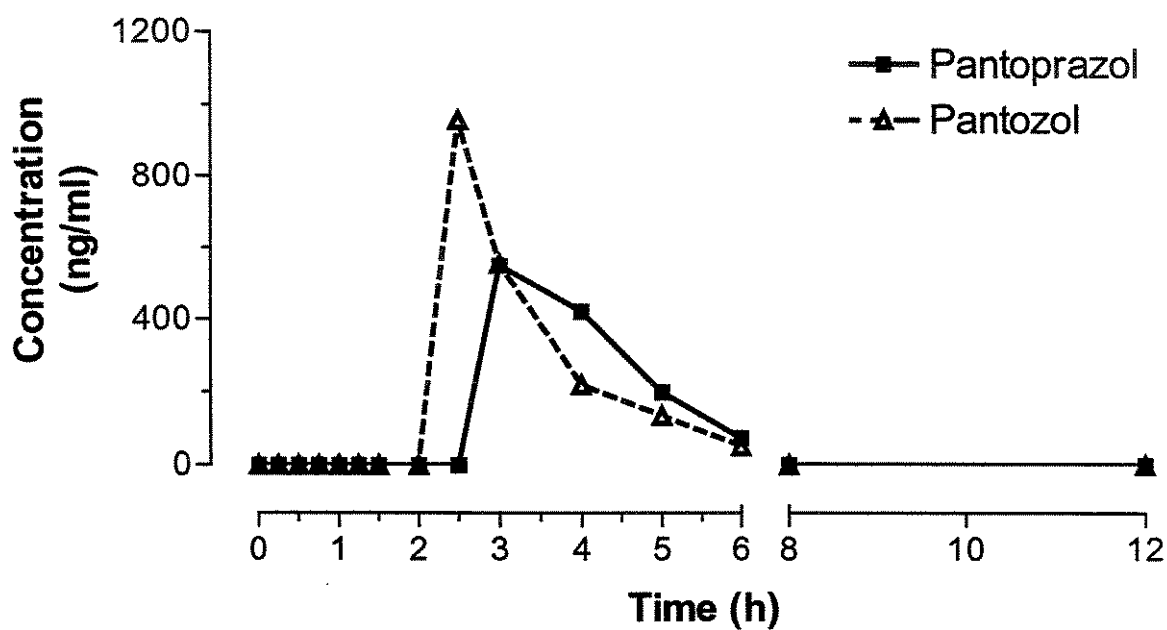


	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1600	1448
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1551	1501
AUCall (0-12h) / Inf (%)	103.2	96.5
Cmax (ng/ml)	740	803
Tmax (h)	5.0	4.0
T _{1/2} (h)	0.9	0.9
Ke (1/h)	0.82	0.77

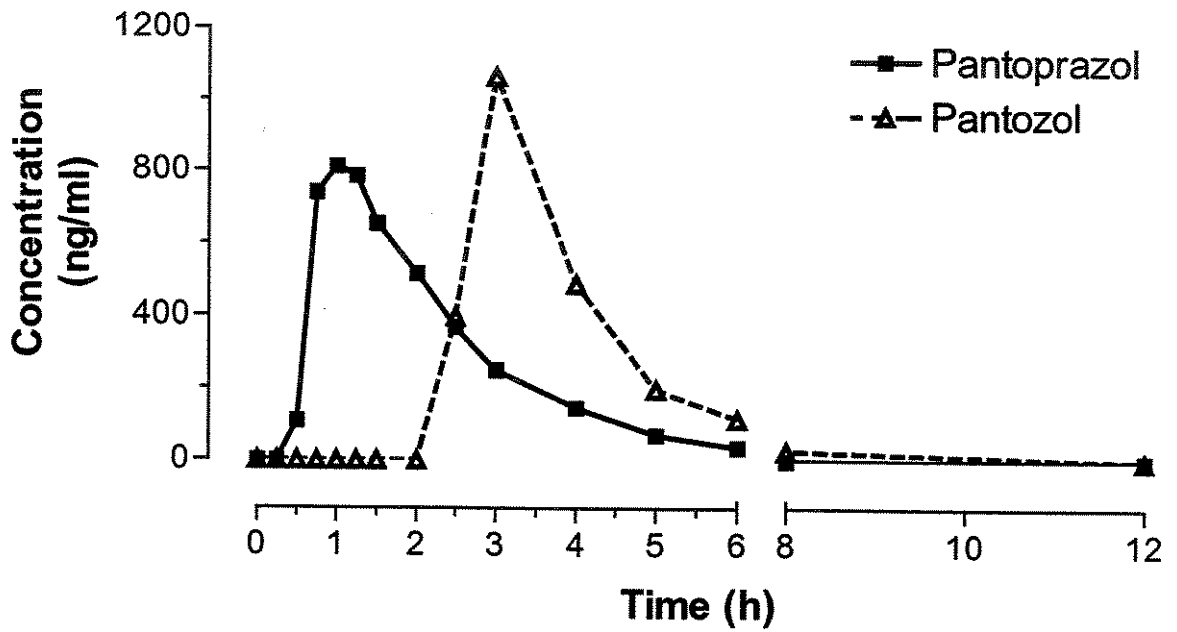


	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	779	981
AUC Inf ([ng * h]/ml)	842	990
AUCall (0-12h) / Inf (%)	92.4	99.0
Cmax (ng/ml)	879	983
Tmax (h)	1.3	2.5
T _{1/2} (h)	0.8	0.5
Ke (1/h)	0.88	1.34

Vol. XII - JPO

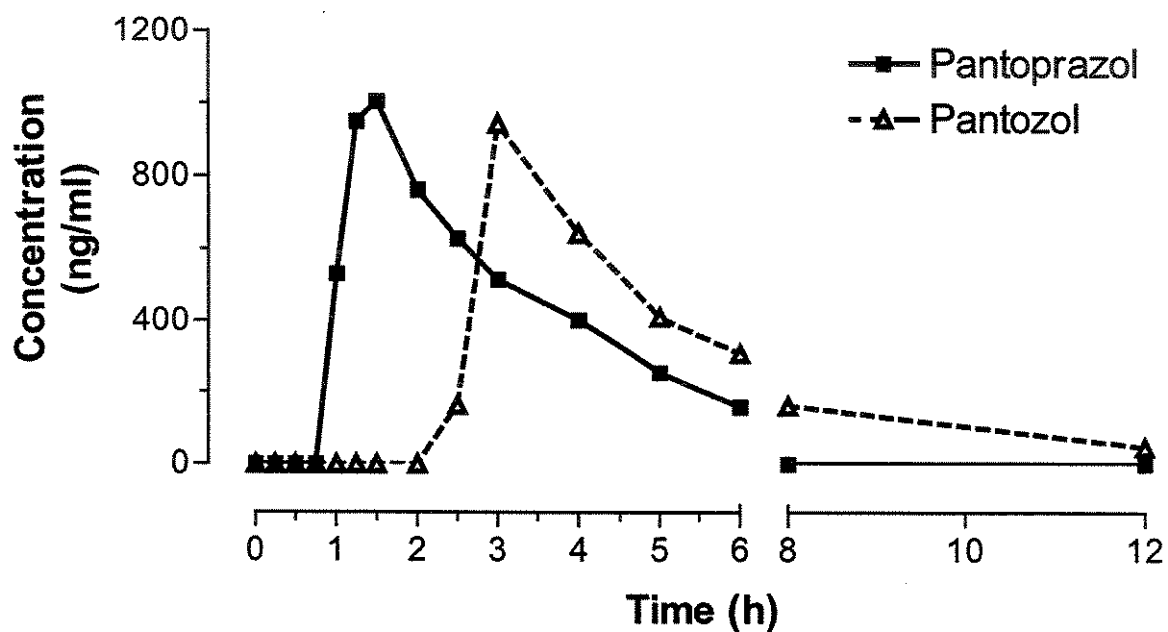


	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1141	1325
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1153	1338
AUCall (0-12h) / Inf (%)	99.0	99.0
Cmax (ng/ml)	549	956
Tmax (h)	3.0	2.5
T _{1/2} (h)	0.8	0.9
Ke (1/h)	0.87	0.80

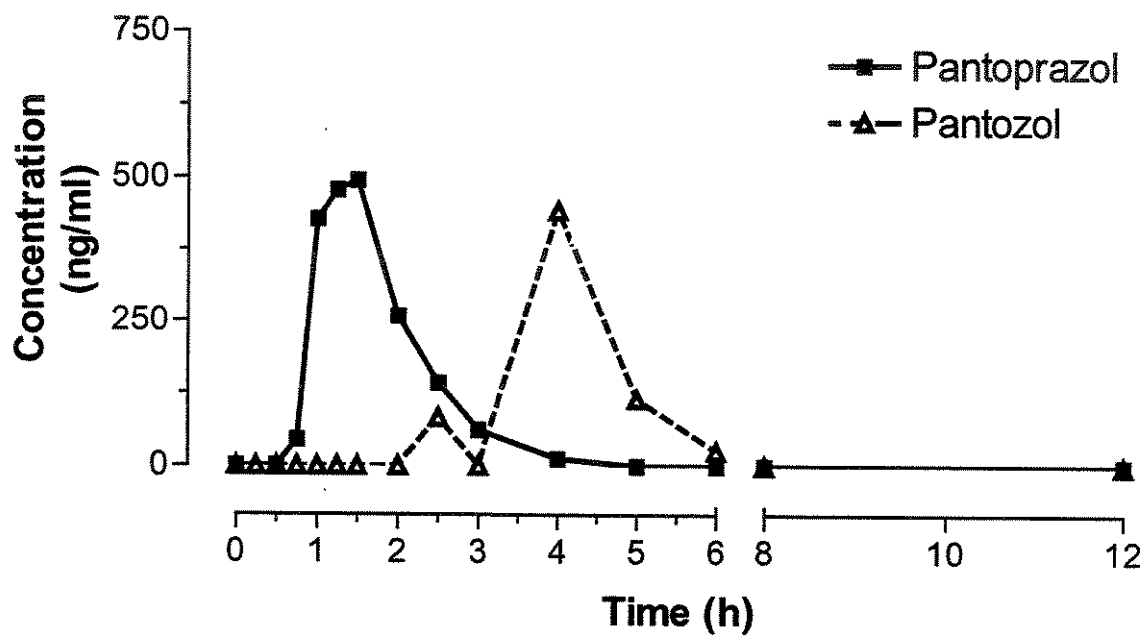


	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1761	1856
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1778	1893
AUCall (0-12h) / Inf (%)	99.1	98.0
Cmax (ng/ml)	811	1064
Tmax (h)	1.0	3.0
T _{1/2} (h)	1.0	0.9
Ke (1/h)	0.69	0.76

Vol. XIV - DAGY



	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	2721	2881
AUC Inf ([ng * h]/ml)	2905	3034
AUCall (0-12h) / Inf (%)	93.7	94.9
Cmax (ng/ml)	1006	943
Tmax (h)	1.5	3.0
T _{1/2} (h)	1.5	2.2
Ke (1/h)	0.46	0.31



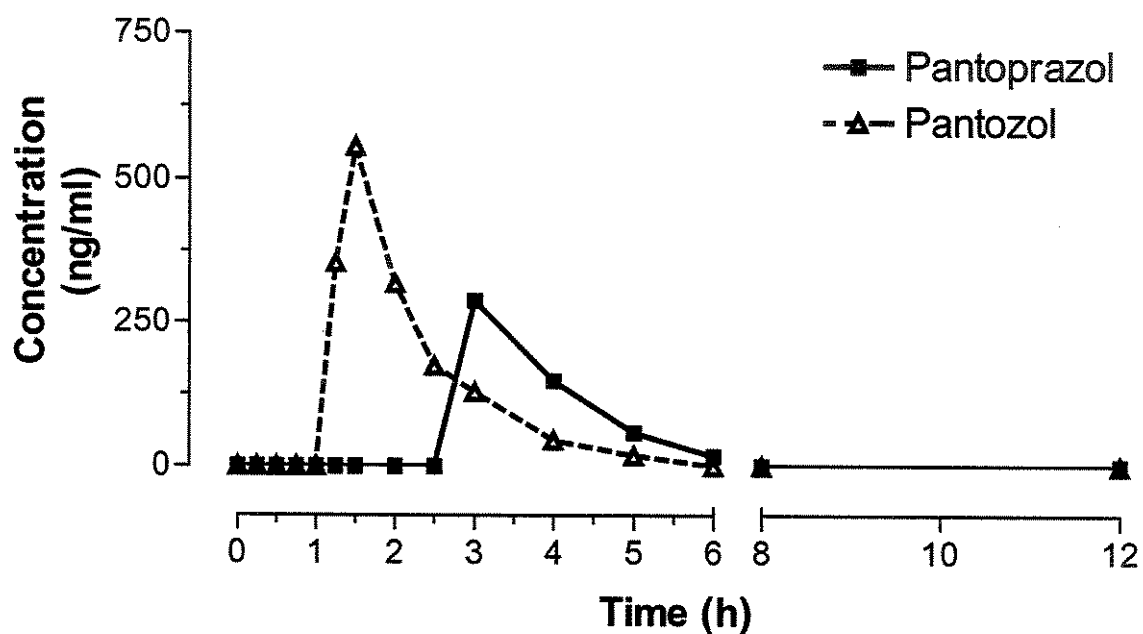
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	671	599
AUC Inf ([ng * h]/ml)	685	0
AUCall (0-12h) / Inf (%)	97.9	-
Cmax (ng/ml)	496	443
Tmax (h)	1.5	4.0
T _{1/2} (h)	0.5	0.0
Ke (1/h)	1.37	0.00

DROP OUT

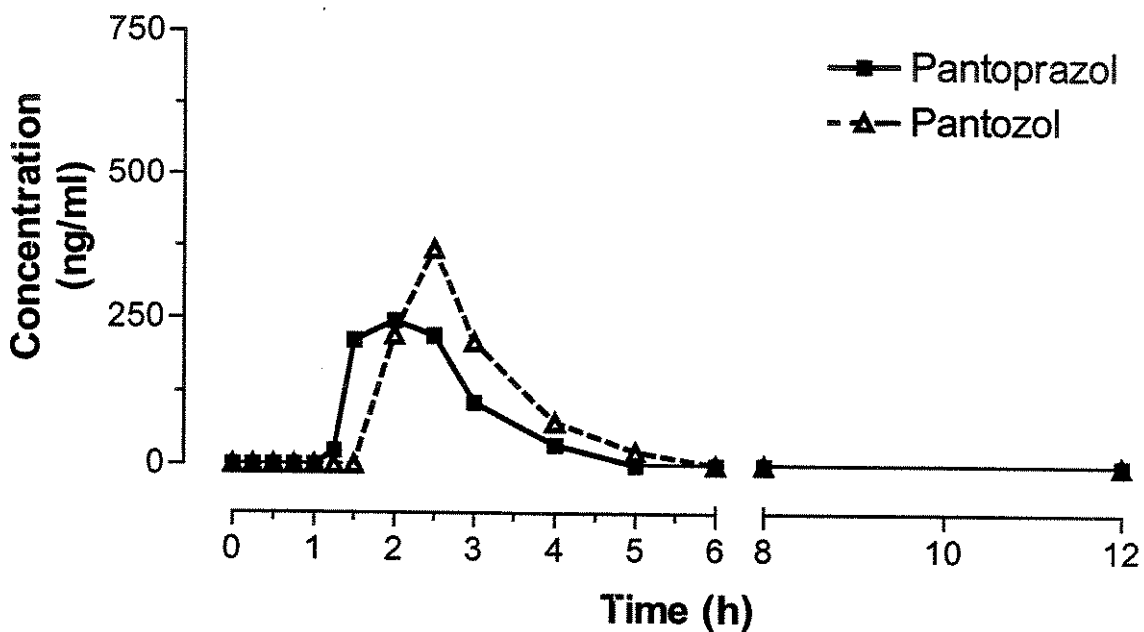
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)		
AUC Inf ([ng * h]/ml)		
AUCall (0-12h) / Inf (%)		
Cmax (ng/ml)		
Tmax (h)		
T _{1/2} (h)		
Ke (1/h)		

DROP OUT

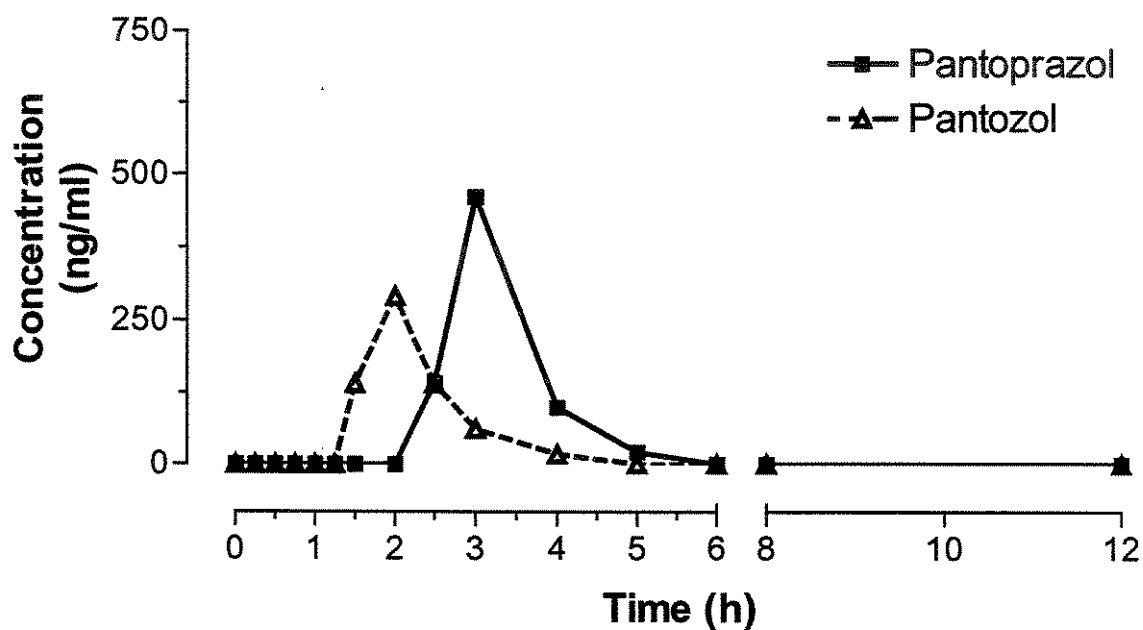
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) (ng * h)/ml)		
AUC Inf (ng * h)/ml)		
AUCall (0-12h) / Inf (%)		
Cmax (ng/ml)		
Tmax (h)		
T _{1/2} (h)		
Ke (1/h)		



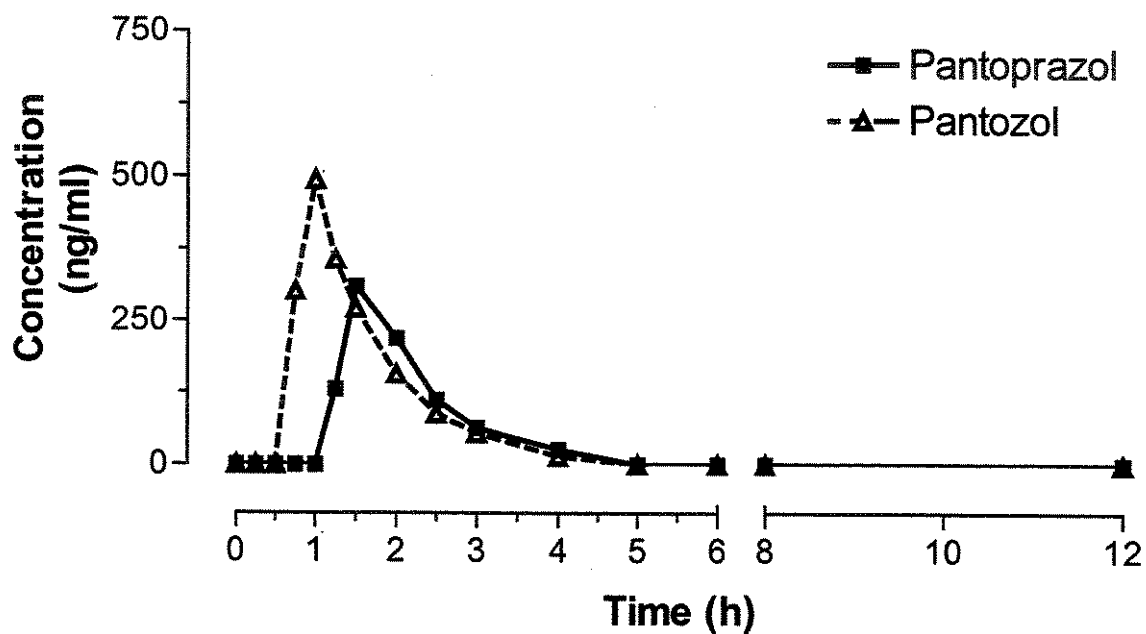
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	422	684
AUC Inf ([ng * h]/ml)	465	706
AUCall (0-12h) / Inf (%)	90.7	96.8
Cmax (ng/ml)	288	557
Tmax (h)	3.0	1.5
T _{1/2} (h)	0.9	0.7
Ke (1/h)	0.80	0.99



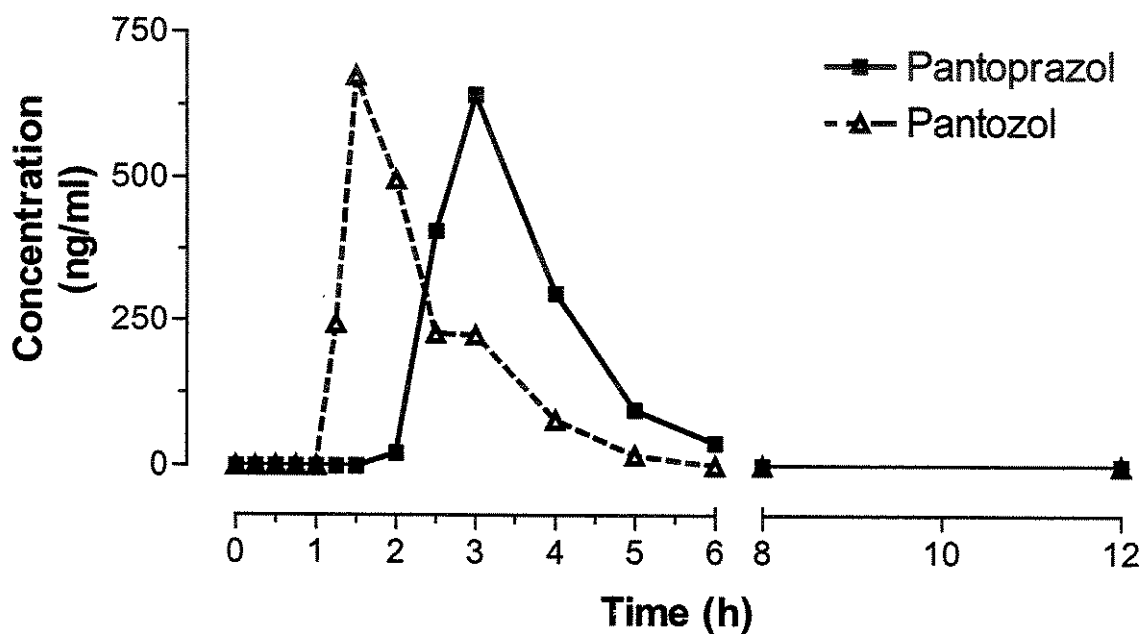
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	429	528
AUC Inf ([ng * h]/ml)	440	560
AUCall (0-12h) / Inf (%)	97.4	94.3
Cmax (ng/ml)	246	370
Tmax (h)	2.0	2.5
T _{1/2} (h)	0.6	0.6
Ke (1/h)	1.21	1.07



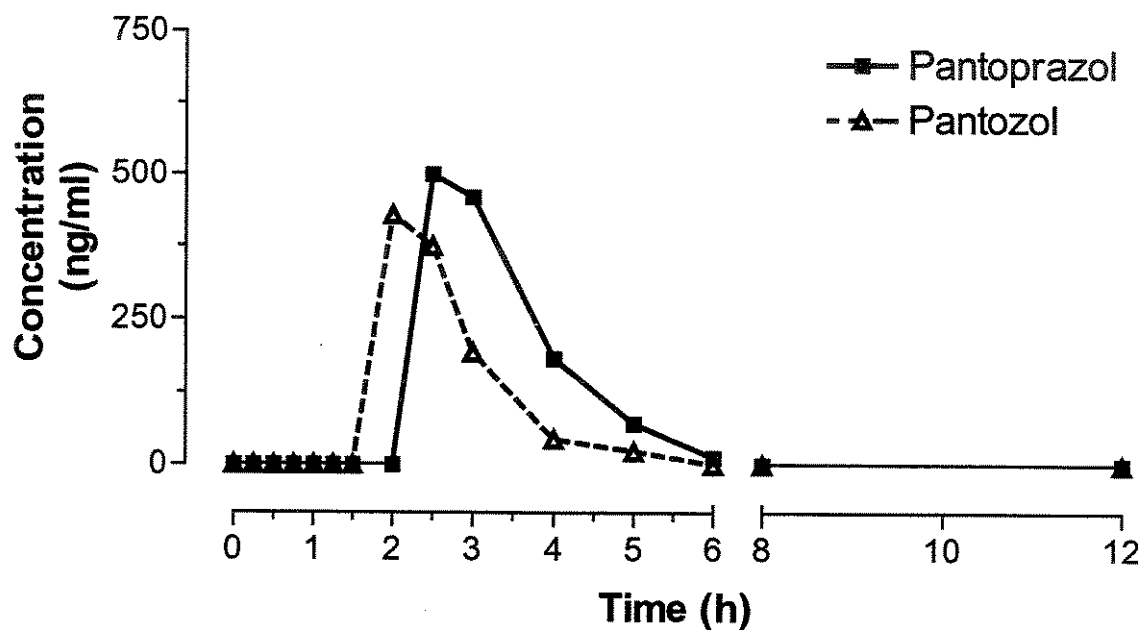
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	517	316
AUC Inf ([ng * h]/ml)	702	325
AUCall (0-12h) / Inf (%)	73.7	97.3
Cmax (ng/ml)	462	292
Tmax (h)	3.0	2.0
T _{1/2} (h)	1.6	0.4
Ke (1/h)	0.42	1.56



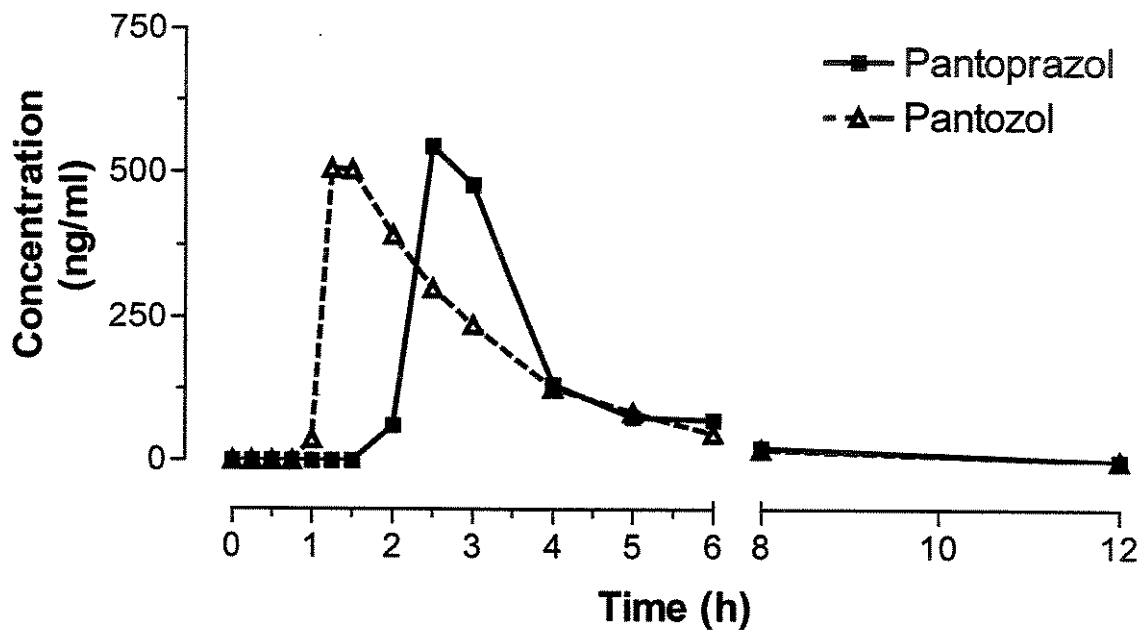
	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	362	553
AUC Inf ([ng * h]/ml)	381	576
AUCall (0-12h) / Inf (%)	95.0	96.1
Cmax (ng/ml)	311	495
Tmax (h)	1.5	1.0
T _{1/2} (h)	0.6	0.6
Ke (1/h)	1.25	1.09



	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1139	923
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1141	975
AUCall (0-12h) / Inf (%)	99.8	94.7
Cmax (ng/ml)	644	676
Tmax (h)	3.0	1.5
T _{1/2} (h)	0.7	0.8
Ke (1/h)	0.95	0.86



	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	851	591
AUC Inf ([ng * h]/ml)	893	600
AUCall (0-12h) / Inf (%)	95.3	98.5
Cmax (ng/ml)	500	429
Tmax (h)	2.5	2.0
T _{1/2} (h)	0.7	0.5
Ke (1/h)	0.93	1.43



	Pantoprazol	
	Pantoprazol	Pantozol
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	982	1136
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1020	1179
AUCall (0-12h) / Inf (%)	96.2	96.4
Cmax (ng/ml)	545	507
Tmax (h)	2.5	1.3
T _{1/2} (h)	1.1	1.3
Ke (1/h)	0.65	0.53

PROTOCOLO CLÍNICO

Objetivo:

Avaliar, em voluntários humanos sadios, de ambos os sexos a bioequivalência de duas formulações contendo 40 mg de pantoprazol.

Métodos:

Desenho do Estudo

O desenho consistirá de um estudo aberto, com replicação, de 24 voluntários sadios, adultos de ambos os sexos. Depois da seleção e observado um período de pelo menos 4 semanas sem fazer uso de qualquer medicação, os voluntários que forem considerados qualificados para participar do estudo, serão internados por dois períodos de aproximadamente 36 horas, com 1 semana de intervalo entre os internamentos.

Seleção do Voluntário

Crítérios de Inclusão

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

1. Sexo masculino e entre 18 a 45 anos de idade
2. O voluntário tem seu peso entre 55 e 95 Kg e está dentro de uma variação de 10%, de acordo com sua altura e estrutura ;
3. Foi submetido a uma história clínica e exame físico e considerado saudável
4. Concordou livremente e assinou o termo de consentimento, após todos os elementos essenciais do protocolo terem sido esclarecidos, antes de qualquer procedimento.

Crêterios de Exclusão

Qualquer um dos seguintes cr terios excluirá o voluntário do estudo:

1. Os resultados dos exames complementares estão fora dos valores considerados normais ($\pm 10\%$), a menos que sejam considerados clinicamente irrelevantes;
2. O voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentre dos três meses do início deste estudo;
3. Fez uso de medicação regular dentro das 4 semanas que antecederam o início deste estudo, ou fez uso de qualquer medicação uma semana antes do início deste estudo;
4. Foi internado por qualquer motivo até 8 semanas antes do início deste estudo;
5. Tem história de abuso de álcool ou drogas, ou ingeriu bebidas alcoólicas nas 48 horas que antecedem o período de internac o para iniciar o estudo;
6. Tem história de doença hepática, renal, pulmonar, gastro-intestinal, epiléptica, hematológica ou psiqu trica; tem hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do mioc rio, angina e/ou insuficiência cardíaca
7. O voluntário doou ou perdeu 450 ml ou mais de sangue dentre dos três meses que antecederam ao estudo
8. O voluntário tem qualquer condi o que o impede de participar do estudo pelo julgamento do investigador

Entrada do Voluntário no Estudo

Os voluntários são aceitos no estudo somente se eles forem considerados saudáveis como determinado pela história médica, exame físico e os exames laboratoriais que antecedem o início do estudo.

Após avalia o do estado de higi ez, os voluntários são submetidos a uma entrevista livre para análise da saúde mental, bem como condi o es

emocionais para participar da investigação. Após isso, os voluntários terão quaisquer dúvidas esclarecidas, e caso concordem, assinarão o termo de consentimento (modelo em anexo) para participação no estudo.

Exames Laboratoriais

Análise hematológica: hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas, VHS, ureia, creatinina, bilirrubina total, proteína total, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicérides, ácido úrico, γ GT, sódio e potássio.

Análise Urinária: gravidade específica, pH, albumina, glicose, cetonas, análise microscópica (para detecção de: WBC, RBC, cilindros, céls. epiteliais, cristal, bactéria). *Análise de Fezes:* parasitológico; *Análise Sorológica* para: hepatite B, hepatite C e HIV.

Nos voluntários do sexo feminino será realizado exame para detecção de gravidez (Beta HCG)

Internamento

Os voluntários serão internados na véspera do início do estudo e terão, desde então, assistência e cuidados médicos e de enfermagem especializados. Receberão dieta geral até as 23:00 horas, quando começarão jejum visando o início do ensaio clínico previsto para 7 horas do dia seguinte.

Os voluntários permanecerão em jejum para sólidos até 4 horas após a ingestão de pantoprazol; a partir de então, receberão dieta geral. Em cada fase, os voluntários receberão, por via oral 40 mg de uma das seguintes preparações farmacêuticas de pantoprazol:

- Pantoprazol comprimidos de 40 mg - formulação de referência: Byk
- Pantoprazol, comprimidos de 40 mg - formulação teste: Merck S.A.

Será solicitado ao voluntário que apresente-se, para internamento, na Casa de Saúde Santa Rita, aproximadamente às 21:00 horas na noite anterior de cada período e que permaneça na Unidade até 12 horas após a administração da medicação.

Três dias após o final do estudo, os voluntários serão reavaliados clinicamente e pelos mesmos exames subsidiários realizados na fase pré-estudo. Em caso de aparecimento de algum efeito colateral, os voluntários serão avaliados e medicados por um dos responsáveis pelo ensaio clínico.

Os voluntários serão ressarcidos no valor de R\$ 300.00 (trezentos reais) e durante um período de 6 meses, a partir da data de início do estudo clínico, os voluntários estarão sob cobertura de um Seguro de Vida em Grupo da Companhia Vera Cruz, para casos de morte, invalidez permanente e acidentes.

Coleta de Sangue

Será feita coleta de sangue (8 ml) através de "butterfly" heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário, imediatamente antes da administração de 40 mg de uma das preparações de pantoprazol, e outras, aos seguintes intervalos a partir da administração oral: 15, 30, 45, 60, 90min, 2h, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 horas. No total serão coletadas 30 amostras de sangue (15 em cada etapa) para dosagem sérica de pantoprazol.

O tempo atual de coleta de sangue será registrada usando um relógio de 24 horas. O sangue será centrifugado, o plasma retirado e armazenado a - 20 ° C até a determinação sérica da droga. Concomitantemente às coletas de sangue, serão feitas as verificações da pressão arterial e do pulso, sendo a temperatura medida no primeiro horário de coleta.

A concentração sérica de pantoprazol será determinada por Cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massa.

Restrições

Todos os voluntários devem chegar a Casa de Saude Santa Rita tendo feito uma refeição normal noturna (jantar). Deverão permanecer em jejum a partir das 23:00 horas da noite do internamento até 4 horas após a ingestão da medicação na manhã seguinte, quando uma refeição será servida. Líquidos serão permitidos *ad libitum* após as refeições, mas bebidas contendo xantinas (incluindo chá, café e cola) deverão ser evitadas.

Não será permitido fumar durante o período de internamento. Medicamentos concomitantes deverão ser evitados, quando possível. Qualquer medicação, deverá ser registrada. Consumo de álcool deverá ser limitado durante o período de estudo e evitado completamente durante as 48 horas que antecedem cada dose.

Crítérios para retirada do estudo

As seguintes condições devem ser considerados como critérios de retirada do estudo:

1. O voluntário não deseja continuar no estudo por razões outras que a ocorrência de eventos adversos da droga de estudo; por ex. indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo.
2. Efeitos Adversos da droga do estudo.
3. Testes laboratoriais anormais julgados de relevância clínica.
4. Doença intercorrente requerendo medicação.

Será solicitado aos voluntários que relate qualquer evento adverso e quando isto ocorreu. Será também solicitado que notifique ao investigador se foi necessário usar medicação adicional. Qualquer evento adverso ocorrendo durante o período de estudo será registrado em folha própria em detalhes na página apropriada. As perguntas realizadas para saber se o voluntário teve algum evento adverso deverão ser limitadas a perguntas gerais, tais como: Como vai você? Qualquer voluntário com evento adverso será seguido clinicamente por estudos laboratoriais até que os parâmetros voltem ao normal.

Parâmetros Farmacocinéticos

Os seguintes parâmetros serão determinados:

$AUC_{[0-24h]}$	Área sob a curva de concentração da droga <i>versus</i> tempo do tempo 0 (zero) ao tempo 24h, calculada pelo método trapezoidal;
C_{max}	Pico de concentração máxima da droga, obtida diretamente dos dados;
T_{max}	Tempo para atingir o C_{max} .

Análise Estatística

Será realizada com a ajuda dos seguintes softwares: WinNonLin Professional Network Edition, Version 1.5m adquirido da Scientific Consulting, Inc., registrado na Unidade Analítica Cartesius ICB-USP (número de série disponível, se solicitado); Bioequivalence Program for Two-Period Crossover Studies - Version 3.4", por Jerman P Wijnand; Microsoft Excel Version 7.0 e Graph Pad Prism Version 2.01.

De acordo com as Agências Reguladoras os parâmetros AUC, C_{max} , deverão ser analisados como as razões dos logaritimos individuais transformados das drogas teste/referencia. T_{max} será analisado como

diferença individual: teste-referencia. Ambos testes paramétricos e não paramétricos serão aplicados para análise das variáveis.

Serão aceitos como bioequivalentes para ambas a taxa e a extensão da absorção, quando o intervalo de confiança de 90% da média geométrica de AUC e Cmax estiverem dentro do intervalo de 80-125% da média geométrica da formulação referência (regras do FDA para estudos de bioequivalência).

Aspectos Éticos

Comitê de Ética

O protocolo será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para aprovação. Qualquer mudança no protocolo, será necessário a aprovação do Comitê. O Estudo será conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki (1965) e as revisões de Tokyo (1975), Venice (1983) e África do Sul (1996), e a Resolução 196/96 e 251/97 da SVS-MS.

Termo de Consentimento

Os voluntários receberão uma explanação da natureza e dos objetivos do estudo. Será enfatizado que o estudo tem a finalidade de pesquisa, e que o voluntário não poderá esperar que haja qualquer efeito terapêutico. Também entenderá que ele é livre para se retirar a qualquer momento do estudo sem que isto vá causar qualquer prejuízo no seu atendimento junto a Unidade Analítica Cartesius. Será solicitado a cada voluntário que, caso concorde, assine o termo de consentimento livre e esclarecido para participar no estudo.

Os resultados do exame médico e testes laboratoriais serão registrados na folha individual do voluntário. Toda a informação obtida durante o estudo referente ao estado de saúde do voluntário estará disponível aos médicos na Unidade Analítica Cartesiuis. Uma cópia dos exames laboratoriais realizados no pré e pós estudos poderá ser fornecida aos voluntários.

Esquema do Estudo

Período pré-estudo:	História Médica	Eletrocardiograma
	Exame Físico Geral FC e PA	Exames Laboratoriais

Períodos: (1, 2))	Tempo (h)	Atividades	Outras atividades
	0:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	0:25	Coleta de sangue	PA, pulso
	0:50	Coleta de sangue	PA, pulso
	0:75	Coleta de sangue	PA, pulso
	1:00	Coleta de sangue	PA, pulso
	1:25	Coleta de sangue	PA, pulso
	1:50	Coleta de sangue	PA, pulso
	2:00	Coleta de sangue	PA, pulso
	2:50	Coleta de sangue	PA, pulso
	3:00	Coleta de sangue	PA, pulso
	4:00	Coleta de sangue	PA, pulso
	5:00	Coleta de sangue	PA, pulso, temperatura
	6:00	Coleta de sangue	PA, pulso
	8:00	Coleta de sangue	PA, pulso
	12:00	Coleta de sangue	PA, pulso

Período Pós-Estudo:	Exame Físico Geral FC e PA	Eletrocardiograma
		Exames Laboratoriais

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de bioequivalência de duas formulações (comprimidos) de pantoprazol em voluntários sadios.

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

Responsáveis: Dr Gilberto de Nucci e Dr Marcelo Carvalho

O abaixo-assinado, Nome, idade, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade dos médicos Gilberto de Nucci e Marcelo Carvalho, da Unidade Analítica Cartesius do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é verificar se 40 mg de pantoprazol Merck S.A. atinge níveis plasmáticos equivalentes a 40 mg de pantoprazol Byk.

ii - Durante o estudo, será internado por dois períodos de 36 horas, com intervalo de 07 dias entre eles. Em cada período receberá 40 mg de uma das duas formulações de pantoprazol na forma de comprimidos e coletadas 15 amostras de sangue de 8 ml cada através de butterfly heparinizado.

iii - A participação neste estudo não tem objetivo de se submeter a um tratamento terapêutico.

iv - A administração oral de pantoprazol de maneira continuada pode causar efeitos colaterais como náuseas, diarreia, dor abdominal, flatulência, lesões de pele, prurido, dor de cabeça, tonturas. Entretanto o aparecimento de efeitos indesejáveis após administração de dose única de pantoprazol tem menor probabilidade de aparecer. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

v - Será submetido antes da primeira e após a segunda internação aos seguintes exames laboratoriais: de sangue (hemograma, transaminases, fosfatase alcalina, bilirrubina total, proteínas, colesterol, triglicérides, uréia, creatinina e ácido úrico, sódio e potássio), de urina (sumário de urina), e do coração (eletrocardiograma). Sorologias para HIV, hepatites B e C e

parasitológico de fezes e teste de gravidez serão realizados apenas antes da primeira internação.

vi - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.

vii - Tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento médico desta Instituição.

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

ix - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e a Unidade Analítica Cartesius não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

x - Durante o período de 180 dias a partir da data da assinatura do mesmo, o voluntário estará assegurado (Seguro de Vida em Grupo) pela empresa Vera Cruz Seguradora.

xi - Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar a Unidade Analítica Cartesius e solicitar que o mesmo contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico, nos telefones abaixo.

xii - A Unidade Analítica Cartesius o manterá informado e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme solicitação do voluntário.

xiii - Poderá contactar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo nos telefones 818-7438 ou 818-7392 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

xiv - De acordo com valores previamente estabelecidos, os voluntários serão ressarcidos das despesas e tempo dispendidos no valor de R\$ 300,00 (trezentos reais) na realização do supracitado estudo clínico

xv - É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que esteja em boa saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações.

São Paulo,

Assinatura do voluntário

Dr Gilberto de Nucci- fone 019 2516929 0199924032 8187493
Dr Marcelo Carvalho fone 011 8187493

**Pantoprazole Bioequivalence Study: Determination in human plasma by HPLC
accoupled to Tandem Mass Spectrometry**

Petrellis, M.C and De Nucci, G ¹.

Cartesius Analytical Unit, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences,
São Paulo University, São Paulo, Brazil

¹ Correspondence Author:

Jesuino Machado Marcondes 415

Campinas, SP-Brazil

Postal Code: 13092-320

Fax: 00 (55) 19-3252-1516

E-mail: denucci@dglnet.com.br

Summary: To develop a new method for quantifying pantoprazole in human plasma and to compare the bioavailability of two pantoprazole tablet formulations, an open, randomized, two-period crossover study with a one – week washout interval was conducted in 22 healthy volunteers. Plasma samples were obtained up to 12 hours after drug administration and the serum pantoprazole concentrations were analysed using electrospray tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography using multiple reaction monitoring mode.

The pharmacokinetic parameters obtained for pantoprazole after the administration of each formulation included the Area under the curve ($AUC_{(0-12h)}$), $AUC_{(0-\infty)}$, C_{max} , $C_{max}/AUC_{(0-12h)}$, t_{max} , elimination rate constant (K_e), and half – time ($t_{1/2}$). Within – and between runs imprecision was less than 10.9% and 15.0%, respectively. Inaccuracy within and between runs was -4.2% and -5.9%, respectively. The pharmacokinetic parameters for bioequivalence showed a normal distribution, and the variance of $AUC_{(0-12h)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, and C_{max} were homoscedastic. The 90% confidence interval of parametric analysis of individual mean for the Pantoprazol/Pantozol (Pantoprazol; Merck Pharmaceuticals Inc., São Paulo, Brazil; Pantozol; Byk Chemical & Pharmaceuticals Inc., São Paulo, Brazil) individual percent ratio was 105.5% for $AUC_{(0-12h)}$, 102.6% for $AUC_{(0-\infty)}$, 99.8% for C_{max} , 107.0% for K_e , 108.5% for $t_{1/2}$, and -0.542 for t_{max} (arithmetic mean of individual differences). For non-parametric analysis these intervals were 104.3% for $AUC_{(0-12h)}$, 102.0% for $AUC_{(0-\infty)}$, 98.9% for C_{max} , 105.5% for K_e , 106.1% for $t_{1/2}$, and -5.0 for

t_{max} (point estimate mean of individual differences). We have developed a method in which liquid chromatography is coupled with electrospray tandem mass spectrometry to improve the pharmacokinetic analysis of pantoprazole. Because the 90% CI for both C_{max} and AUC ratio were inside the 80-125% interval proposed by the *Food and Drug Administration*, we concluded that Pantoprazol[®] 40mg tablets is bioequivalent to Pantozol[®] 40mg tablets in terms of both the rate and the extent of absorption. **Key Words:** Pharmacokinetics – Bioavailability – High-pressure liquid chromatography – Volunteer.

Introduction

Pantoprazole (sodium 5 – difluoromethoxy – 2 – [(3,4 – dimethoxy – 2 – pyridyl)methyl] sulphinyl} – 1H - benzimidazole) is a potent inhibitor of the gastric parietal cell H⁺/ K⁺ - ATPase, under development for the treatment of disease states associated with excessive gastric acid secretion. The compound produces dose – dependent and long – lasting inhibition (≥ 24 hours) of pentagastrin – stimulated gastric acid output in healthy volunteers after oral (20 to 40 mg once daily) or intravenous (≤ 80 mg single dose; 15 to 30 mg once daily) administration [1 - 4].

Pantoprazole is rapidly absorbed after oral administration, with peak plasma concentrations of 1.1 to 3.1 mg/L occurring 2 to 4 hours after ingestion of a enteric-coated 40 mg tablet. The drug is subject to low first – pass hepatic extraction, displaying an estimated absolute oral bioavailability of 77% [1,2,5]. Concomitant

food intake does not affect bioavailability of pantoprazole, and any possible retardant effect of food on the rate of drug absorption is unlikely to be of clinical relevance, given the prolonged antisecretory action of pantoprazole [5]. Plasma pantoprazole concentrations decline monophasically after oral administration, with a mean plasma terminal elimination half – life ($t_{1/2\beta}$) of 0.9 to 1.9 hours [2,6]. Despite the short half – life ($t_{1/2\beta}$) of pantoprazole, inhibition of acid secretion, once accomplished, is long – lasting, persisting long after the drug has been cleared from circulation. Thus, the plasma kinetics of pantoprazole have little bearing on its antisecretory action. On repeated (7 days) oral administration, the pharmacokinetics of pantoprazole (20 and 40 mg/day) do not differ appreciably from those on single dose administration, suggesting that drug accumulation does not occur [6].

In keeping with its high degree of plasma protein binding ($\approx 98\%$) [5], pantoprazole has a relatively low apparent volume of distribution (mean 0.16L/kg at steady – state), suggesting limited tissue distribution [7].

In humans, pantoprazole is subject to extensive hepatic metabolism via cytochrome P450 (CYP) – mediated oxidation followed by sulphate conjugation [8]. Elimination is predominantly renal, with $\approx 80\%$ of oral dose being excreted as urinary metabolites; the remainder is excreted in faeces and originates primarily from biliary secretion [9].

The pharmacokinetics of pantoprazole do not appear to be modified to any clinically relevant extent by renal impairment or haemodialysis [10]. Although

metabolism and elimination of pantoprazole are impaired in patients with hepatic dysfunction, as reflected in a median $t_{1/2\beta}$ of 7 to 9 hours after repeated oral administration in cirrhotic patients [11]. However, $C_{\max}$ was only marginally elevated (50%), indicating that pantoprazole may be administered to patients with hepatic impairment without dosage adjustment. In the elderly, the pharmacokinetics of oral and intravenous pantoprazole are comparable to those in their younger counterparts [11,12].

Pantoprazole has lower affinity than omeprazole or lansoprazole for hepatic cytochrome P450 (CYP) enzyme system and does not appear to induce CYP activity. In Healthy human volunteers, pantoprazole shows no clinically relevant interaction at therapeutic doses with antipyrine, diazepam, digoxin, theophylline, carbamazepine, diclofenac, phenprocoumon, phenytoin, warfarin, nifedipine, caffeine, metoprolol or ethanol. In addition, it does not appear to compromise oral contraceptive was shown. Conversely, the pharmacokinetics of pantoprazole are not modified to any clinically relevant extent by coadministered antacids, antipyrine, phenytoin, digoxin or theophylline [1].

This study was designed to develop and accurate and sensitive liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method for quantification of pantoprazole in human plasma and assess the bioequivalence of two commercial 40 mg tablet formulation of the drug (Pantoprazol from Merck

Pharmaceuticals Inc., Brazil and Pantozol from Byk Chemical and Pharmaceuticals Inc., Brazil), in healthy volunteers.

Methods

Clinical protocol

Twenty -two healthy male and female volunteers between 18 years and 45 years old ($24 \pm 3,339$ years old) with a height between 161cm and 188 cm 174 ± 6.7 cm), weighing between 56 kg and 91.5kg (74.7 ± 9.3 kg), and within 15% of their ideal body weight, as assessed by clinical and laboratory tests evaluations, were enrolled in a study. All subjects gave their written informed consent prior to participating in the study, and clinical protocol was approved by Faculty of Medical Sciences Ethics Committee of University of São Paulo, and was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (1965) and the Tokyo (1975) and Venice (1983) revisions.

The volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal, and hematological disease, as assessed by physical and psychiatric examination, ECG, and following laboratory tests: blood glucose, urea, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase, γ -GT, total bilirubin, albumin, total protein, triglycerides, total cholesterol, hemoglobin, hematocrit, total and differential while cells counts, erythrocyte sedimentation rate and routine urinalysis. All subjects were negative for HIV, HBV, and HCV.

The study was conducted in an open, single dose, two way randomized crossover design with seven days of washout interval between doses. During each period, the volunteers were hospitalized at 10:00 p.m having already had a regular evening meal. All volunteers were required to remain fasted until three hours after dose administration in the following morning at 7:00 a.m a single 40 mg dose of either pantoprazol formulation: Pantoprazol® (Batch No. 99G068, expiration date: 07/2002) as the test formulation (Merck Pharmaceuticals Inc., Brazil) and Pantozol® (Batch No. 199212, expiration date: 01/2002) as a reference formulation (by Byk Chemical and Pharmaceuticals Inc., Brazil) along with 200 ml of tap water. After three hours following drug administration a standard breakfast was available, a standard lunch and evening meal were provided at five and twelve hours after dosing, respectively. No other food was permitted during "in-house" period. Liquid refreshment was permitted *ad libitum* after lunch, but xanthine-containing drinks including tea, coffee, cola were avoided. In addition, smoking was not allowed during the "in-house" period. Concomitant medication was to be avoided where possible during the study. Any medication, including over the counter medication, was to be recorded.

Alcohol consumption was throughout the study period and avoided completely during 48 hours prior to each dose. At each blood sampling time, systolic and diastolic arterial pressure (measured non-invasively with a sphygmomanometer) and heart rate were recorded.

The Tolerance of both products was good. One volunteer during the first test confinement had severe urticaria during the first confinement and facial eritema during the first test and second confinement, whose symptom relation to the formulation is unknown. He has been treated with betametasone during the first confinement.

Drug analysis

Blood sampling for plasma drug were taken from a suitable forearm vein pre-dose and 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, and 12 h post-dosing. On each occasion, one 10 ml sample was taken either via "butterfly" or syringe into clean tube containing anti coagulant. The actual times of sampling were recorded using 24 hours clock notation. The blood samples were spun at 4,000 rpm for ten minutes and the plasma removed and stored at -20°C until used for drug assay. All samples from a single volunteer were analyzed in a duplicate and pantoprazole plasma concentrations were determined by a validated method using a combined reverse phase LC-MS/MS with positive ion electrospray ionization using multiple reaction monitoring.

Preparation of Standard Solutions and Reagents

A standard of pantoprazole was prepared by appropriate dilution from a stock solution of 1 mg/ml in methanol water (50/50 by volume) to provide 10 µg mL⁻¹. Internal standard (carbamazepine, µg mL⁻¹) solutions were prepared by appropriate

dilution from a stock solution of 1 mg mL^{-1} in methanol water (50/50 by volume) to provide $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

All working solutions were stored at 4°C until used. Diethylether/dichloromethane (70/30 by volume) was prepared on the day of use.

Preparation of calibration and Quality Control Samples

Calibration standards were prepared by spiking control human plasma with standards solutions of pantoprazole to give calibration standards of 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.2, 0.5, $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Fixed concentration of carbamazepine ($1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) was added to all tubes as an internal standard. Calibration standards and blanks were prepared freshly in duplicate for each assay and extracted along with plasma and quality controls. Quality control samples were prepared by spiking control human plasma with 0.12, 0.8 and $3 \text{ } \mu\text{g}$ of pantoprazole mL^{-1} . A single quality control samples for each of the three concentrations was thawed for every assay and extracted with the plasma samples.

Pretreatment of Plasma Samples

Five hundred microliters of plasma was dispensed into appropriate tubes containing internal standard (carbamazepine, $1 \text{ } \mu\text{g/mL}$). The tubes were vortex-mixed and allowed to stand at room temperature for 10 seconds. Diethyl ether/Dichloromethane (70:30; 4 mL) was then added and the samples were vortex-

mixed for 30 seconds. The upper organic layer was carefully removed and transferred using pasteur pipettes to test tubes. The solvent was removed by gentle stream of nitrogen in a dry bath at 37°C. Two hundred microliters of mobile phase (80% CH₃CN, 20% H₂O 0.1% TFA – see Chromatographic Conditions) was added to the tubes, which were then vortex-mixed for 15 seconds to reconstitute the residues. The solutions were transferred to microvials, capped, and placed in an HP 1100 autosampler rack. Forty microliters aliquots were injected automatically into the liquid chromatography system.

Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis

Chromatography and Mass Spectrometry Conditions

An HPLC model 1100 system from Hewlett – Packard, consisting of a binary pump, degasser, autosampler, thermostat column component, variable – wavelength UV detector, analytical reversed – phase C8 column (genesis 4µm C8; 150x4.6 mm internal diameter) and guard column (genesis 4µm C8; 10 x 4mm internal diameter), from Jones Chromatography, Tames Valley, UK), was used. Mobile phases were prepared with 0.1% Trifluoroacetic acid in a solution of water (20%) and acetonitrile (80%), the pH of solution was not adjusted. An isocratic gradient was used to elute the analyte and internal standard at flow rate of 1mL/min (total run time was 4.0 min). The eluant from HPLC column approximately 100µL/min was split and monitored by mass spectrometry

The reversed-phase C8 column was used and operated at a temperature of 40°C and a column switch was used to divert the column eluant to waste at appropriate times. The temperature of the autosampler was maintained at 10°C and the injection volume was 40µL. The autosampler needle was washed with freshly prepared 50% acetonitrile in water to prevent sample carryover.

Mass spectrometry was performed with a Quattro II triple stage quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) equipped with an API electrospray source (Micromass) operating in the positive – ion mode using a cross – flow as the counter electrode (Micromass). The mass spectrometer was calibrated with a sodium iodine/cesium iodine solution in the range from m/z 20 to 1000 according to the instrument specifications. Optimization of the mass spectrometric conditions for all compounds studied (tuning – and collision – induce dissociation) was done with standard solutions in the mobile phase (each at 5 µg mL⁻¹ and a flow rate of 10 µg mL⁻¹) using an infusion pump connected directly to the electrospray probe.

The retention times for pantoprazole and carbamazepine from the mass spectrometer were 1.86 minutes and 2.20 minutes respectively. The mass spectrometer equipped with electrospray source was run in the positive mode (ES+) and set for multiple reaction monitoring (MRM): 366.1 > 91,50 for pantoprazole and 236,89>194,09 for carbamazepine. For both pantoprazole and carbamazepine the dwell time was optimized at 0.2 s and the collisions energies were 35 and 15 eV, respectively. The collision gas (Argon) pressure was 2.30 10⁻³ bar and the cone

voltage were 50V and 25V, respectively, for pantoprazole and carbamazepine. Data acquisition and analysis were performed using the software MassLynx (9v. 3.2) running under Windows NT (v. 4.0) on a Pentium PC.

Recovery

Preliminary experiments evaluated the recovery of the extraction method for pantoprazole. The recovery (%) was expressed as a ratio of the peak area of extracted blank plasma spiked with each standard relative to the peak area of an equivalent unextracted standard solution.

Precision and Accuracy

Between – run accuracy and precision were calculated for calibration and quality control samples, also. Within – run was calculated for the quality control samples. Calibration curve experiments were performed in duplicate. Each quality control samples was analyzed three or four times in every assay.

Pharmacokinetics and Statistical Analysis

The first – order terminal elimination constant was estimated by linear regression from the points describing the elimination phase on a log – linear plot. Half – life was derived from rate constant ($t_{1/2} = \ln(2)/K_e$). The maximum observed plasma concentration (C_{max}) and the time taken to achieve this concentration (t_{max}) were obtained directly from the curves.

The areas under the pantoprazole plasma concentration – versus – time curves from 0 – 12 hours ($AUC_{(0-12h)}$) were calculated by applying the linear trapezoid rule. Extrapolation of these areas to infinity ($AUC_{(0-\infty)}$) was done by adding the value C_{12}/K_e to the calculated ($AUC_{(0-12h)}$) (where C_{12} = plasma concentration calculated from the log – linear regression equation obtained for the estimation of K_e 12 hours after dosing).

The population distribution was analyzed using histograms, normal transform value plot (NTV), probit plot and Kolmogorov – Smirnov's test. A normal distribution was accepted when no breaking point was observed in a probit or in a NTV plot, and Kolmogorov – Smirnov's test was consistent with a Gaussian distribution if $p > 0.05$ (10). Analysis of variance (ANOVA) between populations was obtained with the F- test.

Bioequivalence between both formulations was assessed by calculation individual $AUC_{(0-12h)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, C_{max} , $C_{max} / AUC_{(0-12h)}$, $t_{1/2}$ and K_e ratios (test / reference) and t_{max} differences (test – reference) together with their mean and 90% CI after log – transformation data. The inclusion of the 90% IC for the ratio in the 80 – 125% bioequivalence interval and that of the zero value in the 90% CI for the differences were analyzed using a parametric test (analysis of variance – ANOVA) for all pharmacokinetics parameters except for t_{max} , which a non – parametric test (Wilcoxon test) was used.

Software used in these analyses include WinNonlin Professional Network Edition, version 1.5m (Pharsight, Mountain View, CA, USA), Bioequivalence Program for Two – Period Crossover Studies, version 3.4 (Herman P. Wijnand, Oss, The Netherlands), Microsoft Excel version 7 (Microsoft, Redmond, WA, USA), GraphPad Prism version 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and WinSTAT version 3.1 (Kalmia Co., Inc., Karlsruhe, Germany).

Results

Linearity, precision and accuracy were determined to assess the performance of method. A linear least-squares regression with a weighting index of $1/x$ was performed on the peak area ratios of pantoprazole and carbamazepine (IS) vs. pantoprazole concentrations of the seven human plasma standards (in duplicate) to generate a calibration curve.

A Quality control sample (120, 800 and 3000 ng/mL⁻¹) was analyzed after a sequence of ten unknown samples.

The calibration curve was linear over the range 35 to 1000 ng/mL⁻¹ with a mean correlation coefficient of 0.99305. For calibration curve between-run precision was estimated from 6.4 to 21.5%, over the calibration range, and accuracy estimated from -6.2 to 5.2% over the calibration range.

No peak was observed in the mass chromatogram of human blank plasma under the LC MS/MS conditions described above.

Typical ion chromatograms (MRM) plots of a human plasma sample dose collected 3 hours after oral administration 40 mg of pantoprazole tablet are shown in Figures 1a and 1b, in which the retention time were 1.87 and 2.2 min for pantoprazole and carbamazepine, respectively.

The precision and accuracy together determine the error of an analytical measurement and are the primary criteria used to evaluate an analytical method. Assay precision was calculated by using formula $RSD(\%) = 100(SD/M)$ where M is the Mean of the experimentally determined concentrations and SD is the standard deviation of M. Accuracy is defined as the percent relative error (%RE) and was calculated using the following formula $RE(\%) = 100(E-T)*(100/T)$ where E is the experimentally determined concentration and T is the theoretical concentration [4] [24].

The lowest limit of quantification (LOQ) was 35 ng/mL^{-1} , defined as the lowest concentration at with both precision and accuracy were $< 20\%$.

The Table1. summarizes the between-run and within-run precision and accuracy results calculate for quality controls.

The between-run and within-run precision for quality controls (120, 800 or 3000 ng/mL^{-1}) was 14.9, 14.8, 14.6% and 8.6, 9.6, 10.9%, respectively. In the same way, the between-run and within-run accuracy for quality controls (120, 800 or 3000 ng/mL^{-1}) was 2.3, -5.4, -5.9% and -1.9, -4.2, -0.2%, respectively.

Both pantoprazole formulations were well tolerated at the administered dose. The subject's biochemical parameters were unchanged and within the reference range at the end of the study. One volunteer during the first test confinement had severe urticaria during the first confinement and facial eritema during the first test and second confinement, whose symptom relation to the formulation is unknown. He has been treated with betametasone during the first confinement.

The pantoprazole plasma concentrations (mean $\pm$ SD) – versus – time curves obtained after the single oral administration of each pantoprazole tablets formulations are show in Figure 6.

The table 2. summarizes the geometric mean and 90% CI values for $AUC_{(0-12h)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, Ke , $t_{1/2}$, C_{max} , and $C_{max}/AUC_{(0-12h)}$. T_{max} is expressed as the median and range. Table 3 shows the statistical analysis of bioequivalence for individual $AUC_{(0-12h)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, Ke , $t_{1/2}$, C_{max} , and $C_{max}/AUC_{(0-12h)}$ ratio and individual t_{max} differences (arithmetic mean and 90% CI), for both pantoprazole formulations. No periodo effect was observed for any of the above pharmacokinetic parameters (data not shown).

Discussion

The analytical method described here for the determination of pantoprazole confirms that LC MS/MS improve the sensitivity and specificity of the results and sample throughput. In addition, the analytical validation results are in accordance

with acceptance criteria for Bioanalytical Method Validation presents in several Guidances of Regulatory Authorities [17][18] [24][33][34].

Based on these considerations and obtained results, we conclude that the method is precise, accurate and is suitable for routine analysis of the pantoprazole in human plasma.

As shown in table 2., mean $AUC_{(0-12h)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, K_e , $t_{1/2}$, C_{max} , and $C_{max}/AUC_{(0-12h)}$ and t_{max} values obtained for each formulation as assessed by the overlapping observed in the 90% confidence interval (CI) of the geometric means.

Table 3. shows that 90% CI of mean $AUC_{(0-12h)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, C_{max} , and $C_{max}/AUC_{(0-12h)}$ (after the log-transformation of individual ratios) were included into the range of bioequivalence, i.e 80-125% when analyzed by either parametric and non-parametric statistics. These results mean that both formulations are clearly bioequivalent for the extent of absorption, as stated by the U.S Food and Drug Administration Authorities [1985,1993].

In the same way, individual t_{max} differences were statistically different from zero as shown by the 90% CI it's obtained by parametric and non-parametric statistics. However, these results obtained on individual t_{max} differences make that 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 that rate, but also the extent of absorption, as evidence by the high correlation observed with the parameter AUC, and proposed that the ratio C_{max}/AUC should be 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” [32].

As shown in table 3., the mean t_{max} values for two 40 mg pantoprazole tablet formulations are 2.3 and 2.5h with wide intervals 1-5h for both formulations.

In conclusion, the application of either parametric or non-parametric statistics reveals the presence of bioequivalence between both pantoprazole formulations for the rate and extent of absorption as required by the U.S Food and Drug Administration Regulations [1985,1993].

References

- [1] Fitton A and Wiseman L (1996). A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Acid-Related Disorders. *Drugs* 51(3): 460-482.
- [2] Pue MA, Laroche J, Meineke I and de Mey C (1993). Pharmacokinetics of pantoprazole following single intravenous and oral administration to healthy male subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 44 (6): 575-578.
- [3] Simon WA, Keeling DJ, Laing SM, Fallowfield C and Taylor AG (1990). BY 1023/SK&F 96022: biochemistry of a novel ($H^{+} + K^{+}$)-ATPase inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* 39: 1799-1086.
- [4] Simon B, Müller P, Bliesath H, Lühmann R, Hartmann M, Huber R and Wurst W (1990). Single intravenous administration of the H^{+} , K^{+} -ATPase inhibitor BY 1023 / SF&F 96022 – inhibitor pentagastrin – stimulated gastric acid secretion and pharmacokinetics in man. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 4: 239-245.
- [5] Huber R, Kohl B, Sachs G, *et al.* (1995). The continuing development of proton pump inhibitors, with particular reference to pantoprazole. *Aliment Pharmacol. Ther.* 9: 363-378.

- [6] Simon B, Müller P, Marinis E, *et al.* (1990). Effect of repeated oral administration of BY 1023'SK&F 96022 – a new substituted benzimidazole derivative – on pentagastrin-stimulated gastric acid secretion and pharmacokinetics in man. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 4: 373-379.
- [7] Food and Drug Administration (1993). In vivo bioequivalence guidances. *Pharmacopeial Forum* 19: 6501-6508.
- [8] Tucker GT (1994). The interaction of proton pump inhibitors with cytochromes P450. *Aliment Pharmacol. Ther.* 8 (Suppl 1): S33-S38.
- [9] Peeters PAM, Ooterhuis B, Zech K, *et al.* (1993). Pantoprazole pharmacokinetics and metabolism after oral and intravenous administration of ¹⁴C labeled pantoprazole to young healthy male volunteers [abstract]. *Pharm. World. Sci.* 17 (Suppl 15): L-L7.
- [10] Lins RL, de Clercq I, Hartmann M, *et al.* (1994). Pharmacokinetics of the proton pump inhibitor pantoprazole in patients with several renal impaired. *Gastroenterology* 106: 126 [abstract].
- [11] Brunner G, Chang J, Hartmann M, *et al.* (1994). Pharmakokinetik von Pantoprazole bei Patienten mit Leberzirrhose. *Med. Klin.* 89 (Suppl 1): 189.

- [12] Breuel HP, Hartmann M, Bondy S, *et al.* (1994). Pantoprazole in the elderly: no dose-adjustment [abstract]. *Gut*. 35 (Suppl 4): 77.
- [13] Ferron *et al.* (1999). Lack of Pharmacokinetics Interaction between Oral Pantoprazole and Cisapride in Healthy Adults. *J. Cli. Pharmacol.* 39: 945-950.
- [14] Barrientos-Astigarraga RE, Vannuchi YB, *et al.* (2001). Quantification of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence studies. *J. Mass Spectrom.* 36: 1281-1286.
- [15] Dalla GE, Wilkinson L (1986). An analytical approximation to the distribution of Lilliefors's test statistic for normality. *Am. Statistician* 40: 294-296.
- [16] Food and Drug Administration (1985). Bioavailability and Bioequivalence Requirements. *Federal Register* part 320: 154-173.
- [17] Food and Drug Administration (1998). Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. *Guidance for Industry* - final draft.
- [18] Food and Drug Administration (2001). Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. *Guidance for Industry* - final draft.

- [19] Hauschke D, Steinijans VM, Diletti E (1990). A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 28: 72-78 .
- [20] Huang HC, Wachs T, Conboy JJ, Henion JD (1990). The quantification of drugs in biological matrices by LC/MS/MS is becoming more usual, improving sensitivity and selectivity of methods. *Anal. Chem.* 62(13): 713.
- [21] Huber R and Müller W (1990). High-performance liquid chromatographic determination of the H^+ / K^+ ATPase inhibitor (BY 1023/SK&F 96 022) and its sulphone metabolite in serum or plasma by direct injection and fully automated pre-column sample clean-up. *J. Chromatogr.* 529: 389-401.
- [22] Huber R, Hartmann M, Bliesath H, *et al.* (1996). Pharmacokinetics of pantoprazole in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 34(5): 185-194) / 34 (Suppl 1): S7-S16.
- [23] Erlich A, Fuder H, Hartmann M, *et al.* (1996). Lack of pharmacodynamic and pharmacokinetic interaction between pantoprazole and phenprocoumon in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 51: 277-281.
- [24] Karnes HT, Shiu G, Shan VP (1991). Review: Validation of Bioanalytical Methods. *Pharmaceutical Research* 8(4): 421-426.

- [25] Doyle E, Huber R, and Picot VS (1992). Direct injection / h.p.l.c methods for the analysis of drugs in biological samples. *Xenobiotica* 22(7): 765-774.
- [26] Martins ML, Moraes LA, Ribeiro W, *et al.* (1997). Comparative bioavailability of two atenolol tablet formulations in healthy male volunteers after a single dose administration. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 35(8): 324-328.
- [27] Marzo A (1995). Bioequivalence: An updated reappraisal to applications of interchangeable multi-source pharmaceutical products. *Arzneim-Forsch. Drug Res.* 45: 109-15.
- [28] Moraes LA, Lerner FE, Moraes ME, Moraes MO, Corso G, De Nucci G (1999). Fluconazole Bioequivalence Study: Quantification by Tandem Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring* 21: 200-207.
- [29] 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.
- [30] Doyle E, Mc Dowall RD, Murkitt GS, Picot VS and Rogers SJ (1990). Two systems for the automated analysis of drugs in biological fluids using high – performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 527: 67-77.

- [31] Basson RP, Cerimele BJ, Desante KA, Howey DC (1996). $T_{\max}$: An unconfound metric for rate of absorption in single dose bioequivalence studies. Midha & Nagai (Editors). In: "*Bio International: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics*," International Conference of F.I.P. "Bio-International 96" held in Tokyo, Japan, April 22-24, 90-93.
- [32] Salmonson T (1997). Current of BA/BE requirements for immediate release products in the EU. Abstract Proceedings from "*Bio International: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics*," International Conference of F.I.P. "Bio-International 96", Tokyo, Japan: Business Center for Academic Societies, 16-19.
- [33] Shan VP, Midha KK, Dighe SV, *et al.* (1992). Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics Studies (Conference Report). *Pharmaceutical Research* 9: 588-592.
- [34] Shan VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, *et al* (2001) Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research* 17 (12): 1551-1557.
- [35] Bliesath H, Huber R, Hartmann M, Lühmann R and Wurst W (1996). Dose Linearity of the pharmacokinetics of the new H^+/K^+ ATPase inhibitor pantoprazole

after single intravenous administration. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 32(1): 44-50 / 34 (Suppl 1): S18-S24.

[36] Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M (1996). A strategy for validation of bioanalytical methods. *J. Pharm. And Biomed. Anal.* 14: 375-88.

[37] Endrenyi L, Fristsch S, Yan W (1991). $C_{\max}$ /AUC is a clearer measure than $C_{\max}$ for absorption rates investigations of bioequivalence. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 29: 394-399.

[38] Steinijans VW, Huber R, Hartmann M, Zech K, *et al.* (1996). Lack of pantoprazole drug interactions in man: an updated review. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 34 (Suppl 1): S31-S50.

[39] Tanaka M and Yamazaki H (1996). Direct Determination of Pantoprazole Enantiomers in Human Serum by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Using a Cellulose-Based Chiral Stationary Phase and Column-Switching System as a Sample Cleanup Procedure. *Anal. Chem.* 68: 1513-1513.

[40] Tanaka M, Yamazaki H and Hokusui H (1995). Direct HPLC Separation of Enantiomers of Pantoprazole and Other Benzimidazole Sulfoxides Using Cellulose-Based Chiral Stationary Phases in Reversed-Phase mode. *Chirality* 7: 612-615.

[41] Tanaka M *et al.* (2001). Stereoselective pharmacokinetics of pantoprazole, a proton pump inhibitor, is extensive and poor metabolizers of S-mephenytoin. *Clin. Pharmacol. & Ther.* 69(3): 108-113.

[42] De Oliveira CH, Barrientos-Astigarraga, RE, *et al.* (2001). Terbinafine Quantification in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry: Application to a Bioequivalence Study. *Therapeutic Drug Monitoring* 23: 709-716.

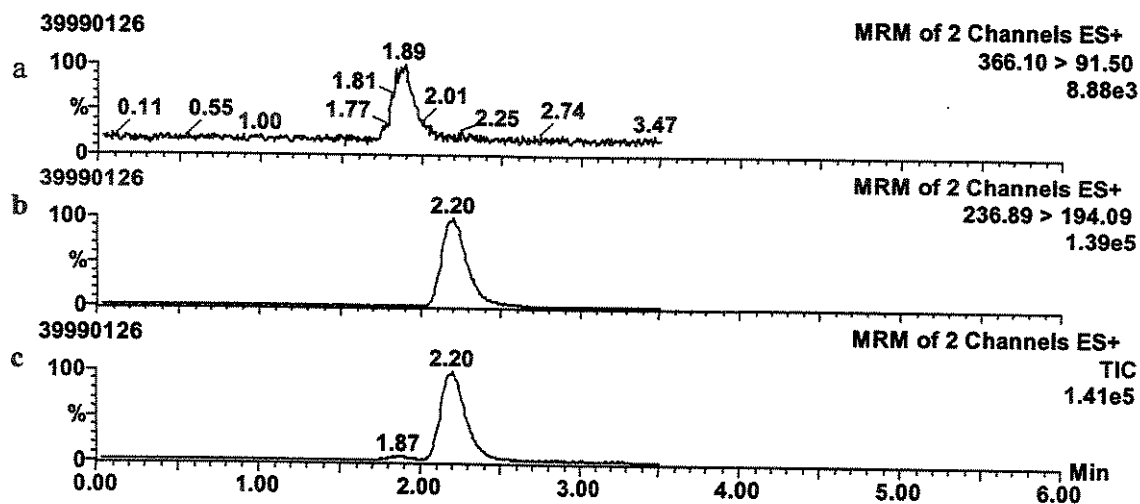


Fig.1 Selected ion chromatograms (MRM) showing peak retention times. (a) Pantoprazole (MRM of two channels; ES+ 366.10 > 91.50). (b) Carbamazepine (MRM of two channels; ES+ 236.89 > 194.09). (c) TIC = Pantoprazole (MRM: 366.10 > 91.50) and Carbamazepine (MRM: 236.89 > 194.09).

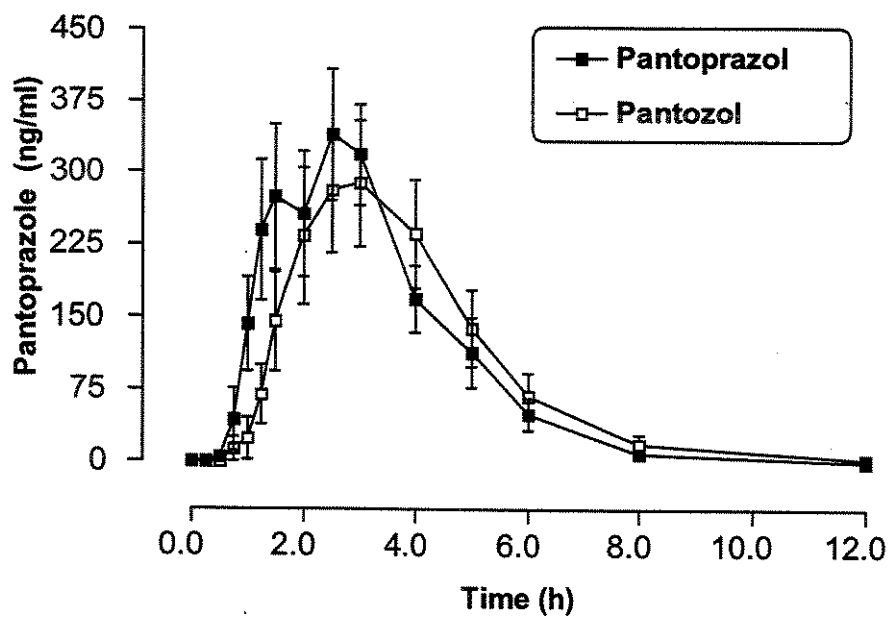


Fig.2 Pantoprazole concentration-versus-time curve. The data are the mean $\pm$ SD of 22 volunteers.

Level (ng/mL ⁻¹)	Between-run plasma quality control report			Within-run plasma quality control report		
	120	800	3000 [*]	120	800	3000 [*]
n	34	39	34	7	8	7
Mean	122.8	756.2	564.2	117.6	765.7	595.1
SD	18.4	112.2	82.9	10.1	73.5	65.2
^a RSD (%)	14.9	14.8	14.6	8.6	9.6	10.9
^b RE (%)	2.3	-5.4	-5.9	-1.9	-4.2	-0.8

^a Precision was determined as the relative standard deviation, $RSD(\%) = 100(SD/M)$.

^b Accuracy was determined as the percent relative error. $RE(\%) = 100(E-T) \cdot (100/T)$.

* Quality control sample concentration was diluted to 1:5 for quantification.

Table 1. Analytical quality controls report of pantoprazole.

Parameter	Pantoprazol *	Pantozol δ
ASC _[0-12] (ng.h.mL ⁻¹)	949.9	908.7
Geom. Mean	726.2 – 1242.6	683.5 – 1208.1
90% IC		
ASC _[0-∞] (ng.h.mL ⁻¹)	971.2	1071.1
Geom. Mean	755.6 – 1247.3	831.0 – 1380.0
90% IC		
C _{max} (ng.h.mL ⁻¹)	524.2	525.2
Geom. Mean	416.8 – 659.1	400.1 – 689.5
90% IC		
C _{max} / ASC _[0-12] (μg.h.mL ⁻¹)	0.6	0.6
Geom. Mean	0.5 – 0.7	0.6 – 0.7
90% IC		
t _{1/2} (h)	0.949	0.882
Geom. Mean	0.797 – 1130.0	0.725 – 1073.0
90% IC		
K _e (h ⁻¹)	0.729	0.775
Geom. Mean	0.614 – 0.867	0.642 – 0.936
90% IC		
T _{max} (h)	2.3	2.5
Median	1.0 – 5.0	1.0 – 5.0
Range		

* Merck Pharmaceuticals Inc., Brazil

δ Byk Chemical and Pharmaceuticals Inc., Brazil

AUC, area under the curve; K_e, elimination rate constant; t_{1/2}, half-life

Table 2. Mean pharmacokinetic parameters obtained from 22 volunteers after administration of each pantoprazole tablet formulation (40mg).

Parameter	Pantoprazol/Pantozol % ratios	
	Parametric	Non-Parametric ^a
ASC _[0-12] (ng.h.mL ⁻¹)		
Geom. Mean	105.5	104.3
90% IC	95.2 – 116.8	93.9 – 117.7
ASC _[0-∞] (ng.h.mL ⁻¹)		
Geom. Mean	102.6	102.0
90% IC	91.5 – 115.1	89.1 – 114.8
C _{max} (ng.h.mL ⁻¹)		
Geom. Mean	99.8	98.9
90% IC	88.2 – 112.8	88.3 – 114.2
C _{max} / ASC _[0-12] (ng.h.mL ⁻¹)		
Geom. Mean	105.6	105.4
90% IC	99.7 – 111.9	97.9 – 112.4
t _{1/2} (h)		
Geom. Mean	108.5	106.1
90% IC	89.9 – 130.8	96.6 – 118.3
Ke (h ⁻¹)		
Geom. Mean	107.0	105.5
90% IC	89.4 – 128.0	93.4 – 118.0
t _{max} (h)		
Median Range	-0.542 ^b	-5.00
90% IC	-1.057-0.027 ^c	-1.25 – 0.00

^a According to Hauschke et. al. [19] and the FDA [15,16], non-parametric results are expressed as point estimate and 90% CI of individual ratios, except for t_{max} (expressed as point estimate and 90% CI of individual differences)

^b Arithmetic mean of individual differences

^c 90% CI of individual differences

Table 3. Statistical analysis of individual AUC_(0-12h), AUC_(0-∞), C_{max}, C_{max}/AUC_(0-12h), Ke, t_{1/2} ratios and t_{max} individual differences, for the two pantoprazole formulations.

Legends

Figures

Fig.1. Selected ion chromatograms (MRM) showing peak retention times. (a) Pantoprazole (MRM of two channels; ES+ 366.10 > 91.50). (b) Carbamazepine (MRM of two channels; ES+ 236.89 > 194.09). (c) TIC = Pantoprazole (MRM : 366.10 > 91.50) and Carbamazepine (MRM: 236.89 > 194.09).

Fig.2. Pantoprazole concentration-versus-time curve. The data are the mean $\pm$ SD of 22 volunteers.

Tables

Table 1. Analytical quality controls report of pantoprazole.

Table 2. Mean pharmacokinetic parameters obtained from 22 volunteers after administration of each pantoprazole tablet formulation (40mg).

Table 3. Statistical analysis of individual $AUC_{(0-12h)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, C_{max} , $C_{max}/AUC_{(0-12h)}$, K_e , $t_{1/2}$ ratios and t_{max} individual differences, for the two pantoprazole formulations.