

Wellington Ribeiro

**DETERMINAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE
DUAS FORMULAÇÕES DE MALEATO DE ENALAPRIL**

**Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da
Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia**

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Campinas

1996

R354d

28270/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA ESCOLAR

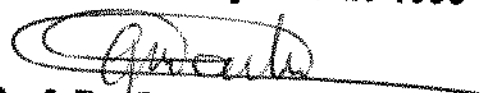
Wellington Ribeiro

**DETERMINAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE
DUAS FORMULAÇÕES DE MALEATO DE ENALAPRIL**

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Campinas
Este exemplar corresponde à versão final da
tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de
Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, na Área de
Farmacologia do Farmacêutico Bioquímico
Wellington Ribeiro.

Campinas, 14 de junho de 1996



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

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

1. Prof. Dr. Gilberto de Nucci

2. Prof. Dr. Roberto Soares de Moura

3. Profa. Dra. Vera Lúcia Ramchote

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

Data:

14/06/96

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo estímulo, confiança e apoio recebidos.

A Lisa pela paciência e amor

Ao Dr. Marcelo Nicolas Muscará pela orientação técnica e científica recebida ao longo da realização deste trabalho, principalmente pela amizade e disponibilidade de tempo.

Ao Prof. Antônio Roberto Martins do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - USP Ribeirão Preto pela purificação dos reagentes utilizado no Radioimunoensaio.

Aos amigos Anicleto Poli, Heitor Moreno Júnior, Leonardo Augusto Moraes, Luciana Nathan, Sócrates Calvoso Penna, pela grande amizade e ajuda.

Aos colegas Evandro L. Miranda e Heide B. Dias pelo precioso auxílio técnico.

Agradeço aos demais professores e colegas do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, principalmente às secretárias Dora, Gislene, Rita e Solange.

Ao CNPq pelo apoio financeiro recebido mediante a concessão da bolsa de mestrado.

Ao Dr. M. Hichens, Merck Sharp & Dhome Research Laboratories, USA pelo fornecimento do específico anticorpo e do composto MK351A.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pela oportunidade, orientação e exemplo de comportamento (bom senso) diante das dificuldades que a vida nos coloca.

SUMÁRIO

RESUMO

Pag.

Capítulo I - Biodisponibilidade e Bioequivalência

1 - Introdução Geral	02
2 - Definições	04
3 - Parâmetros para avaliação da biodisponibilidade	05

Capítulo II - Estudo de Bioequivalência de duas formulações de Maleato de Enalapril

1 - Introdução	07
2 - Objetivos	21
3 - Materiais e Métodos	23
4 - Resultados	31
5 - Discussão	45
6 - Referências Bibliográficas	52
7 - Anexo	65

ABSTRACT

RESUMO

Neste trabalho avaliamos a bioequivalência entre duas formulações de comprimidos de maleato de enalapril (Eupressin[®] comprimidos, 10 mg, obtido do laboratório Biosintética versus Renitec[®] comprimidos, 10 mg, obtido do laboratório Merck Sharp & Dhome, utilizado como formulação referência).

Dezoito voluntários adultos sadios do sexo masculino receberam 20 mg de maleato de enalapril (2 comprimidos de 10 mg cada) e a bioequivalência entre ambas as formulações foi mensurada comparando a concentração no soro de enalaprilato e enalapril total (enalaprilato mais enalapril) em função do tempo. A atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi determinada no soro utilizando ensaio espectrofotométrico. Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram obtidos para cada formulação: Área sob a curva da concentração plasmática em função do tempo de 0 a 24 h ($AUC_{[0-24]}$), máxima concentração alcançada (C_{max}) e o tempo no qual a mesma ocorreu (T_{max}).

Quando a concentração no soro de enalaprilato em função do tempo foi empregada para mensurar a bioequivalência, ambas as formulações foram bioequivalentes quanto a extensão de absorção ($AUC_{[0-24]}$), porém o mesmo não ocorreu para a velocidade de absorção (C_{max}). Contudo, nenhuma diferença quanto a extensão ou taxa de absorção foi observada quando a concentração plasmática de enalapril total em função do tempo foi empregada para mensurar a bioequivalência. A curva da atividade da enzima conversora de angiotensina

em função de tempo foi similar para ambas as formulações. Após 3 a 5 horas de administração do maleato de enalapril, observou-se uma inibição de 90% da atividade enzimática e esta inibição permaneceu em torno de 50% após 24h da administração. Neste mesmo tempo os níveis plasmáticos de enalaprilato e enalapril total foram cerca de 10 vezes menores do que o C_{max} . Estes resultados mostram que o modelo farmacodinâmico trata-se de modelo inadequado para avaliar a bioequivalência de duas preparações comerciais de maleato de enalapril.

Assim, o modelo farmacocinético, baseado na curva da concentração plasmática do enalapril total versus tempo é mais adequado. Outras pró-drogas devem ser analisadas individualmente.

Capítulo I

Biodisponibilidade e Bioequivalência

INTRODUÇÃO GERAL

A busca de novos medicamentos envolve anos de pesquisa e grandes investimentos das indústrias farmacêuticas visando a fornecer novas alternativas terapêuticas à classe médica e à população. Quando uma indústria encontra novas drogas ou classes terapêuticas eficientes, seguras e de importante emprego clínico, outras tendem a usá-las, respeitando ou não seu patenteamento. Elas produzem equivalentes farmacêuticos que serão lançados no mercado, muitas vezes sem os respectivos estudos que comprovem as mesmas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do produto original.

No Brasil, o controle sanitário do mercado de medicamentos tem deixado a desejar, ao ponto de o próprio Ministério da Saúde não saber com exatidão o número de especialidades farmacêuticas disponíveis no país, nem sua qualidade e segurança. Assim os estudos de bioequivalência, vêm contribuir decisivamente na melhoria da assistência farmacêutica exigida pelo decreto 793/93, principalmente em relação aos genéricos, tão necessários à população para tratamento de suas doenças, avaliando a qualidade de diferentes especialidades farmacêuticas que possuem em suas formulações princípios ativos básicos iguais.

Um importante princípio em farmacologia apregoa que a resposta terapêutica da grande maioria dos fármacos depende fundamentalmente da interação entre suas moléculas com receptores farmacológicos específicos. Contudo, é fato perfeitamente conhecido que a relação existente dose e efeito de fármacos é muito variável entre os indivíduos. Tais variações dependem não só da dose, da gravidade da doença, das funções cardíaca-hepática-renal, da motilidade gastrintestinal, da atividade hormonal e da farmacocinética do fármaco. Assim, várias fases estão envolvidas na resposta terapêutica do fármaco:

I - Fase Farmacêutica**II - Fase Farmacocinética****III - Fase Farmacodinâmica****I - Fase Farmacêutica**

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

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

II - Fase farmacocinética

Compreende a absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos fármacos. Nesta fase convém destacar que a intensidade do efeito farmacológico geralmente correlaciona-se com a concentração do fármaco livre no sangue, servindo de parâmetro para indicar o grau de ocupação dos receptores envolvidos no efeito do fármaco.

III - Fase farmacodinâmica

Compreende a interação de moléculas do fármaco livre com os receptores farmacológicos específicos. Destaca-se, entretanto, que o efeito farmacológico de um fármaco depende, entre outros fatores, de sua concentração na biofase dos receptores e no local de ação propriamente dito. Em alguns fármacos, como os antibióticos e antiinflamatórios por exemplo, a eficácia clínica está relacionada com suas capacidades em atingir as áreas afetadas, sendo que em regiões pouco vascularizadas ocorrem respostas terapêuticas inadequadas. Para esses casos, o fármaco de escolha, bem como sua forma farmacêutica de apresentação, deverão ser aqueles que propiciem não só o aparecimento de níveis sanguíneos mais elevados mas, principalmente, que garantam maior concentração do fármaco no local de ação.

2) DEFINIÇÕES

Biodisponibilidade é a velocidade e quantidade à qual o ingrediente ativo de uma droga ou espécie terapêutica é absorvido a partir de um produto farmacêutico para ser disponível no sítio de ação da droga. A biodisponibilidade usualmente é determinada por medida: 1) da concentração do ingrediente ativo da droga, ou espécie terapêutica, ou do(s) seu(s) metabólito(s), em fluidos biológicos, como uma função do tempo; 2) da excreção urinária da espécie terapêutica ou do(s) seu(s) metabólito(s), como uma função do tempo, ou 3) de um efeito farmacológico agudo apropriado. A aproximação mais sensível, exata e reproduzível para determinar a biodisponibilidade de um produto é o teste *in vivo* em humanos, por medida da concentração do ingrediente ativo da droga ou espécie terapêutica ou do(s) seu(s) metabólito(s), em sangue total, plasma, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo. Esta aproximação é particularmente aplicável a aquelas formas que fornecem o ingrediente ativo da droga ou espécie terapêutica à corrente sanguínea para distribuição sistêmica dentro do corpo, como por exemplo, drogas injetáveis, a

maioria das formas orais, a maioria dos supositórios, certas drogas administradas por inalação, e algumas drogas administradas por aplicação local nas membranas mucosas.

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

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

3) PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE

Existem métodos diretos e indiretos para determinar a biodisponibilidade em humanos. A escolha de um método depende do estudo proposto, do método analítico de determinação da droga e da natureza do produto da droga. Os parâmetros que são úteis em determinar a biodisponibilidade de uma droga, a partir de uma determinada formulação farmacêutica são:

- I Tempo da concentração plasmática máxima atingida (T_{max})
- II Concentração máxima atingida no plasma (C_{max})
- III Área sob curva da concentração-tempo plasmática (AUC)

Capítulo II

**Estudo de Bioequivalência
de
duas formulações de Maleato de Enalapril**

INTRODUÇÃO

O controle da hipertensão é um fator chave na redução do risco de morbidade cardiovascular, incapacitação e morte prematura. A administração de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma das mais novas abordagens no tratamento farmacológico desta patologia (Vertes & Haynie, 1992). Os inibidores da ECA foram inicialmente desenvolvidos a partir de estudos racionais da relação estrutura-atividade do sítio ativo da enzima (Ondetti, 1988). Estes estudos foram conduzidos após a descoberta do peptídeo inibidor da cininase II, encontrada no veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (Ferreira, 1965).

A caracterização e síntese deste peptídeo resultou no nonapeptídeo, teprotide, presente no "Fator Potencializador de Bradicinina". Este nonapeptídeo não sofre degradação pela ação da ECA, devido estar o aminoácido prolina na penúltima posição do grupo terminal carboxil. Outro fator importante é a forte interação do teprotide com a ECA, uma vez que os resíduos dos aminoácidos deste composto apresentam maior afinidade por esta enzima do que para os substratos endógenos (Ang I ou Bradicinina).

Baseado na estrutura química da carboxipeptidase, Cushman e Ondetti sintetizaram várias substâncias com capacidade de inibir a ECA e estabeleceram alguns estudos de relação estrutura-atividade entre elas. Destes estudos originou-se o captopril, o primeiro composto com atividade capaz de inibir a ECA, com ação por via

oral (Laragh, 1977; Cushman et al, 1978; Ondetti & Cushman, 1982; Laragh, 1984; Shapiro et al, 1984).

O captopril, [1-2(s)-(3-mercaptopropanoil)-L-prolina] apresenta na sua molécula um dipeptídeo carboxi-terminal, semelhante ao encontrado no Teprotide, e um radical sulfidrílico (Kinoshita et al, 1986). A presença deste radical confere a molécula maior potência inibitória, contudo é um importante fator que contribui para o aumento de reações adversas (Patchett & Tristram, 1980). Baseado nestas considerações Patchett et al (1980) desenvolveram um segundo inibidor da ECA, o Enalapril.

1) DEFINIÇÃO E ESTRUTURA QUÍMICA

O Enalapril (MK-421), (N-[(s)-1-(etoxicarbonil)-3-fenil-propil]-L-alanil-prolina) (Gomez et al, 1985; Kelly et al, 1986; Edeki et al, 1993), é uma pró-droga que após sua absorção é hidrolisado no fígado em sua forma ativa Enalaprilato (MK-422), um potente inibidor da ECA (Lowewnthal, 1985; Frishman, 1990 e Gross, 1980).

O Enalapril é comercializado sob a forma de Maleato de Enalapril [N-(1-S-1-carboxi-3-fenilpropil)S-alanil-S-prolina])(Ferguson et al, 1982), o que possibilita maior absorção gastrointestinal da droga quando comparada com o Enalaprilato (Todd & Go, 1992 e Macfadyen, 1993). A fig. 1 mostra as estruturas químicas do Enalapril, Enalaprilato e do Maleato de enalapril.

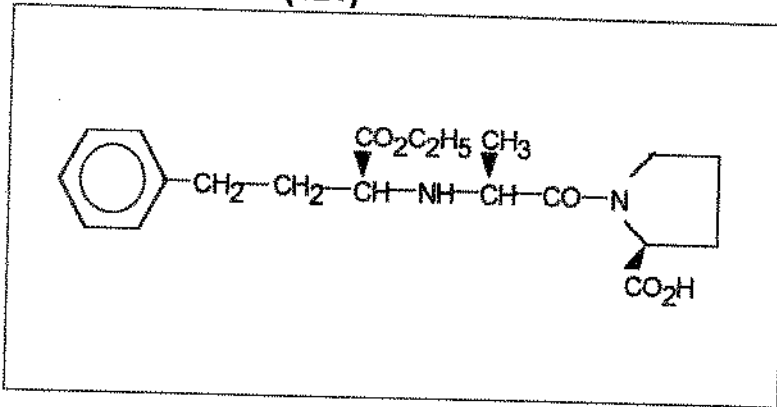
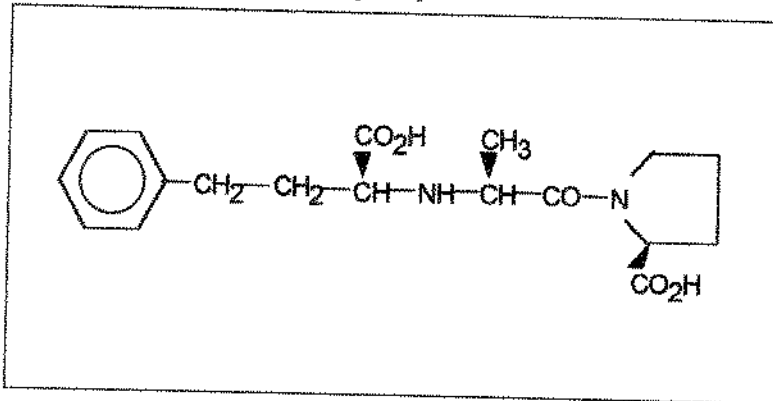
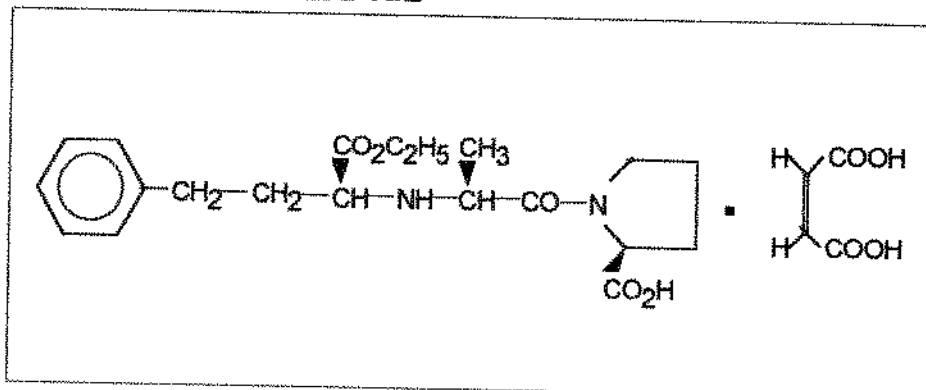
ENALAPRIL - MK(421)**ENALAPRILATO - MK(422)****MALEATO DE ENALAPRIL**

Fig.1 - Estruturas químicas do Enalapril, Maleato de enalapril e sua forma ativa Enalaprilato.

2) O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O sistema renina-angiotensina-aldosterona exerce importante papel na homeostase cardiovascular. Este sistema tem sido relacionado com grande número de desordens cardiovasculares e atualmente tem despertado grande interesse em terapêutica cardiovascular (Deav, 1988; Todd & Heel, 1986 e Kelly & O'Malley, 1990)

A renina é sintetizada nas células justaglomerulares que estão localizadas no glomérulo renal. Esta estrutura é denominada Aparelho Justaglomerular (Hollenberg, 1990).

A renina secretada na circulação atua sobre o peptídeo Angiotensinogêneo, uma α_2 -globulina sintetizada no fígado para produzir o decapeptídeo Ang I (Kelly & O'Malley, 1990 e Dzau, 1990). Este decapeptídeo sofre a ação da ECA originando o octapeptídeo, angiotensina II (Ang II), um potente agente vasopressor.

3) FARMACODINÂMICA

O Enalaprilato compete com o substrato fisiológico (Ang I) pelo sítio ativo da ECA, inibindo assim a conversão do pró-hormônio Ang I para o ativo hormônio vasopressor Ang II (Fig. 2) e, conseqüentemente, diminuindo a pressão arterial em parte por redução da vasoconstrição (Belz et al, 1988 e Todd, 1992).

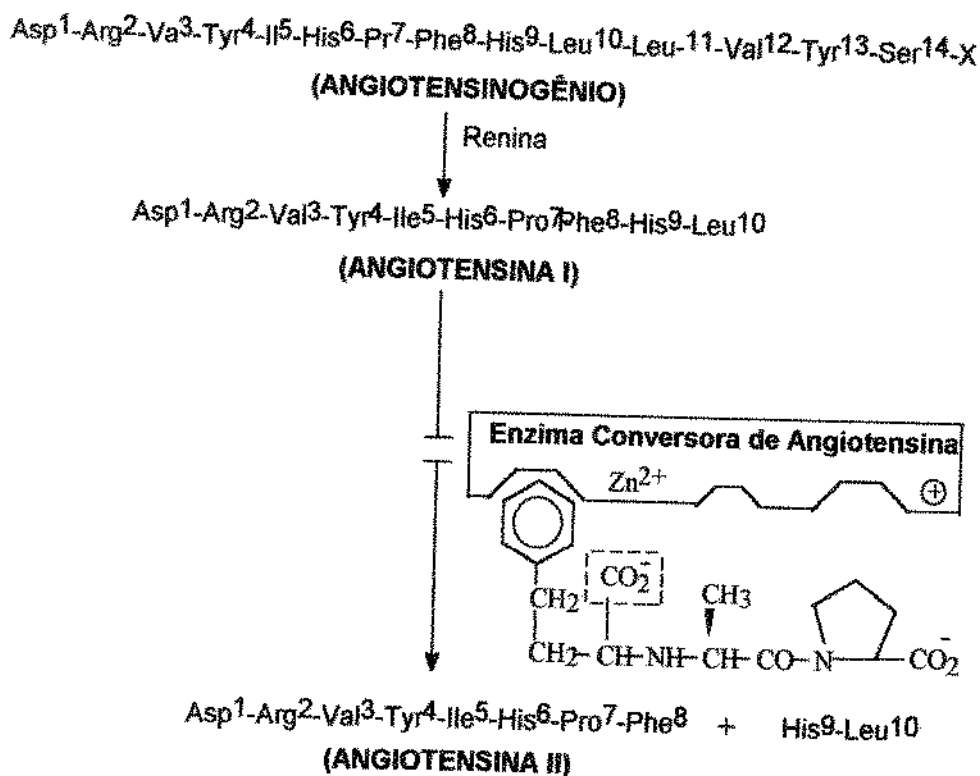


Fig.2 - Modelo hipotético do sítio ativo da ECA e a interação do Enalaprilato com o ion zinco que apresenta um grupo positivamente carregado.

Estudos *in vitro*, em base molar, demonstram que a afinidade do Enalaprilato pela ECA é 300 a 1000 vezes maior que a do Enalapril (Chen et al, 1984 e Unger et al, 1982) e 2 vezes maior que a do Captopril (Patchett et al, 1980; Unger et al, 1982 e Nakashima et al, 1982), sendo o Enalaprilato potente inibidor reversível da ECA plasmática e tecidual (Todd, 1992).

O máximo de inibição da ECA pela droga é observado 2 a 4 horas após a administração, persistindo por mais de 24 horas. (Brunner et al, 1981).

A consequência biológica desta inibição é a redução no plasma dos níveis de Ang II e aldosterona com aumento simultâneo da atividade da renina plasmática

(Hodsman et al, 1984; Jackson, et al, 1982; Shoback et al, 1993 e Ferguson et al, 1982). O aumento da atividade da renina plasmática está possivelmente relacionado com o resultado da perda do mecanismo de retro-alimentação (feed-back) negativa, mediada por Ang II, na liberação de renina pelos rins (Clauser et al, 1983; McCaa & Gillespe, 1984 e Schiffrin et al, 1984).

Muitos estudos indicam que a redução da concentração plasmática de aldosterona é um efeito agudo da administração do Enalapril, retornando a níveis séricos normais durante tratamento prolongado (Hodsman et al, 1983; Johnston et al, 1984 e Sanchez et al, 1985).

Dados experimentais evidenciam que a inibição do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) plasmático exerce importante papel no início do tratamento. Contudo, no tratamento crônico as ações anti-hipertensivas do Enalapril não são acompanhadas somente de mudanças nos índices de inibição do SRA, não podendo ser assim entendidas exclusivamente pela inibição da ECA plasmática (Unger & Gohlke, 1994; Todd & Goa, 1992; Crantz et al, 1980 e Mento et al, 1987). Estudos realizados em animais com hipertensão e falência cardíaca após tratamento crônico com Enalapril demonstram que os níveis da ECA circulatório e teciduais apresentam-se alterados por terapia crônica, sendo os efeitos benéficos provavelmente um resultado da interação de múltiplos mecanismos de ação da droga sobre os órgãos alvos na falência cardíaca e outros estados patofisiológicos. Alguns destes efeitos podem ser atribuídos a habilidade do Enalapril de alterar a expressão ou atividade do SRA tecidual (Hirsch et al, 1992).

3.1 Efeitos no sistema Caliceína-cinina

Muitos estudos consideram o sistema Caliceína-cinina-prostaglandina como possível mecanismo envolvido nas ações do Enalapril (Yang et al, 1993; Vanhoutte et al, 1993 e Todd & Goa, 1992).

Pelo fato de que a ECA também degrada a Bradicinina (BK), o Enalapril pode teoricamente potencializar as ações da BK, estimulando assim a liberação de mediadores vasodilatadores derivados do endotélio, incluindo óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio e prostaciclina (Unger & Gohlke, 1994; Vanhoutte et al, 1993 e Todd & Goa, 1992). A figura 3 mostra a interrelação entre os sistemas renina-angiotensina, caliceína-cininas e prostaglandinas (PGI_2 e PGE_2).

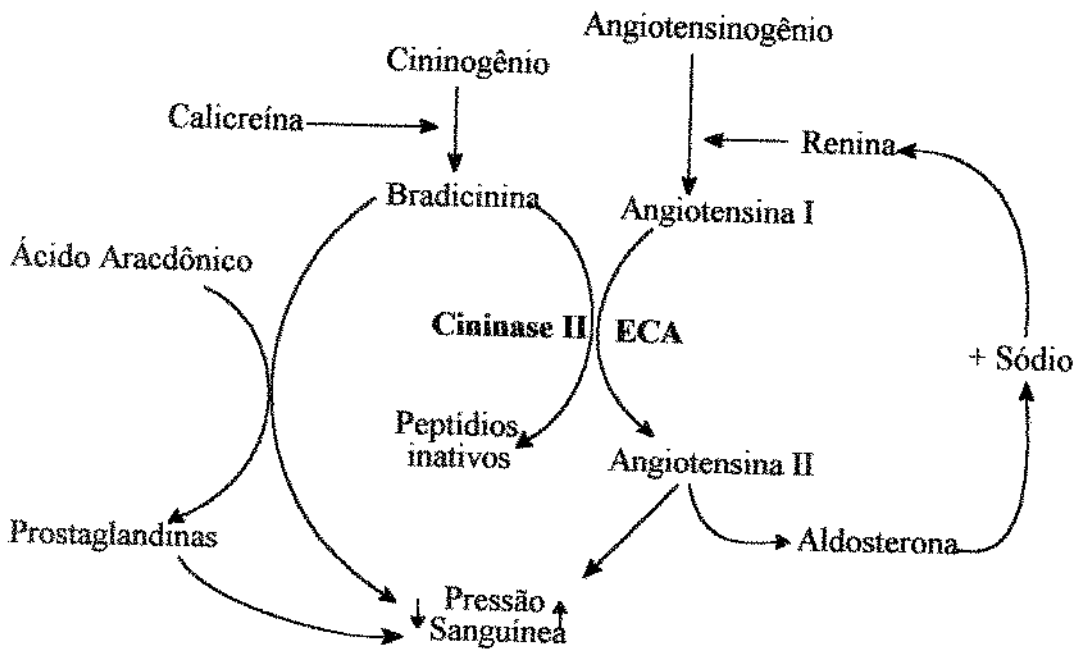


Fig.3 - Interrelação entre os sistemas renina-angiotensina, caliceína-cininas e prostaglandinas (PGI_2 e PGE_2)

Experimentos realizados por Yang et al (1993) demonstram que o Enalaprilato aumenta acentuadamente a sensibilidade para BK nas veias safenas, porém isto não ocorre para as artérias mamárias. Os novos aspectos deste estudo é que a ECA pode afetar significativamente a resposta vascular local para BK e Ang I, contudo este mecanismo pode diferir ao longo da circulação. De particular interesse clínico neste contexto é que este mecanismo foi efetivo em veias safenas humanas, sendo de grande importância para pacientes com falência cardíaca, nos quais o aumento da atividade da BK pode contribuir para queda na resistência vascular (Yang et al, 1993).

Contudo, os poucos estudos sobre os níveis de BK plasmática em pacientes hipertensos após tratamento com os inibidores da ECA apresentam dados conflitantes. Assim, o exato mecanismo dos efeitos hipotensores vasodilatador mediado por cinina não foi totalmente esclarecido (Iimura et al, 1989 e Wiemer et al, 1991). Acredita-se que a produção local de BK por células da parede vascular apresenta maior importância no efeito vasodilatador dos inibidores da ECA do que os níveis de BK circulante (Bönner et al, 1990; Miller VM, 1990; Vanhoutte et al, 1989 e Gabriele et al, 1991).

Tem sido demonstrado que o aumento dos níveis plasmáticos de BK e Caliceína são capazes de aumentar a atividade da Fosfolipase A2, a principal enzima envolvida na síntese de Prostaglandina (PG) (Levenson et al, 1982 e McGiff et al, 1972). Deste modo tem sido sugerido que as PGs possam mediar os efeitos do Enalapril, uma vez que há evidências do seu aumento após a administração da droga.

Contudo o assunto mostra-se controverso entre diferentes autores. Given et al, (1994) demonstraram que após administração aguda de 2,5 a 10 mg de Enalapril os níveis plasmáticos de PGE₂ permanecem inalterados em voluntários sádios. Kasai et al, (1983), também demonstraram que os níveis de PGE₂ permanecem inalterados em pacientes hipertensos. Laroche et al, (1985) relatam que uma pequena dose de Enalapril em pacientes hipertensos não afeta as concentrações plasmáticas de PGE₁ ou PGE₂. Outros estudos também demonstram que após longo período de administração em pacientes hipertensos não ocorreu alterações das concentrações urinárias de PGF_{1α} ou tromboxano B₂ (Vlasses et al, 1983) e PGE₂ ou PGF_{2α} (Fitz et al, 1982). Por outro lado estudo realizado por Oparil et al (1993) demonstrou que a administração oral de Enalapril (40 mg/dia) por 4 semanas provocou aumento na excreção urinária de PGF_{1α} em hipertensão essencial com baixa renina. Mittman et al, (1985) e Calò et al, (1991) também mencionam significativo aumento na excreção urinária de PGE₂, PGF_{1α}, e PGF_{2α} após tratamento com Enalapril (Calò et al, 1991 e Mittman et al, 1985). Assim, devido os dados conflitantes, torna-se necessário maior investigação para a determinação do real papel das PGs no mecanismo de ação do Enalapril (Todd & Heel, 1986 e Todd & Goa, 1992).

3.2) Efeitos hemodinâmicos

O Enalapril reduz a pressão sanguínea tanto em pacientes hipertensos como também em pacientes normotensos (Gavras et al, 1981 e Ferguson et al, 1982). Em

indivíduos sadios normotensos uma única dose do Enalapril (5 a 40 mg) causa redução máxima na pressão arterial 6 a 8 horas após a sua administração. Quando doses maiores são administradas a sua ação prolonga-se por cerca de 24 a 36 horas (Brunner et al, 1981; Hodsman et al, 1984; Jackson et al, 1982; MacGregor et al, 1981 e Shoback et al, 1983).

O efeito anti-hipertensivo hemodinâmico do Enalapril é caracterizado por redução na resistência vascular sistêmica, sem modificar ou promovendo discreto aumento na frequência cardíaca, no volume sistólico e no débito cardíaco (Riley et al, 1985 e Velasco et al, 1983).

Pacientes com hipertensão essencial ou renovascular, após receberem única dose de 5 a 40 mg do Enalapril apresentaram redução na pressão sanguínea sistólica e diastólica. Aproximadamente 15 a 20 % desse efeito anti-hipertensivo ainda permanece após 6 a 8 horas da administração da droga. Sendo a extensão da duração do efeito hipotensor dose-dependente; ou seja uma única dose de 10 mg seria suficiente para proporcionar um efeito anti-hipertensivo máximo, e doses maiores apenas prolongariam este efeito (Todd & Goa; Gavras et al, 1981 e Davies et al, 1984).

3.3) Efeitos Cardiovasculares

Estudos realizados em pacientes com falência cardíaca congestiva demonstraram que os efeitos benéficos (Redução da resistência periférica total, da pressão capilar pulmonar, e da pressão arterial média) do Enalapril ocorreram 1 hora

após a administração de 10 mg por dia e persistiram por 10 a 12 horas (Giles T, 1990).

Muitos estudos tem confirmado regressão da hipertrofia ventricular esquerda em pacientes hipertensos após longo período de tratamento com o Enalapril (Dunn et al, 1984; Saffer et al, 1990 e Todd & Heel, 1986).

Pacientes com falência cardíaca congestiva apresentaram reduzida incidência de arritmia ventricular, após receberem 5 mg diários de Enalapril durante 12 semanas de tratamento (Giles, 1990).

4) FARMACOCINÉTICA

4.1) Maleato de Enalapril (MK-421)

O Maleato de Enalapril (MK-421), após a administração oral, apresenta boa absorção (60 a 70 %) pelo trato gastrointestinal (Todd & Goa, 1992 e UIm, 1983). O pico da concentração plasmática máxima (C_{max}) é alcançado cerca de 1 hora após a administração da droga (Todd & Goa, 1992; Todd & Heel, 1986 e UIm, 1983).

O MK-421 é rapidamente hidrolisado pela Carboxiesterase para sua forma ativa Enalaprilato (Vertes & Haynie, 1992). Como resultado as concentrações plasmáticas do Enalapril inalterado não são mensuradas após 4 horas da administração da droga (UIm, 1983 e UIm et al, 1982).

Em humanos, a sua transformação metabólica ocorre quase que exclusivamente no fígado (Kubo & Cody, 1985). Estudos realizados por Larmour et al, 1985 examinaram *in vitro* a conversão do MK-421 para Enalaprilato em tecidos humanos autopsiados, e demonstraram que o tecido hepático é o maior sítio de hidrólise. Uma moderada conversão também foi determinada no tecido pulmonar. Os demais tecidos analisados, coração e baço apresentaram discreta conversão (Larmour et al, 1985).

Ulm et al (1983,1992) demonstraram que 94% da administração de uma dose oral de Maleato de enalapril marcado radioativamente foram recuperados tanto como MK-421 como Enalaprilato. Portanto, ao contrário do Captopril o Maleato de Enalapril apresenta um único metabólito.

O Maleato de enalapril apresenta meia vida de eliminação de 2 horas. Em indivíduos sadios, cerca de 61 % da dose oral de 10 mg de Maleato de Enalapril são excretados na urina (18 % como Maleato de Enalapril e 43 % como Enalaprilato), e aproximadamente 33 % nas fezes (6 % como Maleato de Enalapril e 27 % como Enalaprilato), dentro de 24 a 48 horas após a administração (Ulm, 1983 e Ulm et al, 1982).

A biodisponibilidade oral do Maleato de Enalapril é cerca de 53 a 74 % (Baseado na recuperação urinária do MK-421 e Enalaprilato), enquanto que o Enalaprilato apresenta biodisponibilidade de 36 a 44 %, após administração intravenosa de Maleato de Enalapril (Davies et al, 1984a, Irvin et al, 1984 e Till et al, 1984).

A alimentação não afeta a biodisponibilidade da droga, porém a função hepática altera significativamente a sua absorção (Swanson et al, 1984). Vários estudos têm confirmado a importância da função hepática na farmacocinética do enalapril. Estes experimentos demonstram que o enalapril é mais lentamente metabolizado a sua forma ativa em pacientes com problemas hepáticos, do que em indivíduos sadios. Deste modo os efeitos terapêuticos agudos apresentam-se reduzidos nestes pacientes do que naqueles que possuem taxa normal de hidrólise hepática (Swanson et al, 1984; Larmour et al, 1985).

O Clearance apresenta-se reduzido somente nos estados avançados de doença hepática (Ohnishi et al, 1989).

Um efeito cronofarmacológico tem sido relatado, possivelmente devido a diferentes taxas de absorção e função hepática. Weisser et al (1991) observaram significativo aumento no t_{max} do enalapril (2.4 h vs 1.3 h; $p < 0.05$) após administração noturna. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para C_{max} , $AUC_{(0-24h)}$ e Ke .

Em relação a pró-droga o mesmo não pode ser observado, visto que o t_{max} do metabólito ativo permaneceu inalterado, porém o seu C_{max} e $AUC_{(0-24)}$ apresentaram um pequeno aumento. Sugerindo assim que o enalapril sofreu maior metabolismo de primeira passagem à noite. Contudo, o aumento do C_{max} e $AUC_{(0-24)}$ do enalaprilato não foi estatisticamente significativo. Assim, baseado nos parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir do metabólito ativo, a administração do maleato de enalapril às 20:00 h não influenciou marcadamente a sua biodisponibilidade.

4.2) Enalaprilato

Após a biotransformação do Maleato de enalapril, o t_{max} para o Enalaprilato é aproximadamente 3 a 4 horas.

O C_{max} e doses acima da faixa terapêutica (2,5 a 40 mg) apresentam relação linear direta (Davies et al, 1984a). Contudo a Área sobre a Curva [AUC] para o Enalaprilato não está linearmente relacionada com a dose (Davies et al, 1984b).

O Enalaprilato está 50 % ligado a proteína plasmática, porém esta ligação é dependente da concentração. Dois sítios ligantes foram identificados: Um apresentando baixa afinidade e alta capacidade, e outro com alta afinidade e baixa capacidade (Davies et al, 1984b).

A droga é extensamente distribuída através do corpo e há importantes sítios de ligação tecidual nas células do endotélio vascular. Acredita-se que estes sítios ligantes constituem a ECA tecidual (MacFadyen et al, 1993).

A eliminação do Enalaprilato é bifásica, com uma fase inicial a qual reflete a filtração renal (Meia vida de eliminação de 2 a 6 horas) e uma subsequente fase prolongada (Meia vida de eliminação de 36 horas), que deve-se a alta afinidade do Enalaprilato pela ECA plasmática (Sweet & Ulm, 1984).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Avaliar a bioequivalência de duas formulações de maleato de enalapril (Eupressin comprimidos, 10 mg, obtido do laboratório biosintética versus Renitec comprimidos, 10 mg, obtido do laboratório Merck Sharp & Dhome, utilizado como formulação referência) baseado na comparação entre dois modelos:

- Farmacodinâmico (relação entre as concentrações de enalaprilato circulante e o grau de inibição da enzima conversora de angiotensina).
- Farmacocinético (medida das concentrações de enalaprilato e enalapril total e determinação dos principais parâmetros farmacocinéticos).

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Dezoito voluntários adultos saudáveis do sexo masculino, com idade de 20 a 36 anos (média \pm DP = 30 ± 1 ano), peso corporal entre 49.7 a 96.6 Kg (média \pm DP = 70 ± 4 Kg) 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 não apresentavam sinais ou sintomas evidentes de doença cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica, ou psiquiátrica. Também apresentavam normalidade para os exames laboratoriais que corroboraram para a confirmação do estado de saúde :

- Hemograma completo e velocidade de hemossedimentação.
- Uréia e creatinina séricas.
- Transaminases, fosfatase alcalina, Gama GT e bilirrubina.
- Glicemia de jejum.
- Proteínas totais e Albumina.
- Na, Cl, e K.
- Urina I
- Protoparasitológicos

A seguir os voluntários esclareceram dúvidas pessoais e assinaram termo de consentimento para o estudo, sendo o protocolo clínico aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

PROTOCOLO CLÍNICO

A Realização do estudo Clínico seguiu delineamento aleatório cruzado de dois períodos, com intervalo de duas semanas entre as doses.

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

Receberam dieta geral até as 23 horas, quando iniciaram jejum visando o início do ensaio clínico previsto para as 7:00 h do dia seguinte.

Após 8 horas de jejum, os voluntários receberam 20 mg de maleato de Enalapril (2 comprimidos de 10 mg cada) com 200 ml de água potável. A administração do medicamento em estudo seguiu rigorosamente o código de randomização apropriado (Tabela I). Após 3.0 horas da administração do medicamento, cada voluntário tomou mais 200 ml de água. Porém permaneceram em jejum para sólidos por 6.0 horas após a administração da droga; a partir de então, receberam dieta geral.

Não foi permitida a ingestão de outros alimentos durante o período de internação. Após o almoço a ingestão de líquidos foi permitida, mas bebidas contendo xantinas (incluindo chá, café e coca-cola) foram evitadas.

TABELA I: Lista de Randomização

Vol. Nº	Sequência de Administração	
	FASE I	FASE II
01	Eupressin	Renitec
02	Eupressin	Renitec
03	Eupressin	Renitec
04	Renitec	Eupressin
05	Renitec	Eupressin
06	Eupressin	Renitec
07	Renitec	Eupressin
08	Renitec	Eupressin
09	Eupressin	Renitec
10	Renitec	Eupressin
11	Eupressin	Renitec
12	Renitec	Eupressin
13	Eupressin	Renitec
14	Eupressin	Renitec
15	Eupressin	Renitec
16	Renitec	Eupressin
17	Renitec	Eupressin
18	Renitec	Eupressin

DROGAS E REAGENTES

Foram obtidos comprimidos de 10 mg de maleato de Enalapril do laboratório Biossintética (Eupressin comprimidos lot: 9303513, Val.: 03/96, Fab.: 03/93) e do laboratório Merck Sharp & Dhome (Renitec comprimidos lot: 92041446, Val.: 04/94, Fab.: 04/92).

O composto MK 351A (p-hidroxi-benzamidina derivado do lisinopril) e o específico anticorpo obtidos em coelhos contra o lisinopril MK 521 foram gentilmente cedidos pelo Dr. M. Hichens, Merck Sharp & Dhome Research Laboratories, USA.

Fosfato de potássio dibásico foi obtido do laboratório Merck Sharp & Dhome e os demais reagentes incluindo EDTA dissódico, azida sódica, soro albumina bovina, dextran e carvão ativado foram obtidos do laboratório Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA.

COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas através de "butterfly" heparinizado colocado em veia antecubital cateterizada antes da administração do medicamento e 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10, 12, 18 e 24 horas após administração. Para cada coleta foram coletados 10 ml de sangue e acondicionados em tubos de vidro devidamente identificados.

Após a coleta, as amostras permaneceram à temperatura ambiente até a coagulação, quando foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos, e os soros separados em tubos de vidro identificados e armazenados em freezer a -20°C, até serem analisados.

ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS

A concentração sérica de Enalaprilato (fig. 1) e Enalapril Total (Enalaprilato mais maleato de Enalapril) foram determinadas por RIA (Radioimunoensaio) HITCHENS, M., HAND, E. L., MULCAHY, W. S. (1981). O método desenvolvido é específico para a determinação no soro do Enalaprilato, mas o Enalapril Total foi mensurado através da hidrólise do Enalapril inalterado em Enalaprilato. O presente método empregou o ^{125}I -composto 351A (351A, um p-Hidroxi-benzamidina derivado do Lisinopril) como marcado e um anticorpo específico obtidos em coelhos contra MK-521 [N-(1-S-carboxi-fenil propil)-L-lisina-L-prolina].

a) Iodinização do composto 351A e purificação do mono- ^{125}I -composto 351A.

O composto 351A (p-Hidroxi-benzamidina derivado do Lisinopril), um inibidor do sítio ativo da ECA, foi iodinado pelo método da Cloranina T apresentado por Swanson et al. (1981) para radioimunoensaio de Enalapril no soro. A mistura iodizada foi imediatamente purificada com uma coluna Sep-Pak C18 para eliminar o ^{125}I não reativo. Posteriormente esse composto foi purificado por HPLC (Martins et al., 1994) usando coluna μ Bondapak C18. A coluna foi equilibrada com 90 % do solvente A (100 mM Na_2PO_4 mais 0,2 % H_3PO_4) e 10 % do solvente B (90 % de Acetonitrila aquosa mais 0,1 % de H_3PO_4) e eluída com gradiente linear de 10-50 % do solvente B em A durante 1 hora, com fluxo de 1,0 ml/min. O mono- ^{125}I -composto 351A apresentou tempo de retenção de 34,3 min. e foi bem dissolvido para o di-iodo-composto, cujo tempo de retenção foi de 45 min. Já o composto 351A apresentou tempo de retenção de 29,8 min. Assim 4 ml de mono- ^{125}I -composto 351A foram obtidos apresentando atividade total de 156,5 μCi e atividade específica de 2000 Ci/mmol.

b) RIA (Radioimunoensaio)

20 µl de soro e curva padrão (construída com soro normal contaminado com concentrações conhecidas de Enalaprilato de 0,34 a 85 ng/ml) foram adicionados a 200 µl de tampão para ensaio (Fosfato de potássio dibásico 0,05 M, EDTA dissódico 0,01 M, Ázida sódica 0,1 %, e Soro Albumina Bovina 1mg/ml, pH= 7,5), 100 µl de ¹²⁵I-351A foram diluídos em tampão para ensaio (equivalente 16000 cpm/tubo) e 500 µl de uma diluição de 1:10.000 de anti-soro MK 521 em tampão para ensaio. Após 18-24 horas de incubação a 4°C, 200 µl de suspensão de dextran-carvão (0,5 g de carvão e 0,1 g de dextran em 25 ml de tampão para ensaio sem albumina) foram colocados em tubos de ensaio e agitados em vórtex.

Após período de incubação em gelo-água por 15 min., todos os tubos foram centrifugados em 3500 rpm por 20 min. a 4°C. Em seguida o sobrenadante resultante (800 µl) foi separado e a radioatividade mensurada em espectrômetro gamma (Beckman Gamma 5500, Beckman USA).

A concentração de Enalapril total foi determinada pela mesma metodologia (RIA) descrita acima, após a desesterificação do maleato de enalapril para Enalaprilato a partir de uma preparação de esterase de fígado de rato. O fígado de rato foi homogenizado em 10 volumes (peso/volume) de solução salina resfriada e centrifugado por 30 min. a 4800 g a 4°C, em seguida o sobrenadante foi alíquotado e estocado a - 20°C.

Amostras de soro e pontos da curva padrão (construídas com soro "branco" contaminado com concentrações conhecidas de Enalaprilato de 2,1 a 512 ng/ml) foram incubadas com 10 µl de homogenato de fígado de rato (diluído 1:5 no mesmo tempo de uso) por 12 horas a temperatura ambiente.

c) Atividade da ECA.

A atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) foi determinada no soro usando ensaio espectrofotométrico por determinação da quantidade de ácido Hipúrico formado a partir de substrato sintético Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) por ação da ECA.

Amostras de 10 μ l de soro e curva padrão (com concentrações conhecidas) foram adicionadas em 20 μ l de tampão para incubação (Tetraborato de sódio decahidratado 150 mM, pH 8,3), e pré-incubado por 5 min. a temperatura ambiente de 37°C. Após este período de pré-incubação, a reação foi iniciada adicionando 10 μ l de solução do substrato sintético (aquecido a 37°C), e seguiu-se período de incubação por 30 min. a 37°C. A reação foi interrompida após adição de 600 μ l de solução inibidora (Hepes 100 mM, EDTA 2,5 mM, NaN₃ 0,1 %, pH 9,0). Em seguida 300 μ l do reativo cromogênico (cloreto de cianeto ((CN)₃Cl₃), em Dioxano) foram adicionados e agitado vigorosamente durante 30 seg. em vortex, e centrifugado a 3000 rpm por 10 min. para remover proteínas desnaturadas e excesso de cloreto de cianeto.

O ensaio para as amostras zero (branco) foi realizado da mesma maneira, porém a adição da solução inibidora e neutralizante precederam a adição do substrato.

A curva de calibração de Ácido Hipurico e reagente branco foram construídas pela substituição da solução de substrato sintético por soluções de concentrações conhecidas de Hipurato (curva padrão) e água destilada respectivamente. A absorbância dos sobrenadantes foi mensurada em 382 nm contra o reagente branco.

RESULTADOS

CÁLCULO DE RESULTADOS

a) RIA (Radioimunoensaio).

As concentrações de Enalaprilato foram calculadas por regressão linear entre o logit dos valores B/B0 (Onde B é a atividade do marcado e B0 a atividade do soro branco) e as concentrações de Enalaprilato log-transformadas da curva padrão.

O limite de sensibilidade nas condições de estudo foi de 0,1 ng/ml para o Enalaprilato. A variação do inter-ensaio e do intra-ensaio foram menores do que 5 e 8 %, respectivamente, para concentrações de Enalaprilato de 1 a 200 ng/ml.

No cálculo da curva padrão empregamos método polinomial, embora a transformação logit-log seja um método adequado. Desta forma obtemos por processamento de dados $y = a_0 + a_1x + a_2x^2$, onde $y = \log$ da concentração e $x = \text{logit } B/B_0$. Sendo assim, estes valores da curva padrão são transformados por função logarítmica e plotados novamente no logaritmo das concentrações. Esta transformação deu uma reta linear com coeficiente de regressão (r) de 0,98 ou maior.

b) ATIVIDADE DA ECA.

Uma unidade de atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) é definida como a quantidade de enzima que em 1 min. produz 1 μmol de Hipurato sobre condições definidas. Assim a atividade da ECA no soro em U/L = $(\Delta A \times V_t \times 1000)/(33.5 \times 30 \times V_s)$, onde ΔA é a absorbância da amostra menos a absorbância do soro branco, V_t é o volume total do ensaio, 1000 converte U/ml para U/L, 33,5 é a absorvidade milimolar do reativo cromogênico, 30 min. é o intervalo de incubação, V_s é o volume de amostra analisada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA E FARMACOCINÉTICA

As curvas de concentrações plasmáticas de enalaprilato (MK-422) e Enalapril total (Média + DP) em função do tempo foram obtidas para cada uma das formulações. A concentração máxima atingida (C_{max}) e o tempo ao qual a mesma ocorre (T_{max}) foram encontradas.

As áreas sob a curvas da concentração de Enalaprilato-tempo e Enalapril total -tempo desde 0 a 24 horas ($AUC_{[0-24]}$) foram calculadas usando o método da "regra trapezoidal".

A constante de eliminação terminal de primeira ordem (K_e) foi determinada a partir da equação de regressão linear entre o logaritmo da concentração e o tempo. A meia vida ($T_{1/2}$) foi calculado empregando a equação $T_{1/2} = (ln_2/K_e)$ (Kinetics-Pharmkit Program-Version 2.0)

Os dados obtidos de C_{max} e $AUC_{[0-24]}$, e as razões individuais entre as formulações foram analisadas estatisticamente (Bioequivalence Program for two-Period Crossover Studies-Version 3.4, by Herman P Wijnand) empregando testes paramétricos (testes de ANOVA) e não-paramétricos (teste de Wilcoxon; Steinijans e Diletti; 1985)

RESULTADOS

O ensaio Clínico transcorreu normalmente não sendo relatado efeitos colaterais ou reações adversas. Nenhuma variação na pressão sanguínea ou taxa cardíaca foram observados após a administração de ambas as formulações de maleato de enalapril, quando comparado com o valor basal. Os exames laboratoriais antes e após o ensaio clínico não apresentaram valores fora do intervalo de referência.

As figuras IV e V mostram as médias das concentrações plasmáticas em função do tempo para Enalaprilato (MK-422) e Enalapril total

respectivamente, após a administração de 20 mg de cada formulação de comprimidos de maleato de enalapril.

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para as duas preparações farmacêuticas de maleato de enalapril (MK-422) (Eupressin[®] e Renitec[®]) são mostrados na tabela IV. A mesma tabela apresenta também a análise estatística requerida para os estudos de bioequivalência.

As médias geométricas das $AUC_{[0-24]}$ e seu intervalo de confiança para MK-422 foram comparadas em ambas as formulações e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre Eupressin[®] e Renitec[®] (Tabela IV). O intervalo de confiança (90 %) da porcentagem das razões individuais da $AUC_{[0-24]}$, $T_{1/2}$ e K_e foram incluídos na faixa de bioequivalência (80 a 125%) exigida. No entanto, o C_{max} apresentou intervalo de confiança de 90 % da porcentagem das razões individuais mais amplo do que a faixa (80 a 125%) de bioequivalência exigida (Tabela IV).

A figura VI representa a porcentagem de inibição da ECA plasmática (média \pm DP) em função do tempo, já a figura VII representa a porcentagem de inibição da ECA plasmática em função da média das concentrações plasmáticas de Enalaprilato. A relação entre as concentrações no soro de Enalaprilato e a porcentagem de inibição da ECA foi descrita com base em um modelo Michaelis-Menten. A equação é representada por $Y = Y_{max} [X] / (I_{50} + [X])$. Onde Y representa a % de inibição da ECA, [X] a concentração de Enalapril (ng/ml), I_{50} a concentração de Enalapril que causa 50% de inibição da ECA e Y_{max} a máxima inibição da ECA correlacionada com os valores basais. Os valores obtidos da curva por regressão linear são $I_{50} = 3.8 \pm 0.2$ ng/ml and $Y_{max}: 94.7 \pm 0.7\%$ ($r: 0.997$; $p < 0.05$).

As diferenças observadas entre os valores individuais de T_{max} obtidos não foram significativamente diferentes de 0 (tabela 1).

As médias geométricas das $AUC_{[0-24]}$, C_{max} e os parâmetros farmacocinéticos foram calculados para Enalapril total, assim como seu intervalo

de confiança de 90 %. Não houve diferença entre as duas formulações, segundo determinação por estatística paramétrica e não paramétrica (tabela V). Também não foram observados diferenças significativas entre os valores de T_{\max} obtidos (Tabela V).

Dados da Média da Concentração vs Tempo (Figura) e Parâmetros Farmacocinéticos Médios (Tabelas) para Enalaprilato e Enalapril total.

CONCENTRAÇÃO MÉDIA

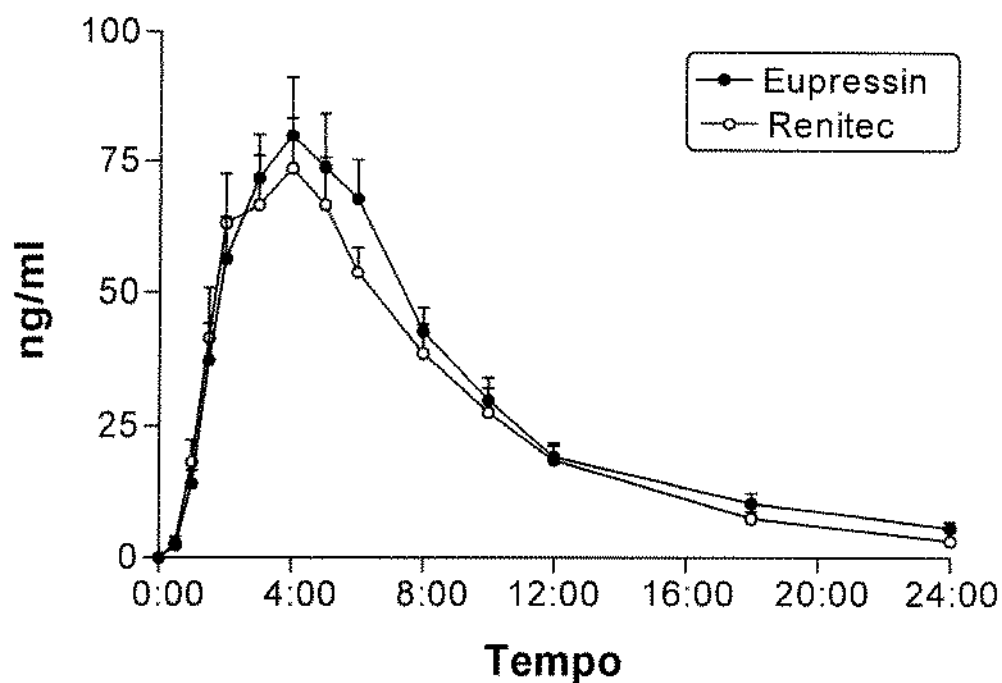


Figura IV. Média das concentrações plasmáticas (média \pm DP) de MK-422 em função do tempo para duas formulações (20 mg) de maleato de enalapril administradas a 18 voluntários normais.

Tabela II: Média das concentrações plasmáticas vs tempo e desvio padrão (D.P.) para Enalaprilato

TEMPO	Biossintética	
	EUPRESSIN MÉDIA (ng/ml)	D.P.
0	n.d.	n.d.
0,5	23	2.5
1	14.1	11.0
1,5	37.3	29.3
2	56.4	34.0
3	71.8	36.0
4	80.0	47.5
5	73.9	44.2
6	67.8	31.9
8	42.8	18.7
10	29.9	17.7
12	19.3	10.7
18	10.4	8.1
24	5.7	5.2

TEMPO	Merck Sharp & Dhome	
	RENITEC MÉDIA (ng/ml)	D.P.
0	n.d.	n.d.
0,5	2.9	4.5
1	18.3	17.6
1,5	41.5	39.8
2	63.1	40.3
3	66.6	40.3
4	73.6	41.4
5	66.7	38.6
6	53.8	19.8
8	38.7	23.0
10	27.5	19.7
12	18.6	12.0
18	7.5	5.7
24	3.2	2.3

CONCENTRAÇÃO MÉDIA

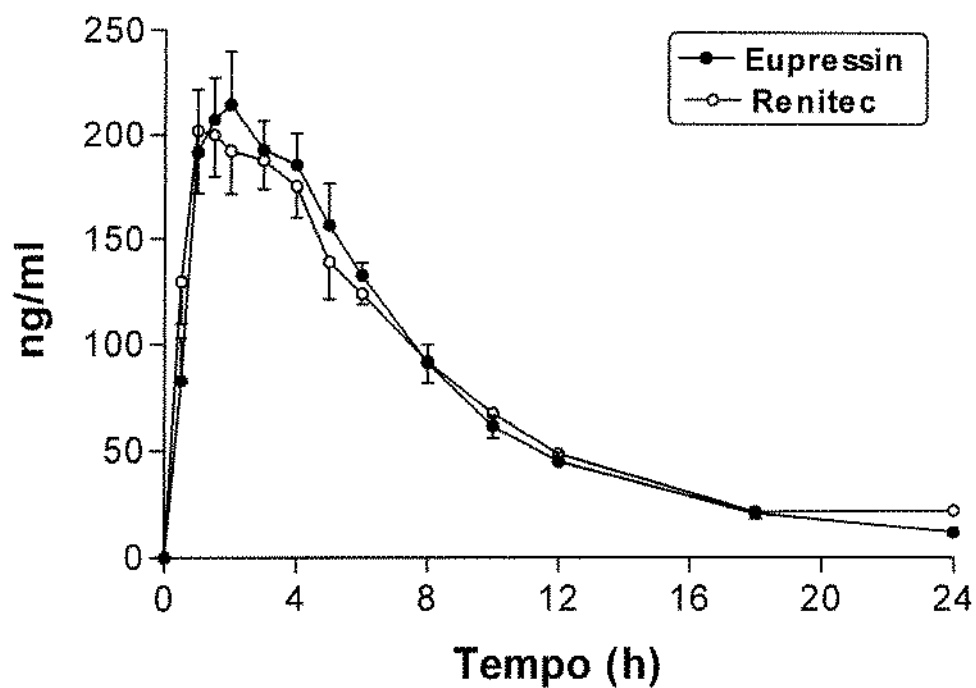


Figura V. Média das concentrações plasmáticas (média \pm DP) do Enalapril total em função do tempo para duas formulações (20 mg) de maleato de enalapril administradas a 18 voluntários normais.

Tabela III: Média das concentrações plasmáticas vs tempo e desvio padrão (D.P.) para Enalapril Total.

TEMPO	Biossintética	
	EUPRESSIN MÉDIA (ng/ml)	D.P.
0	n.d.	n.d.
0,5	83.1	70
1	192	81
1,5	208	76
2	214	91
3	193	63
4	186	66
5	157	51
6	133	33
8	91	32
10	61	21
12	45	21
18	21	16
24	12	10

TEMPO	Merck Sharp & Dhome	
	RENITEC MÉDIA (ng/ml)	D.P.
0	n.d	n.d.
0,5	130	113
1	202	115
1,5	200	91
2	193	77
3	188	78
4	176	74
5	139	46
6	124	50
8	92	40
10	68	52
12	49	22
18	21	16
24	22	51

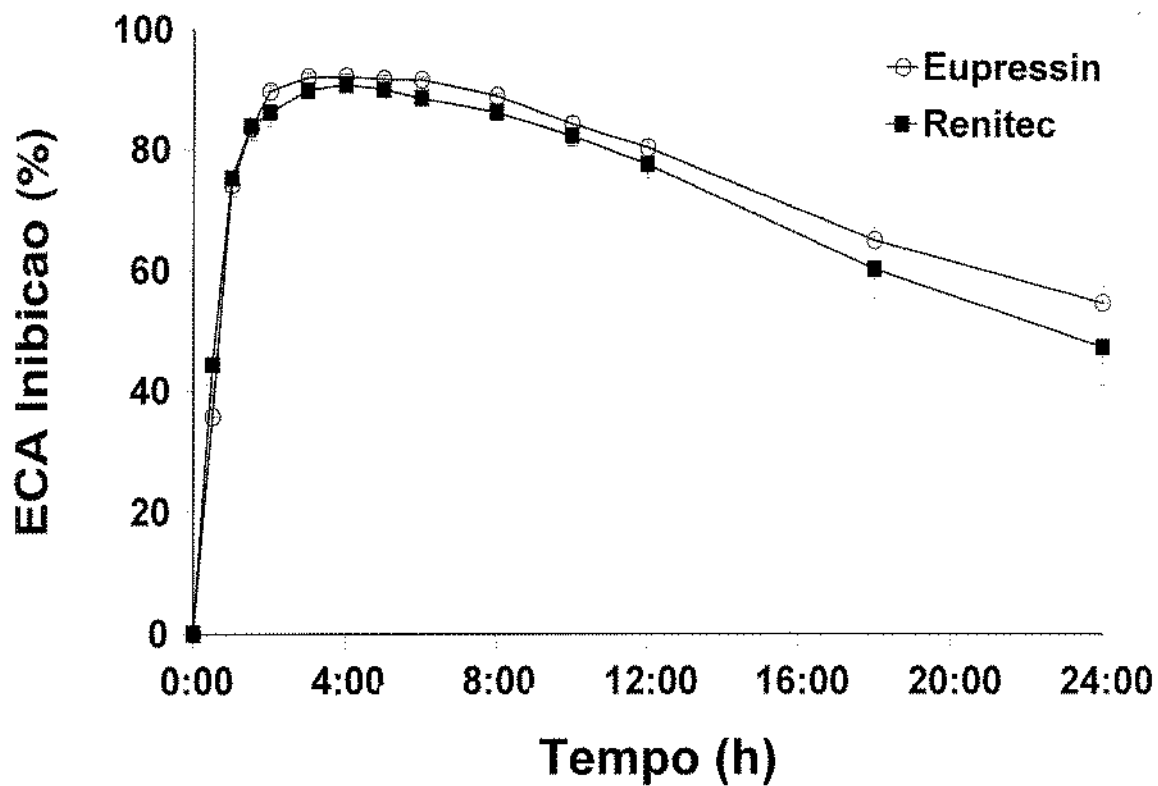


Figura VI. Média da % de inibição plasmática da ECA (média \pm DP) em função do tempo para duas formulações (20 mg) de maleato de enalapril administrada a 18 voluntários normais sádios.

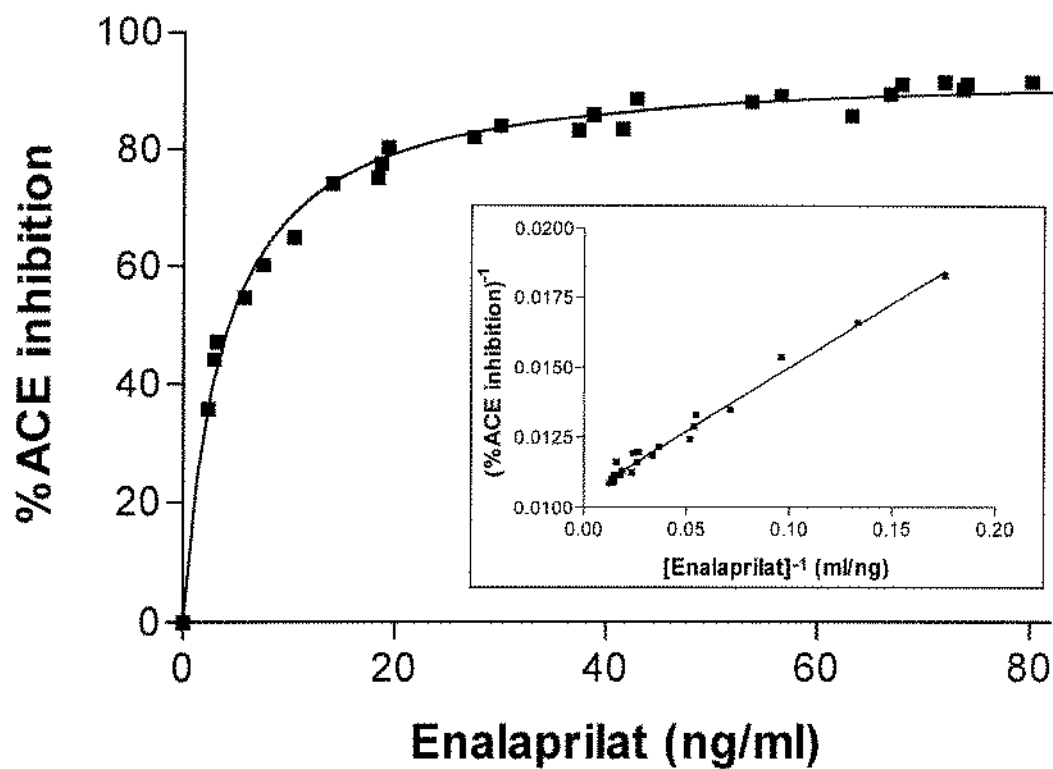


Figura VII. Relação entre os valores médios da % de inibição da ECA plasmática e a concentração média plasmática de Enalaprilato no soro obtida após a administração de duas formulações (20 mg) de maleato de enalapril a 18 voluntários normais

TABELA IV: Análise estatística de $AUC_{[0-24]}$, C_{max} , K_e , $T_{1/2}$ e valores de T_{max} para enalaprilato, obtido após a administração de 20 mg de duas formulações comprimidos de maleato de enalapril em 18 voluntários sadios.

Parâmetro	EUP	REN	EUP/REN %razões	
			Paramétrico	não-paramétrico*
$AUC_{[0-24]}$ (ng h ml⁻¹)				
Média geométrica	631	553	110.9	112.4
90% CI	516 - 771	443 - 691	99.6 - 123.6	99.8 - 125.0
C_{max} (ng/ml)				
Média geométrica	80	71	112.3	114.6
90% CI	65 - 98	55 - 92	96.2 - 131.0	92.6 - 136.1
K_e (h⁻¹)				
Média geométrica	0.17	0.18	114.2	93.5
90% CI	0.15 - 0.20	0.15 - 0.20	84.2 - 111.3	79.7 - 108.8
$T_{1/2}$ (h)				
Média geométrica	4.0	3.9	103.1	106.3
90% CI	3.5 - 4.7	3.4 - 4.5	90.0 - 118.0	91.7 - 123.4
T_{max} (h)				
Mediana	4.0	4.0	-0.1 [†]	0.0
Faixa	1.5 - 8.0	1.5 - 8.0	-0.7 - 0.6 [‡]	-0.5 - 0.5

*Segundo Hauschke et al.¹⁹ e o FDA^{20, 21}, resultados não-paramétricos são expressos como ponto estimado e 90% IC das razões individuais, exceto para T_{max} (expresso como ponto estimado e 90% IC). [†]Média aritmética das diferenças individuais [‡]90% IC das diferenças individuais.

TABELA V: Análise estatística de $AUC_{[0-24]}$, C_{max} , K_e , $T_{1/2}$ e valores de T_{max} para Enalapril total, obtido após a administração de 20 mg de duas formulações comprimidos de maleato de enalapril em 18 voluntários sadios.

Parâmetro	EUP	REN	EUP/REN %razões	
			Paramétrico	Não-paramétrico*
$AUC_{[0-24]}$ (ng h ml⁻¹)				
Média geométrica	1682	1736	96.9	105.2
90% CI	1501 - 1886	1544 - 1953	84.1 - 111.7	86.3 - 113.7
C_{max} (ng/ml)				
Média geométrica	227	242	93.8	95.9
90% CI	196 - 262	203 - 289	81.1 - 108.4	82.9 - 109.1
K_e (h⁻¹)				
Média geométrica	0.16	0.16	101.3	97.1
90% CI	0.14 - 0.19	0.14 - 0.18	89.3 - 115.0	88.7 - 108.9
$T_{1/2}$ (h)				
Média geométrica	4.4	4.4	98.5	104.0
90% CI	3.7 - 5.1	3.9 - 5.0	86.9 - 111.5	92.7 - 112.0
T_{max} (h)				
Mediana	2.0	1.5	0.6 [†]	0.5
Faixa	1.0 - 6.0	0.5 - 6.0	-0.3 - 1.4 [‡]	-0.25 - 1.25

*Segundo Hauschke et al.¹⁹ e o FDA^{20, 21}, resultados não-paramétricos são expressos como ponto estimado e 90% IC das razões individuais, exceto para T_{max} (expresso como ponto estimado e 90% IC). [†]Média aritmética das diferenças individuais [‡]90% IC das diferenças individuais.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

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

Neste trabalho, avaliamos a bioequivalência de duas formulações empregando a medida das concentrações de enalaprilato e enalapril total baseada nas normas requeridas pelo FDA (higidez dos voluntários, administração dos fármacos em jejum e delineamento do protocolo clínico).

A análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos é realizada mediante o emprego de testes quase exclusivos deste tipo de estudos, já que apesar de levar em consideração e cuidar de todos os detalhes, a variabilidade inter-indivíduos, e também a variabilidade biológica não controlável de cada indivíduo devem ser levados em consideração.

Basicamente, os testes estatísticos aplicados dividem-se em dois grupos: os paramétricos (levam em consideração algum tipo de distribuição populacional) e os não-paramétricos (independentes do tipo de distribuição).

O objetivo de todos esses métodos é o mesmo: obtidas as razões individuais entre a formulação teste / formulação de referência para C_{max} , AUC (ou outra variável farmacocinética diferente de T_{max}) calcular um valor médio (aritmético ou geométrico) contido num intervalo de confiança de probabilidade

variável (90% é o atualmente aceito pela FDA), e analisar a inclusão ou superposição deste com intervalos do tipo 0.80 - 1.25 (ou o atualmente discutido 0.70 - 1.43 para C_{max}).

Quando a curva da concentração plasmática de enalaprilato versus tempo (Fig IV), foi empregada para mensurar bioequivalência, não houve diferença significativa quanto a extensão da absorção observada entre as duas formulações. As razões individuais de $AUC_{[0-24]}$ para ambas as formulações estão inclusas no intervalo de confiança de 90% requerido para bioequivalência (faixa de 80 a 125%).

Quanto a taxa de absorção, a bioequivalência não pode ser concluída, uma vez que as razões individuais de C_{max} são maiores do que a faixa de 80 a 125% requerida para bioequivalência.

Em relação ao T_{max} as diferenças não foram significativamente diferentes de zero (tabela 1). Quando a curva da concentração versus tempo para enalapril total foi empregada para mensurar bioequivalência, não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas formulações quanto a extensão ($AUC_{[0-24]}$) e taxa de absorção (T_{max}) do enalapril.

Ao empregarmos os parâmetros $AUC_{[0-24]}$, C_{max} , T_{max} , K_e e $T_{1/2}$ resultantes das curvas de concentração sérica de enalapril total (enalaprilato + maleato de enalapril) e analisarmos mediante testes paramétricos e não paramétricos, não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa entre ambas as formulações. Por esta razão, nós concluímos que a quantificação da droga total é mais apropriada para avaliar a bioequivalência de duas preparações de maleato de enalapril.

O Enalapril é uma pró-droga oral a qual é hidrolizada por esterases hepáticas a sua forma ativa enalaprilato (Todd PA & Goal KL, 1992; Todd PA & Heel RC, 1986). Deste modo, a atividade enzimática endógena representa via cinética adicional a qual possui relevante importância nos níveis plasmáticos do Enalaprilato.

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram diferenças na atividade de esterase hepática em pacientes cirróticos e indivíduos sadios (Larmour et al, 1985; e Ohnishi et al, 1989). Estes fatos podem confirmar a variabilidade existente inter-sujeitos, levando assim a não inclusão dos 90% do IC das razões individuais de C_{max} na faixa de 80-125%.

A maioria das drogas são metabolizadas por enzimas hepáticas, apesar de que certa metabolização pode acontecer também no trato gastrointestinal, nos pulmões e no sangue.

Durante o metabolismo hepático, as drogas são convertidas em compostos mais hidrossolúveis, favorecendo assim a sua excreção, mediada principalmente pelos rins.

Diversos fatores afetam a velocidade de metabolização:

1. Idade: Por exemplo, os idosos apresentam diminuição do fluxo sanguíneo hepático e esplênico, do volume do fígado, assim como das atividades enzimáticas das monoxidases de função mistas e NADPH redutase hepática. Nos neonatos e crianças, a velocidade de metabolização da teofilina está aumentada, assim como a variabilidade dela com a dose; estas diferenças aparentemente desaparecem na puberdade;

2. Estado nutricional e constituição da dieta;

3. Co-administração de drogas indutoras (fenobarbital) ou inibidoras (etanol) das enzimas hepáticas microsossomais;

4. Doenças, principalmente hepáticas e cardiovasculares;

5. Tabaco: o fumo aumenta a velocidade de eliminação de várias drogas, tais como: antipirina, cafeína, imipramina, lidocaina, teofilina, propanolol, oxazepam.

Dois importantes processos metabólicos hepáticos são controlados geneticamente: a acetilação pela N-acetil transferase e a hidroxilação catalizada pela monooxigenase. Tem sido reportadas altas percentagens de indivíduos com diferenças genéticas em diversas sociedades e grupos étnicos, razão pela qual as dosificações de drogas que sofrem estes processos de metabolização devem ser cuidadosamente ajustadas segundo as características próprias destes grupos genéticos.

Baseado no enfoque farmacodinâmico, também aceito pelo FDA, nenhuma conclusão pode ser obtida com base nos dados resultantes da monitorização da pressão arterial, uma vez que a dose administrada não apresentou efeito hipotensor significativo. Contudo os dados da inibição da ECA podem ser utilizados como apropriada medida farmacodinâmica aguda. A fig. 2 mostra que as curvas de inibição plasmática da ECA versus tempo foram semelhantes para ambas as formulações. A inibição máxima da ECA (aproximadamente 90% em relação aos valores basais) foi observada 3 - 5 horas após a administração do Enalapril, permanecendo inibida em torno de aproximadamente 50% ao longo das 24 hs seguintes à administração da droga.

Com base na relação entre as concentrações de Enalaprilato circulante e o grau de inibição da ECA sérica (fig. 7), observamos que o grau de inibição da enzima não é diretamente proporcional às concentrações de Enalaprilato circulantes (salvo na região das concentrações de enalaprilato mais baixas: poucas ng/ml). Deste modo, concentrações maiores de Enalaprilato levariam à inibição quase total da atividade da ECA, e assim, a medida da atividade da ECA não é modelo farmacodinâmico apropriado para avaliar biodisponibilidade, quando empregamos doses terapêuticas normais.

Este estudo comprova, com base nos resultados expostos, que o modelo farmacodinâmico é inadequado para avaliar a bioequivalência de duas preparações comerciais de maleato de enalapril. Assim, o modelo farmacocinético, baseado na curva da concentração plasmática do Enalapril total versus tempo é o mais adequado. Outras pró-drogas devem ser analisadas individualmente.

Em termos gerais, as causas que motivam as diferentes respostas individuais a um determinado medicamento incluem desde características genéticas, doenças e idade dos indivíduos, via de administração da droga e até diferenças na formulação farmacêutica.

Na atualidade, a substituição por genéricos tem sido utilizada com grande frequência por farmacêuticos. O nome genérico é aquele dado à droga, independente do fabricante ou proprietário da marca, em função do ingrediente ativo. Esta substituição consiste em dispensar um produto farmacêutico de marca diferente daquela prescrita pelo médico, desde que contenha o mesmo ingrediente ativo, nas mesmas concentrações e formas farmacêuticas. (por

exemplo, como demonstrado neste trabalho, a substituição do Renitec® comprimidos pelo Eupressin® comprimidos). Estas substituições só podem ser feitas após a avaliação da equivalência na biodisponibilidade de produtos farmacêuticos de fabricantes diferentes, sendo que a bioequivalência entre dois ou mais produtos é concluída quando as velocidades e os graus de absorção não são estatisticamente diferentes.

As variações na biodisponibilidade de determinados produtos farmacêuticos são responsáveis por algumas falhas terapêuticas em pacientes que receberam produtos inequivalentes ao longo de suas terapias. Estas diferenças na biodisponibilidade entre produtos farmacêuticos de um mesmo princípio ativo podem ser devidas às diferenças na formulação de ingredientes empregados, métodos de manufatura utilizados, rigor no procedimento de controle de qualidade do produto e mesmo os métodos de manipulação, embalagem e estocagem dos produtos, bem como fatores fisiológicos e características do paciente.

Assim, os estudos de bioequivalência são importantes para identificar aqueles fármacos ou produtos para os quais resultaram falhas terapêuticas, na prudência da seleção inicial do produto e no cuidado de alterações do produto. Contribuindo desta forma para um melhor processo de manufatura da preparação farmacêutica, diminuindo o grau de variabilidade nas características da liberação da droga *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- BELZ, G.G; KIRCH, W.; KLEINBLOESEM, C.H. (1988). Angitensin-Converting Enzyme Inhibitors. Relationship between Pharmacodynamic and Pharmacokinetics. **Clin. Pharmacokinet.**, **15**: 295-318.
- BIOLLAZ, J.; BURNIER, M.; GAVRAS, I.; WAEBER B.; GAVRAS H. (1982). Antihypertensive therapy with MK-421: Angiotensin II-renin relationships to evaluate efficacy of converting enzyme blockade. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **4**: 966-972
- BIOLLAZ, J.; BURNIER, M.; TURINI, G.A.; BRUNNER, D.B.; PORCHET, D.V.M.M.; GOMEZ, H.J.; JONES, K.H.; FERBER, F.; ABRAMS, W.B.; GAVRAS, H.; BRUNNER, H.R. (1981). Three new long-acting converting-enzyme inhibitors: relationship between plasma converting-enzyme activity and response to angiotensin I. **Clin. Pharmacol. Ther.**, **29**: 665-670.
- BONNER, G.; PREIS, S.; SCHUNK, U.; TOUSSAINT, C.; KAUFMANN, W. (1990). Hemodynamic effects of bradykinin on systemic and pulmonary circulation in healthy and hypertension humans. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **15**: (Suppl VI): S46-S56.
- BRUNNEER, D.B.; DESPONDS, G.; BIOLLAZ, J.; KELLER, I.; FERBER, F. (1981). Effect of a new Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (MK-421) and its Lisine analogue on the components of the Renin System in healthy subjects. **Br.J.Clin.Pharmacol.**, **11**: 461-467.
- CALÒ, L.; CANTARO, S.; FAVARO, S.; PLESANI, M.; BORSATTI, A. (1991). Urinary excretion of prostanoids during treatment with Enalapril compared with Captopril. **Curr. Ther. Res.**, **49**: 376-382.

- CHEN, D.S.; BRUNNER, H.R.; WAEBER, B. (1984). In-vitro response of plasma angiotensin converting enzyme to precursors and active forms of converting enzyme inhibitors. **Curr. Ther. Res.**, **35**: 253-262
- CLAUSER, E.; GONZALEZ M.F.; BOUHNİK, J.; CORVOL, P.; MENARD, J. (1983). The effects of converting enzyme inhibitors on plasma angiotensinogen and plasma aldosterone in sodium-depleted rats. **J. Hypertens.**, (suppl.1): 37-40.
- CUSHMAN, D.W. & CHEUNG, H.S. (1970). Spectrophotometric assay and properties of the ACE of rabbit lung. **Biochem. Pharmacol.**, **20**: 1637-1648.
- CUSHMAN, D.W., CHEUNG, H.S., SABO, E.F., et al (1978). Design of new antihypertensive drugs: Potent and specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. **Prog Cardiovasc Dis.**, **21**: 176-182.
- DAVIES, R.O.; GOMEZ, H.J.; IRVIN, J.D.; WALKER, J.F. (1984a). An overview of the clinical pharmacology of enalapril. **Br.J.Clin.Pharmacol.**, **18 (Suppl.2)**: 215s-219s.
- DAVIES, R.O.; IRVIN, J.D.; KRAMSCH, D.K.; WALKER, J.F.; MONCLOA, F. (1984b). Enalapril worldwide experience. **Am.J.Med.**, **20**: 23-35.
- DONNELLY, R.; MEREDITH, P.A.; ELLIOTT, H.L.; REID, J.L. (1990). Kinetic-dynamic relations and individual responses to Enalapril. **Hypertension**, **15(3)**: 301-309.
- DUNCAN, F.M.; MARTIN, V.I.; WILLIAMS, B.C.; AL-DUJAILI, E.A.S.; EDWARDS C.R.W. (1983). Development and optimisation of a radioimmunoassay for plasma captopril. **Clin.Chim.Acta**, **131**: 295-303.

- DUNKMAN,W.B.; WILEN,M.; FRANCIOSA,J.A. (1983). Enalapril (MK-421), a new Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor. Acute and chronic effects in heart failure. **Chest**, **84(Suppl.5)**: 539-544.
- DUNN,F.G.; OIGMAN,W.; VENTURA,H.O.; MESSERLI,F.H.; KOBRIN,I.; FROHLICH,E.D. (1984). Systemic and renal effects of Enalapril and its effects on cardiac mass. **J. Hypertens.**, **2(Suppl.2)**: 57-61.
- DZAU,V.J. (1987). Implications of local Angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. **Am. J. Cardiol.**, **59**: 59A-65A.
- DZAU,V.J. (1988). Circulation versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. **Circulation**, **77(Suppl. 1)**: 1-4.
- DZAU,V.J. (1990). Mechanism of action of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) inhibitors in hypertension and heart failure: Role of plasma versus tissue ACE. **Drugs**, **39 (Suppl.2)**: 11-16.
- EDEKI,T.; JONHSTON,A.; LI KAM WA,E.; TURNER,P. (1992). Enalapril pharmacokinetics and ACE inhibition, following single and chronic oral dosing. **Clin. Pharmacol. Ther.**, **18**: 123-126.
- FALKENHAHN,M.; GOHLKE,P.; PAUL,M.; STOLL,M.; UNGER,T. (1994). The renin-angiotensin system in the heart and vascular wall: new therapeutic aspects. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **24(Suppl.2)**: S6-S13.
- FERGUSON,R.D.; VLASSES P.H.; SWANSON,B.N.; MOJAVERIAN,P.; HICHENS,M. et al (1982). Effects of enalapril, a new converting enzyme inhibitor, in hypertension. **Clin. Pharmacol. Ther.**, **32**:48-53.
- FERREIRA,S.H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, **24**: 164-169.

- FITZ A.; LAWTON W.; REIMER J.; NELSON G. (1982). The effect of Enalapril, a non-thiol Converting Enzyme Inhibitor, on vasoactive factors in hypertension. **Clin. Res.**, Abstract, **30**: 775A.
- FRISHMAN,W.H. (1992). Comparative pharmacokinetic and clinical profiles of Angitensin-Converting Enzyme Inhibitors and Calcium Antagonists in systemic hypertension. **Am. J. Cardiol.**, **69**: 17C-24C.
- GAVRAS,H.; BIOLLAZ,J.; WAEBER,B.; BRUNNER,H.R.; GAVRAS,I et al (1981). Antyhypertensive effect of the new oral angitensin-converting enzyme inhibitor "MK-421". **Lancet**, **2**: 543-547.
- GILES,T. (1990). Enalapril in the treatment of congestive heart failure. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **15 (Suppl.3)**: S6-S10.
- GIVEN,B.D.; TAYLOR,T.; HELLENBERG,N.K.; WILLIAMS,G.H. (1984). Duration and action and short-term hormonal responses to Enalapril (MK-421) in normal subjects. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **6**: 436-441.
- GOMEZ,H.J., CIRILLO V.J. & IRVIN,J.D. (1985). Enalapril: A Review of Human Pharmacology. **Drugs**, **30(Suppl.1)**: 13-24.
- GROSS,D.M.; SWEET,C.S.; ULM,E.H.; BACKLUND,E.P.; MORRIS,A.A.; WEITZ,D.; BOHN,D.L.; WENGER,H.C.; VASSIL,T.C.; STONE,C.A. (1981). Effect of (N[(S)-1-carboxy-3-phenylpropyl]-L-ala-L-pro) and its ethyl ester (MK-421) on angiotensin converting enzyme *in vitro* and angiotensin pressor responses *in vivo*. **J. Pharmacol. exp. Ther.**, **216**: 552-557.
- HASER,E. (1976). The role of Renin in normal and pathological cardiovascular homeostasis. **Circulation**, **54**: 849-861.

- HAUSCHKE D.; STEINIJANS VW.; DILETTI E. (1990). A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Intern J Clin Pharmacol Ther Toxicol.*, **28**:72-78.
- HAYAKARI,M.; KONDO,Y.; IZUMI,H. (1977). A rapid and simple spectrophotometric assay of ACE. *Anal. Biochem.*, **84**: 361-369.
- HERMAN,A.G. (1992). Differences in structure of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors might predict differences in action. *Am. J. Cardiol.*, **70**: 102C-108C.
- HIRSCH,A.T.; TALSNESS,C.E.; SMITH,A.D.; SCHUNKERTR,H.; INGELFINGER,J.R.; DZAU,V.J. (1992). Differential effects of Captopril and Enalapril on tissue Renin-Angiotensin Systems in experimental heart failure. *Circulation*, **86**: 1566-1574.
- HITCHENS,M.; HAND,E.L.; MULCAHY,W.S. (1981). Radioimmunoassay for angiotensin converting enzyme inhibitors. *Ligand Q*, **4**: 43.
- HODSMAN G.P.; BROWN J.J.; CUMMING A.M.M.; DAVIES D.L.; EAST B.W. et al (1984). Enalapril in the treatment of hypertension with renal artery stenosis. *Am. J. Med.*, **77**: 52-60.
- HURST,P.L. & LOVELL-SMITH,C.J. (1981). Optimized assay for serum ACE activity. *Clin. Chem.*, **27(Suppl.12)**: 2048-2052.
- IRVIN,J.D.; TILL,A.E.; VLASSES,P.H. (1984). Bioavailability of enalapril maleate. *Clin. Pharmacol. and Ther.*, **33**: 248.
- IIMURA,O. & SHIMAMOTO,K. (1989). Role of kallikrein-kinin system in the hypotensive mechanisms of converting-enzyme inhibitors in essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13 (Suppl. 3)**: S63-S66.

- JACKSON,B.; MAcGRATH,B.P.; JOHNSTON,C.I. (1982). Correlation between Angiotensin Converting Enzyme inhibition and the acute hypotensive response to MK-421 in essential hypertension. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, **7**: 99-104.
- KASAI,Y.; ABE,K.; YASUJIMA,M.; TAJIMA,J.; SEINO,M. et al. (1983). Acute effects of MK-421, a new Angitensin Converting Enzyme Inhibitor, in man. **Tohoku J. Experimental Medicine.**, **141**: 417-422.
- KELLY,J.G. & O'MALLEY,K. (1990). Clinical pharmacokinetics of the newer ACE inhibitors, a review. **Clin. Pharmacokinet.**, **19(Suppl.3)**: 177-196.
- KELLY,J.G.; DOYLE,G.D.; CARMODY,M.; GLOVER,D.R.; COOPER,W.D. (1988). Pharmacokinetic of lisinopril, enalapril and enalaprilat in renal failure: effects of haemodialysis. **Br.J.Clin.Pharmacol.**, **26**: 781-786.
- KELLY,J.G.; DOYLE,J.; DONOHUE,J.; LAHER,M.; VANDEMBURG,M.J.; CURRIE,W.J.C.; COOPER,W.D. (1986). Pharmacokinetics of enalapril in normal subjects and patients with renal impairment. **Br.J.Clin.Pharmacol.**, **21**: 63-69.
- KJEKSHUS,J. & SWEDBEERG,K. (1989). Enalapril for congestive heart failure. **Am. Jour. Cardiol.**, **63**: 26D-32D.
- KOSTIS,J.B. (1989). Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. Emerging differences and new compounds. **Am.J. Med.**, **2**: 57-64.
- LARACHELLE,P.; GUTKOWSKA,J.; SCHIFFRIN,E.; KUCHEL,O.; HAMET,P. et al (1985). Effect of Enalapril on renin, Angiotensin Converting Enzyme Activity, Aldosterone and Prostaglandins in patients with hypertension. **Clin. Invest. Med.**, **8**: 197-201.

- LARAGH, J.H.; CASE, D.B.; WALLACE, J.M.; KEIM, H. (1977). Blockade of renin or angiotensin for understanding human hypertension: A comparison of propranolol, saralasin and converting enzyme blockade. **Fed. Proc.**, **36(Suppl.5)**: 1781-1787.
- LARAGH, J.H. (1984). Concept of anti-Renin system therapy. Historic perspective. **Am. J. Med.**, **20**: 1-5.
- LARMOUR, I.; JACSON, B.; CUBELLA, R.; JHNSTON, C.I. (1985). Enalapril (MK-421) activation in man: importance of liver status. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, **19**: 701-704.
- LEES, K.R. & REID, J.L. (1987). Age and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of chronic Enalapril treatment. **Clin. Pharmacol. Ther.**, **41**: 597-602.
- LEVENSON, D.J.; SIMMONS, C.E. Jr., BRENNER, B.M. (1982). Aracdonic acid metabolism, prostaglandins and kidney. **Am.J. Med.**, **72**: 354-374.
- LOWENTHAL, D.T.; IRVIN, J.D.; MERRILL, D.; SARIS, S.; ULM, E.; GOLDSTEIN, S.; HICHENS, M.; KLEIN, L.; TILL, A.; HARRIS, K. (1985). The effect of renal function on enalapril kinetics. **Clin. Pharmacol. Ther.**, **38(Suppl.6)**: 661-666.
- MacFADYEN, R.J.; MEREDITH, P.A.; ELLIOT, H.L. (1993). Enalapril clinical pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships. **Clin. Pharmacokinet.**, **25(Suppl.4)**: 274-282

- MacGREGOR,G.A.; MARKANDU,N.D.; BAYLISS,J.; ROULSTON,J.E.; SQUIRES,M. et al (1981). Non-sulfhydryl-containing angiotensin-converting enzyme inhibitor (MK-421): evidence for a role of renin system in normotensive subjects.**Br. Med. J.**, **283**: 401-403.
- McGIFF,J.C.; TERRAGNO,N.A.; MALIK,K.V.; LONIGRO,A.J. (1972). Release of prostagandin E like substance from canine kidney by BK. **Circ. Res.**, **31**: 36-41.
- MENTO,P.F. & WILKES B.M. (1987). Plasma Angiotensin and blood pressure during converting enzyme inhibition. **Hypertension**, **9 (Suppl. 3)**: 42-48.
- MILLER, V.M. (1990). Does antihypertensive therapy improve the function of vascular endothelium. **Hypertension**, **16**: 541-543.
- MITTMAN,N.; DUBROW,A.; FLAMENBAUM,W. (1985). Enalapril and Hydrochlorothiazide (HCTZ) combination therapy: Effect on blood pressure (BP), Plasma Renin Activity (PRA) and Urinary Prostaglandin (PG) excretion (1985). **J. Clin. Pharmacol.**, Abstract, **25**: 469.
- ONDETTI,M.A. & CUSHMAN,D.W. (1982). Enzymes of the renin angiotensin system and their inhibitors. **Ann. Rev. Biochem.**, **51**: 283.
- ONDETTI,M.A. (1988). Structural relationships of angiotensin converting-enzyme inhibitors to pharmacologic activity. **Circulation**, **77 (Suppl.6)**: 74-78
- OHNISHI,A.; TSUBOI,Y.; ISHIZAKI,T.; KUBOTA,K.; OHNO,T.; YOSHIDA,H.; KANEZAKI,A.; TANAKA,T. (1989). Kinetics and dynamics of Enalapril in patients with liver cirrhosis. **Clin. Pharmacol. Ther.**, **45**: 657-664.

PATCHETT,A.A.; HARRIS,E.; TRISTRAM,E.W.; WYAVRATT,M.J.; WU,M.T.; TAUB,D.; PETERSON,E.R.; IKELER,T.J.; BROEKE,J.; PAYNE,L.G.; ONDEYKA,D.L.; THORSETT,E.D.; GREENLEE,W.J.; LOHR,N.S.; HOFFSOMMER,R.D.; JOSHUA,H.; RUYLE,W.V.; TOTHROCK, J.W.; ASTER,S.D.; MAUCCOCK,A.L.; ROBINSON,F.M.; HIRSCHMANN,R.; SWEET,C.S.; ULM,E.H.; GROSS,D.M.; VASSIL,T.C.; STONE,C.A. (1980). A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Nature**, **288**: 280-283.

RILEY,L.J.Jr., VLASSES,P.H. & FERGUSON,R.K. (1985). Clinical and pharmacology and therapeutic applications of the new oral converting enzyme inhibitor Enalapril. **Am. Heart J.**, **109**: 1085-1089.

ROWLAND,M.; TOZER,T.N.; **Clinical Pharmacokinetics - Concepts and Applications**, **13 ed** (1995), pag: 203-263.

SAFAR,M.E.; LEVY,B.I.; LAURENT,S.; LONDON,G.M. (1990). Hypertension and the arterial system: clinical and therapeutic aspects. **J. Hypertens.**, **8 (Suppl.7)**: S113-S119.

SCHIFFRIN,E.L.; GUTKOWSKA,J.; THIBAUT,G.; GENEST,J. (1983). Effect of Enalapril (MK-421), an orally active angiotensin I converting enzyme inhibitor, on blood pressure, active and inactive plasma renin, urinary prostaglandin E₂, and kallikrein excretion in conscious rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **62**: 116-123.

SHIOYA,H.; SHIMOTO,M. & DAWAHARA,Y. (1991). Determination in plasma of ACE inhibitor by inhibitor-binding assay. **J. Chromatogr.**, **568**: 309-314.

- SHOBACK,D.M.; WILLIAMS,G.H.; SWARTZ,S.L.; DAVIES,R.O.; HOLLEMBERG,N.K. (1983). Time course and effect of sodium intake on vascular and hormonal responses to Enalapril (MK-421) in normal subjects. **J. Card. Pharmacol.**, **5**: 1010-1018.
- SHAPIRO,R. & RIORDAN,J.F. (1984). Inhibition of angiotensin converting-enzyme: Mechanism and substrate dependence. **Biochemistry**, **23**: 5225-5233.
- SWANSON,B.N.; HICHENS,M.; MOJAVERIAN,P.; FERGUSON,R.K.; VLASSES,P.H.; DUDASH,M. (1981). Angiotensin converting enzyme activity in human serum: relationship to enzyme inhibitor *in vivo* and *in vitro*. **Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.**, **33**: 525-536.
- SWANSON,B.N., VLASSES,P.H., FERGUSON,R.K., BERGQUIST,P.A., TILL,A.E. & et al (1984). Influence of food on the bioavailability of Enalapril. **J. Pharm. Sci.**, **73**: 1655-1657.
- SWEET,C.S. & ULM,E.H. (1984). Enalapril. **New drugs annual: Card. Drugs**, **2**: 1-17.
- SWLES,J.D. (1994). The Renin-Angiotensin System as a target for therapeutic intervention. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **24 (Suppl.2)**: 1-5.
- TILL,A.E., GOMEZ,H.J., HICHENS,M., BOLOGNESE,M.S. & LANT,A.F. (1984). pharmacokinetics of repeated single oral doses of enalapril maleate in normal volunteers. **Bioph. and Drug Dispos.**, **5**: 273-280.
- TODD,P.A. & GOAL,K.L. (1992). Enalapril: A reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in hypertension. **Drugs**, **43**: 346-381.

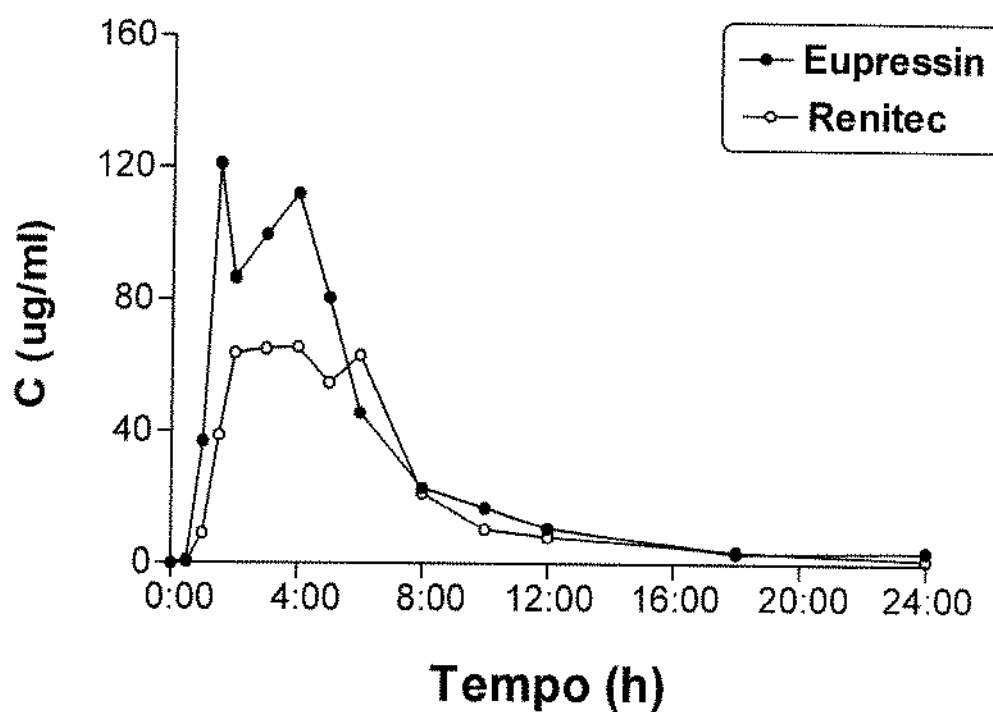
- TODD,P.A. & HEEL,R.C. (1986). Enalapril: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. **Drugs**, **31**: 198-248.
- ULM,E.H. (1983). Enalapril maleate (MK-421), a potent, non-sulphydril angiotensin-converting enzyme inhibitor: absorption, disposition and metabolism in man. **Drug Metabolism Review**, **14**: 99-110.
- ULM,E.H., HICHENS,M., GOMEZ,H.J., TILL,A.E., HAND,E. & et al (1982). Enalapril maleate and Lysine analogue (MK-521) disposition in man. **Br.J.Clin.Pharmacol.**, **14**: 357-362.
- UNGER, T.; SCHULL, B.; RASCHLER, W.; LANG, R.E. & GANTEN, D. (1982). Selective activation of the converting enzyme inhibitor MK 421 and comparison of its active diacid form with captopril in different tissues of rats. **Biochem. Pharmacol.**, **31**: 3063-3070.
- UNGER, T; GANTEN, D.L.R.E., SCHOLKENS,B.A. (1985). Persistent tissue converting enzyme inhibition following chronic treatment with Hoe 498 and MK 421 in spontaneously hypertensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **7**: 36-41.
- VANHOUTTE,P.M.; AUCH-SCHWELK,W.; BIONDI,M.L.; RENZ,R.R.; SCHINI,V.B.; VIDAL,M.J. (1989). Why are converting enzyme-inhibitors vasodilators. **Br.J.Clin.Pharmacol.**, **28**: S95-S104.
- VANHOUTTE,P.M, BOULANGER,C.M., ILLIANO,S.C., NAGAO,T., VIDAL,M., & OUBOULI,J.V. (1993). Endothelium-Dependent Effects of Converting-Enzyme Inhibitors. **Jour.Cardiovasc. Pharmac.**, **22 (Suppl.5)**: S10-S16.

- VELASCO,M., SILVA,H., MORILLO,J., PELLICER,R., RAMIREZ,A. & et al (1985). Haemodynamic effects of enalapril, a new converting enzyme inhibitor, in hypertensive patients. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, **29**: 17-20.
- VERTES,V. & HAYNIE,R. (1992). Comparative pharmacokinetics of captopril, enalapril, and quinapril. **Am. J. Cardiol.**, **69**: 8C-16C.
- VLASSES P.H., FERGUSON R.K., SMITH J.B., ROTMENSCH H.H. & SWANSON B.N. (1983). Urinary excretion of prostacyclin an Tromboxane A2 metabolites after Angiotensin Enzyme Inhibition in hypertensive patients. **Prostagl. Leuk. and Med.**, **11**: 143-150.
- VLASSES,P.H., FERGUSON,R.K., SMITH,J.B., ROTMENSCH,H.H., & SWANSON,B.N. (1983). Urinary excretion of Prostacidin an Tromboxane A2 metabolites after Angiotensin Enzyme Inhibition in hypertension patients. **Prostagl. Leukotr. and Med.**, **11**: 143-150.
- WIEMER,G.; SCHOLKENS,B.A.; BECKER,R.H.A. & BUSSE R. (1991). Ramiprilat enhances endotelial autacoid formation by inhibition beakdown of endothelium-derived bradykinin (1991). **Hypertension**, **18**: 558-563.
- WEISSER,K., SCHLOOS,J., LEHMANN,K., DIISING,R., VETTER,H., & MUTSCHLER,E. (1990). Pharmacokinetics and converting enzyme inhibition after morning and evening administration of oral enalapril to healthy subjects.**Eur. J. Clin. Pharmacol.**, **40**: 95-99.
- WILLIAMS,G.H. (1988): Converting-enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. **N. Engl.J. Med.**, **319**(23): 1517-1524.
- ZANNAD,F., BROEK,S.A.J. & BORY,M. (1992). Comparasion of treatment with Lisinopril for congestive heart failure. **Am. J. Cardiol.**, **70**: 78C-83C.

ANEXO

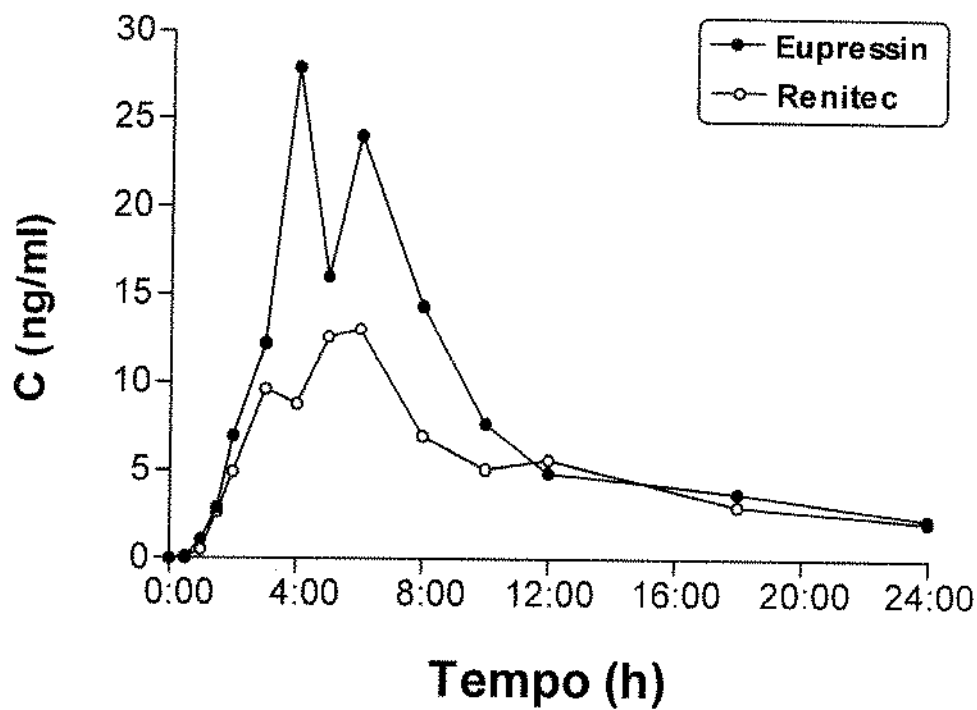
Dados da Concentração individual vs Tempo (Figura) e Parâmetros Farmacocinéticos Médios (Tabelas) para Enalaprilato.

VOL. I - ELM



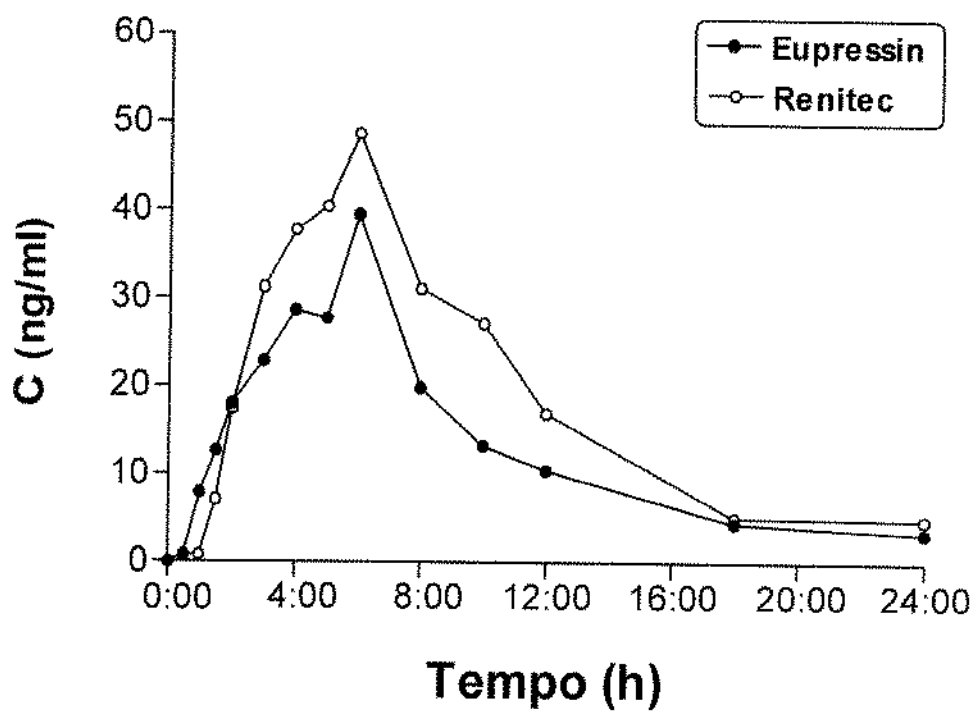
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	661	477
C _{max} ng/ml	121	66
t _{max} h	1.5	4

VOL. II - LFF



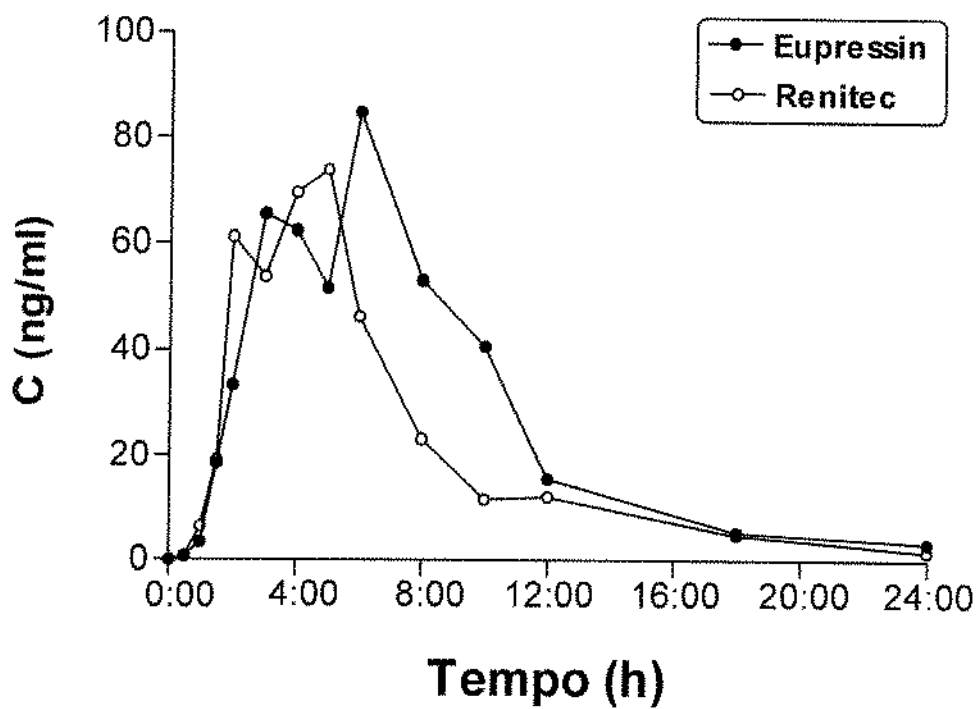
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	193	128
C _{max} ng/ml	28	13
t _{max} h	4	6

VOL. III - JRC



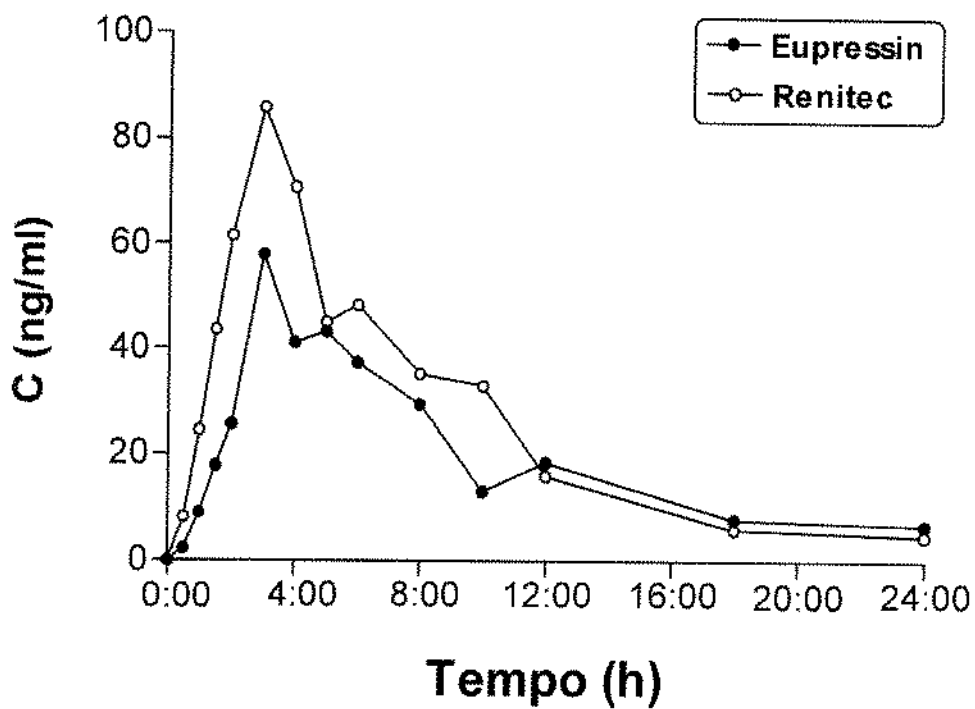
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	308	430
C _{max} ng/ml	40	49
t _{max} h	6	6

VOL. IV - JMP



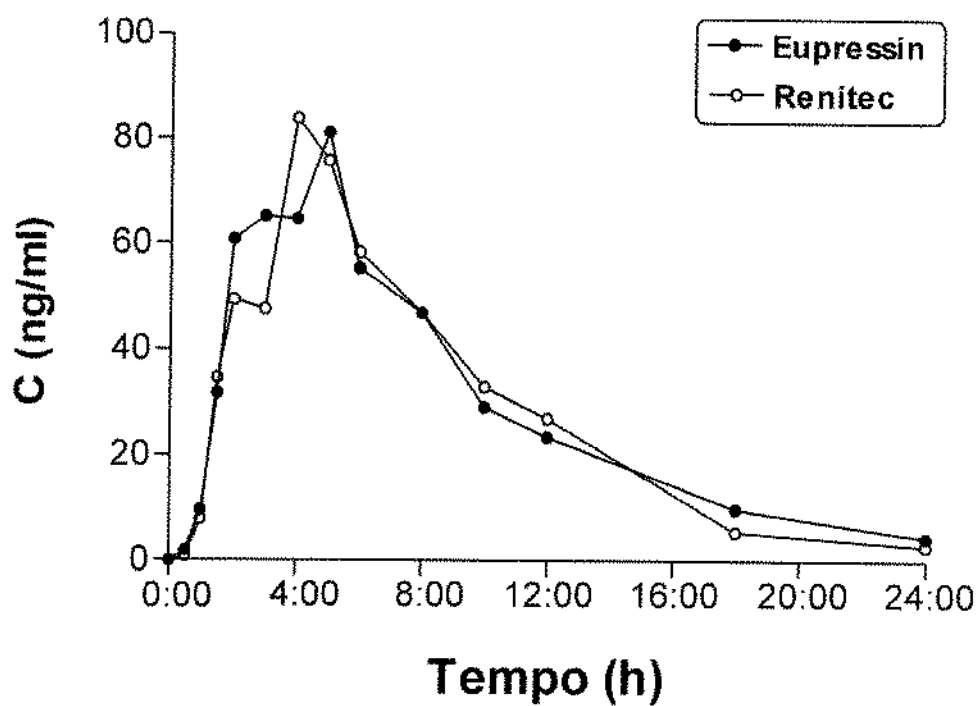
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	636	479
C _{max} ng/ml	85	74
t _{max} h	6	5

VOL. V - NS



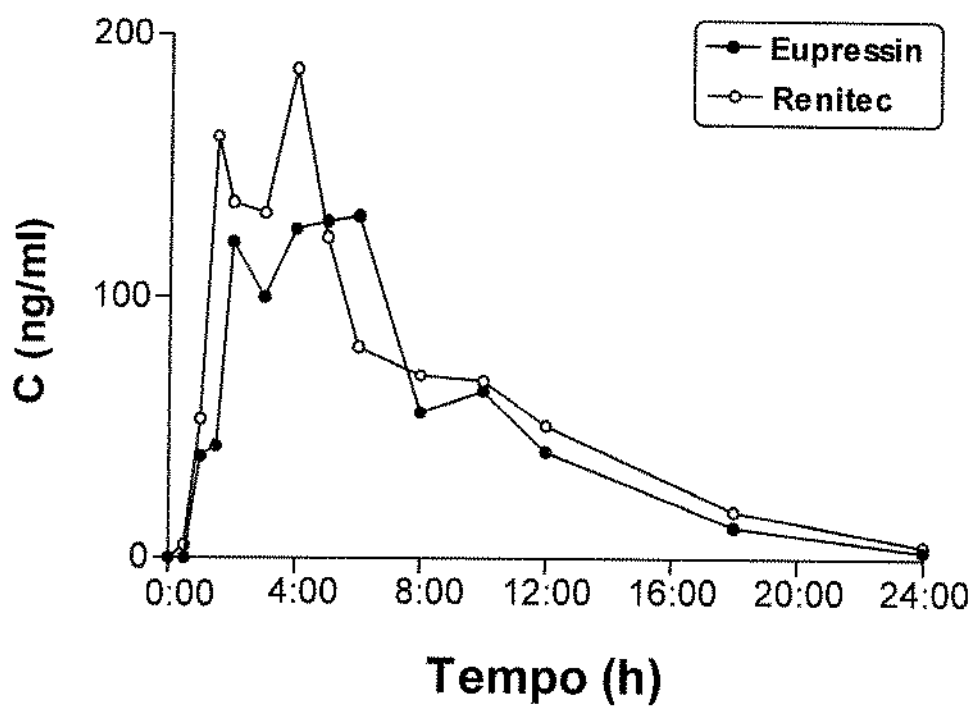
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	458	608
C _{max} ng/ml	58	86
t _{max} h	3	3

VOL. VI - SAP



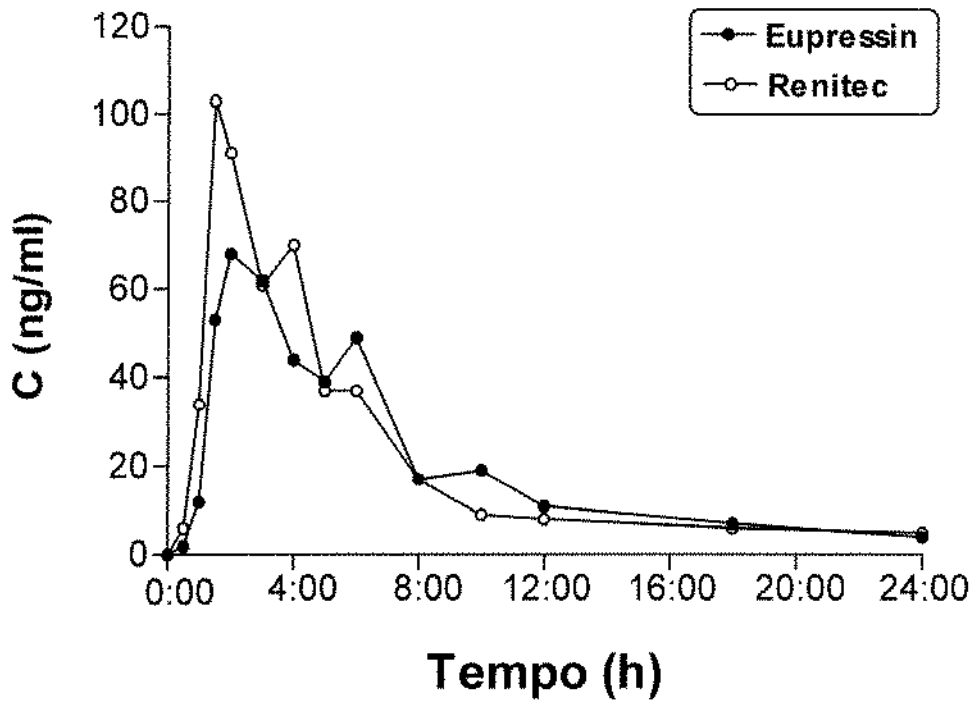
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	682	665
C _{max} ng/ml	81	84
t _{max} h	5	4

VOL. VII - ATS



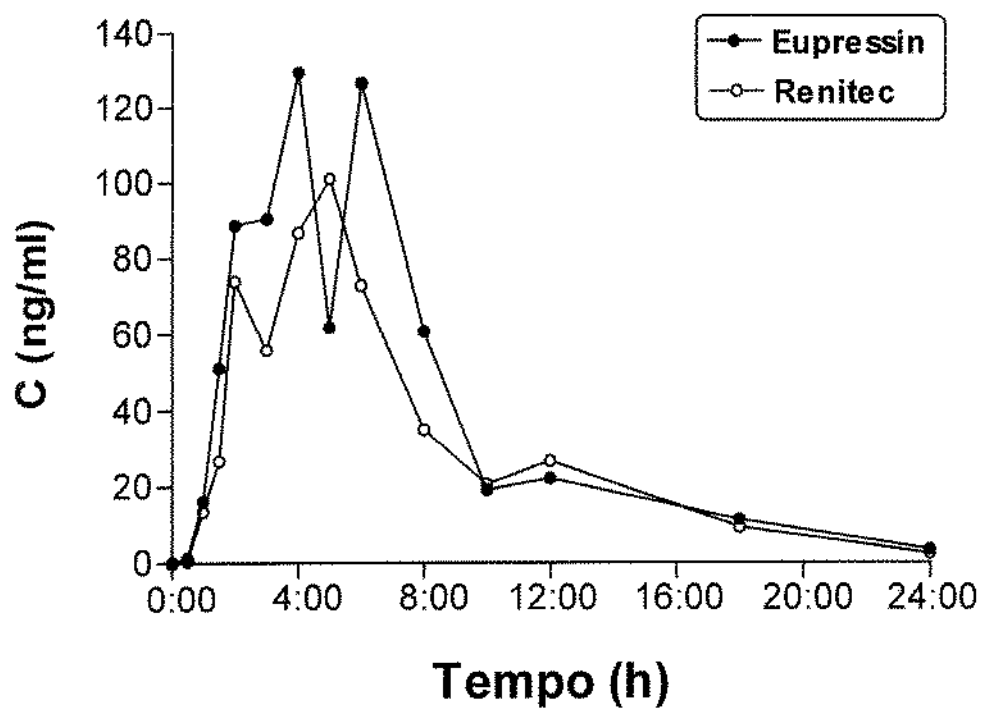
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1167	1383
C _{max} ng/ml	131	187
t _{max} h	6	4

VOL. VIII - JDM



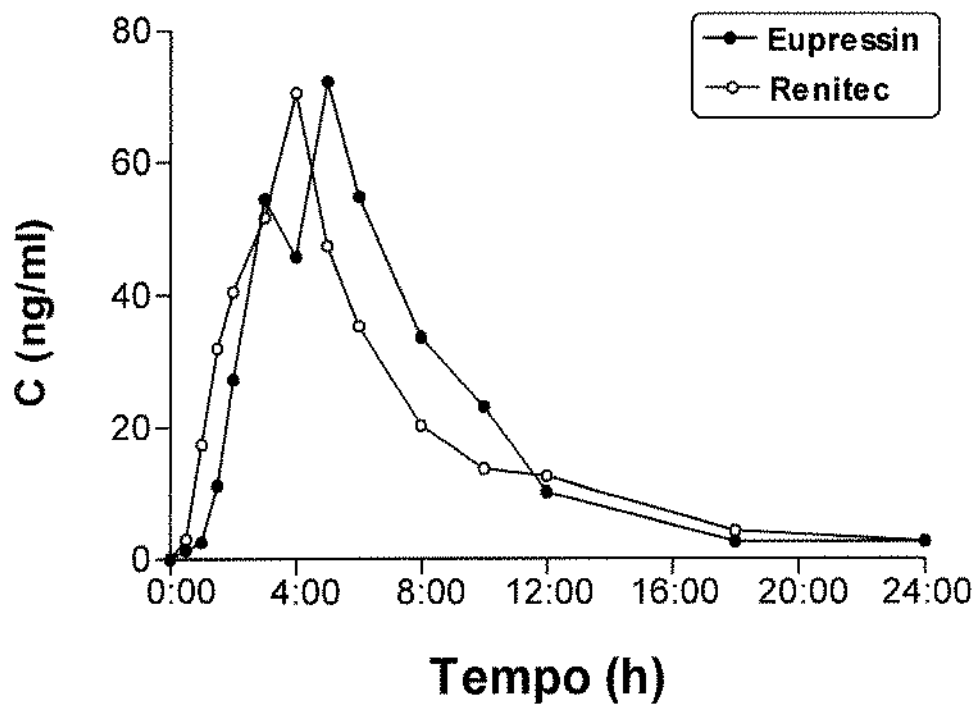
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	472	502
C _{max} ng/ml	68	103
t _{max} h	2	1.5

VOL. IX - ASR



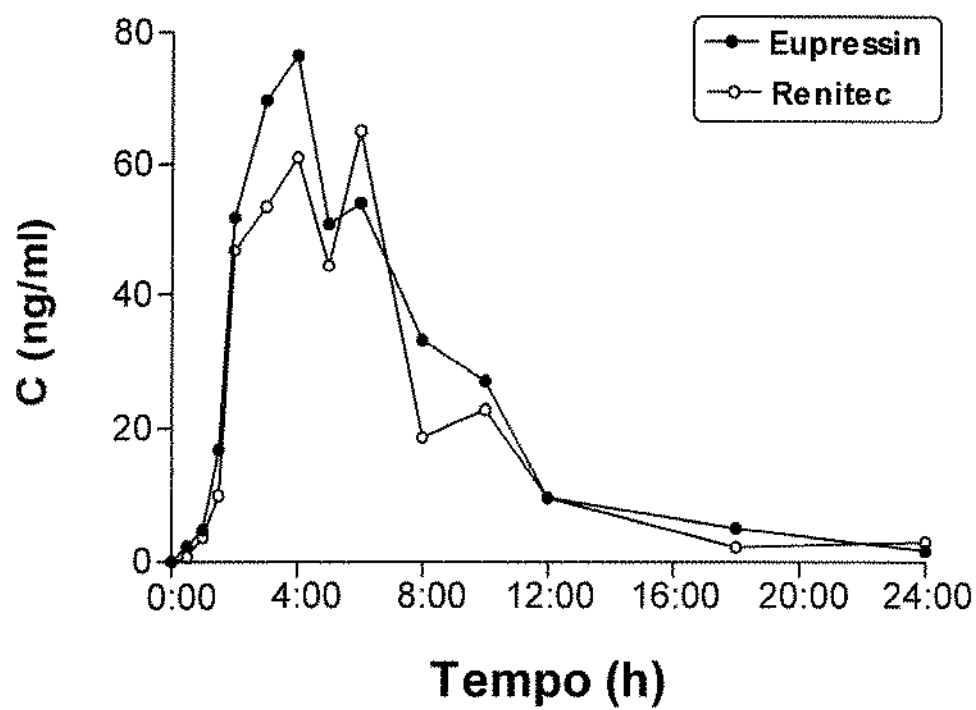
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	900	712
C _{max} ng/ml	129	101
t _{max} h	4	5

VOL. X - CAS



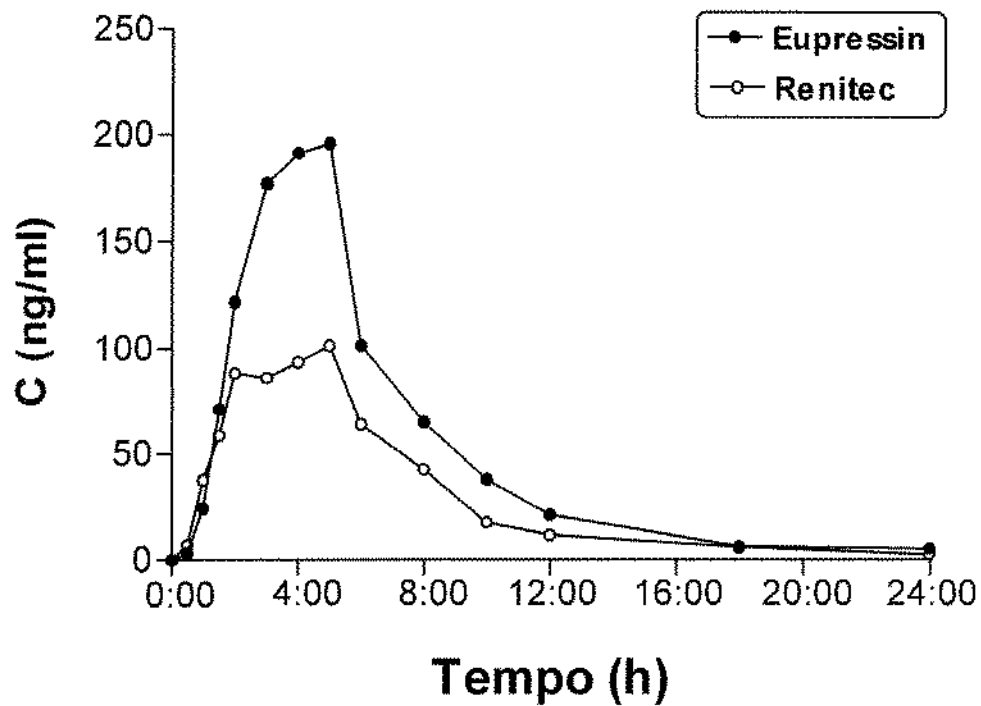
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	462	432
C _{max} ng/ml	72	70
t _{max} h	5	4

VOL. XI - AVS



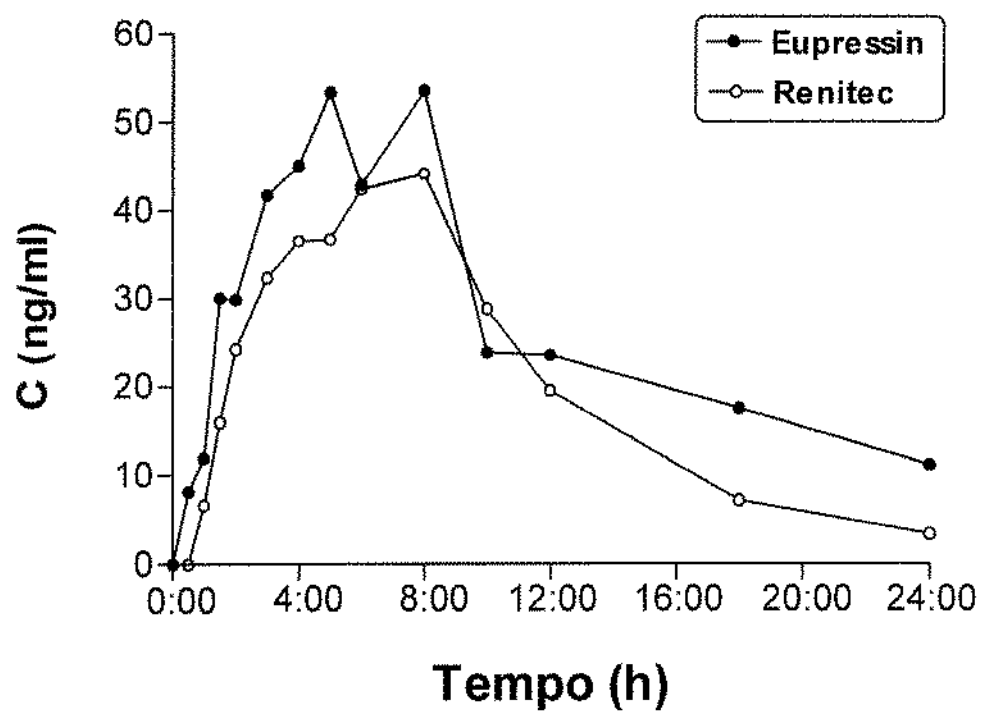
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	524	443
C _{max} ng/ml	77	65
t _{max} h	4	6

VOL. XII - ES



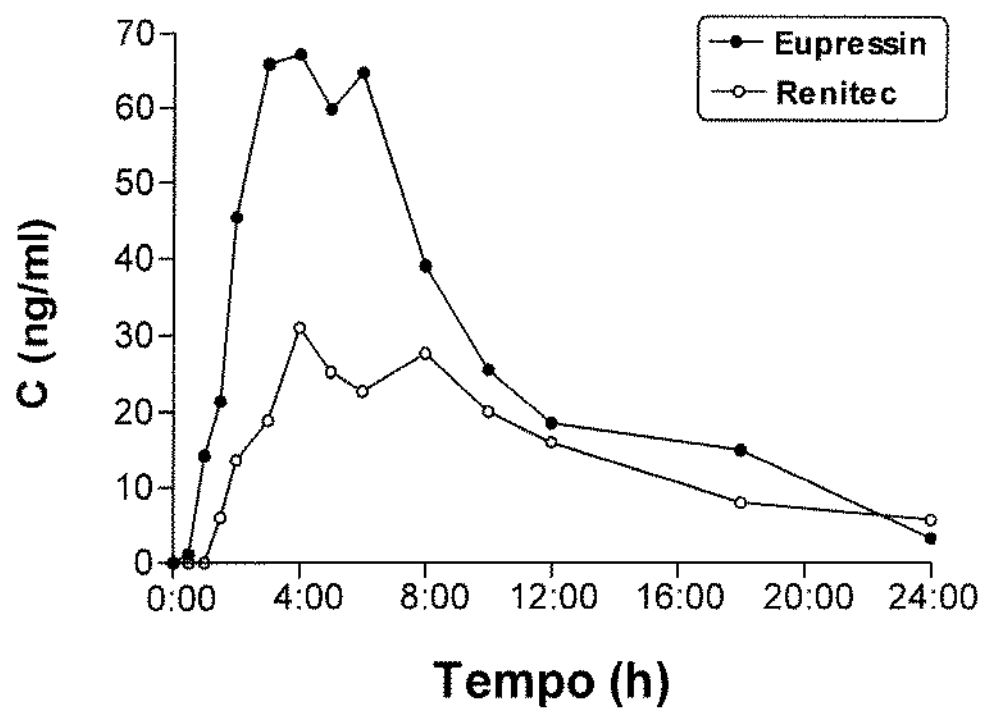
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1203	708
C_{max} ng/ml	196	102
t_{max} h	5	5

VOL. XIII - IM



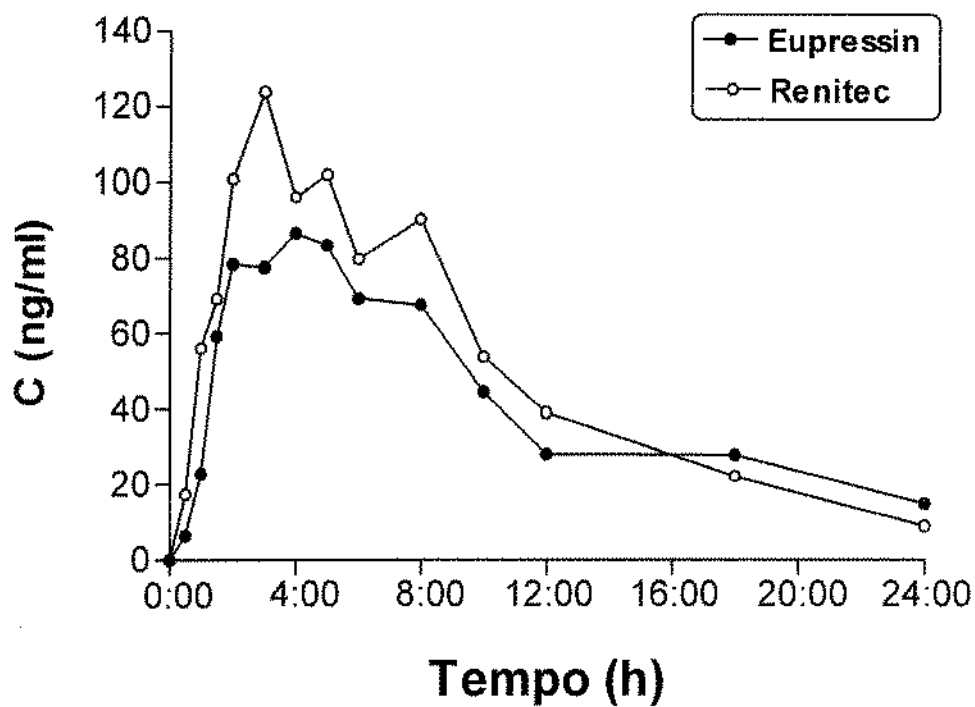
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	639	476
C _{max} ng/ml	54	44
t _{max} h	8	8

VOL. XIV - EM



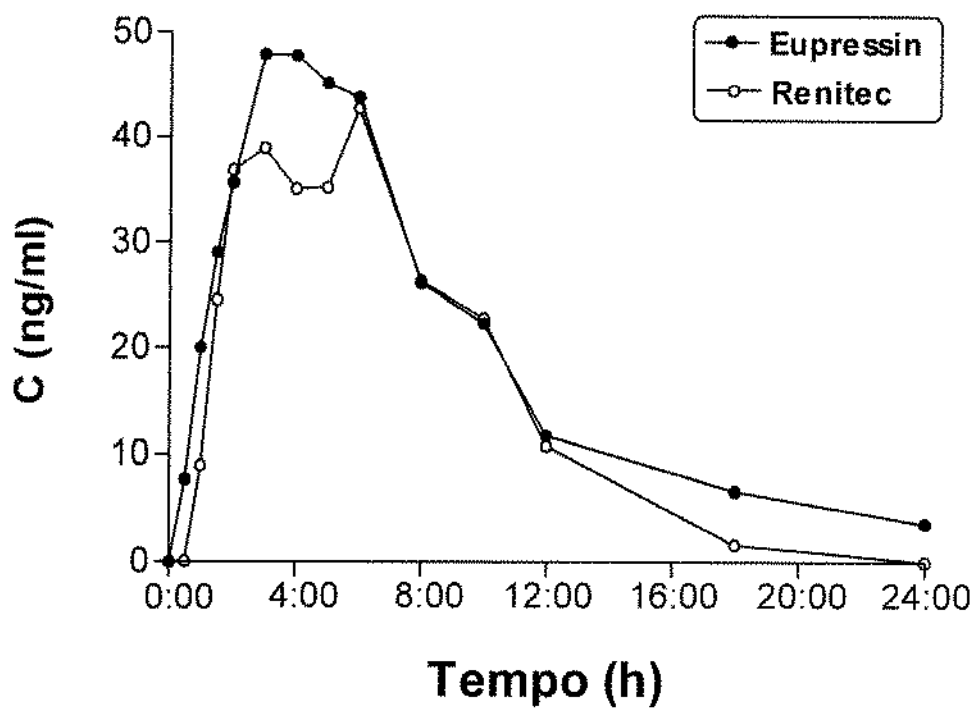
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	645	347
C _{max} ng/ml	67	31
t _{max} h	4	4

VOL. XV - ESM



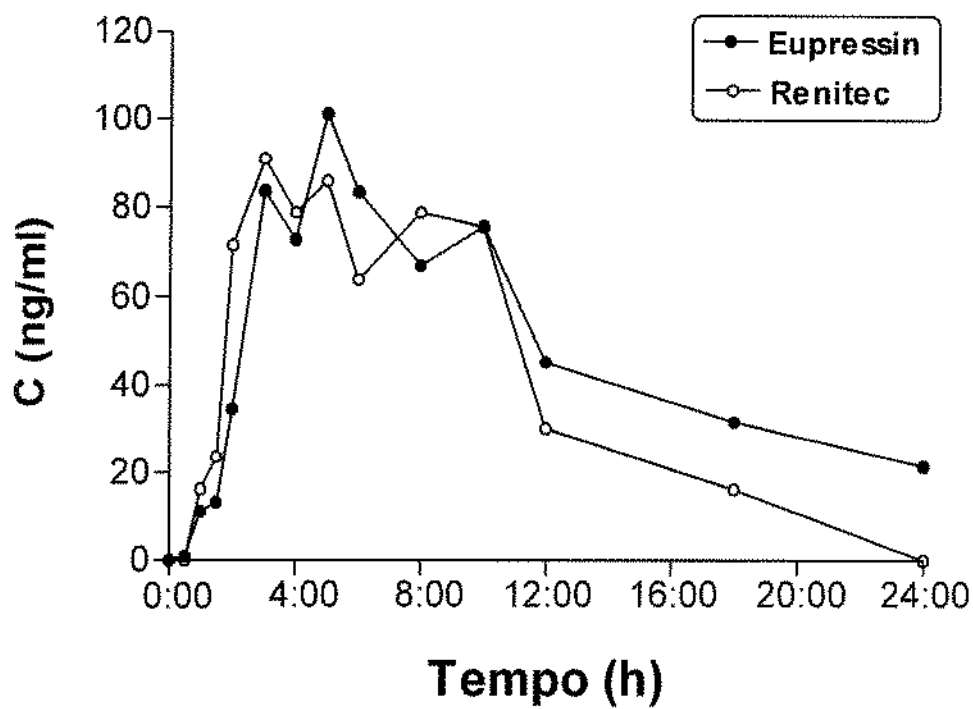
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1004	1193
C _{max} ng/ml	87	124
t _{max} h	4	3

VOL. XVI - AFP



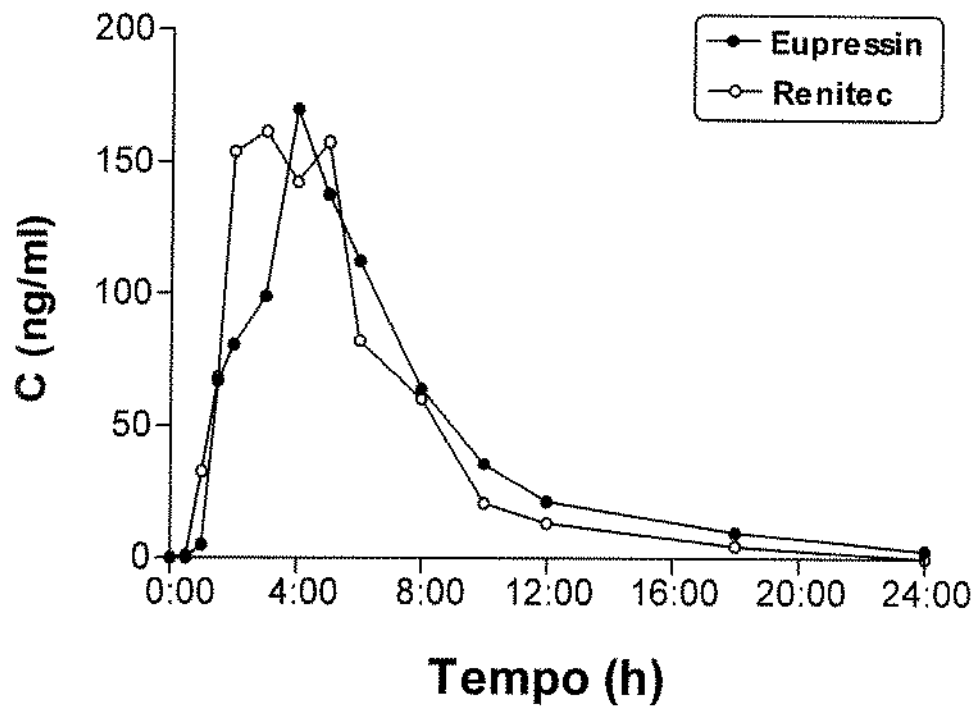
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	456	369
C _{max} ng/ml	48	43
t _{max} h	3	6

VOL. XVII - JRM



	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1144	952
C _{max} ng/ml	101	91
t _{max} h	5	3

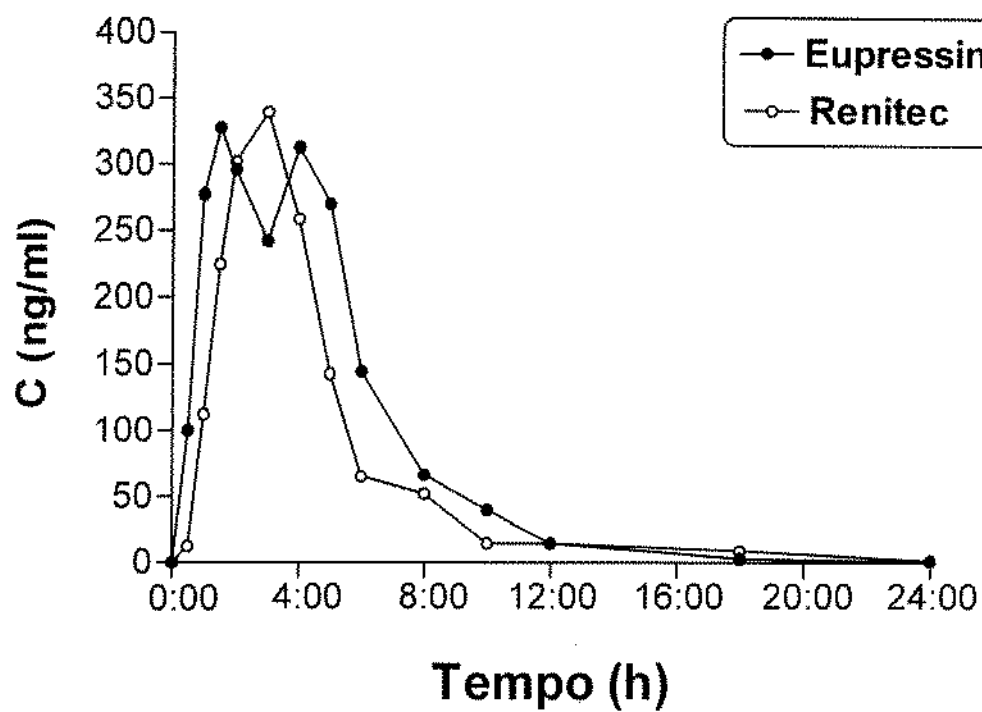
VOL. XVIII - LFC



	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1025	995
C _{max} ng/ml	170	162
t _{max} h	4	3

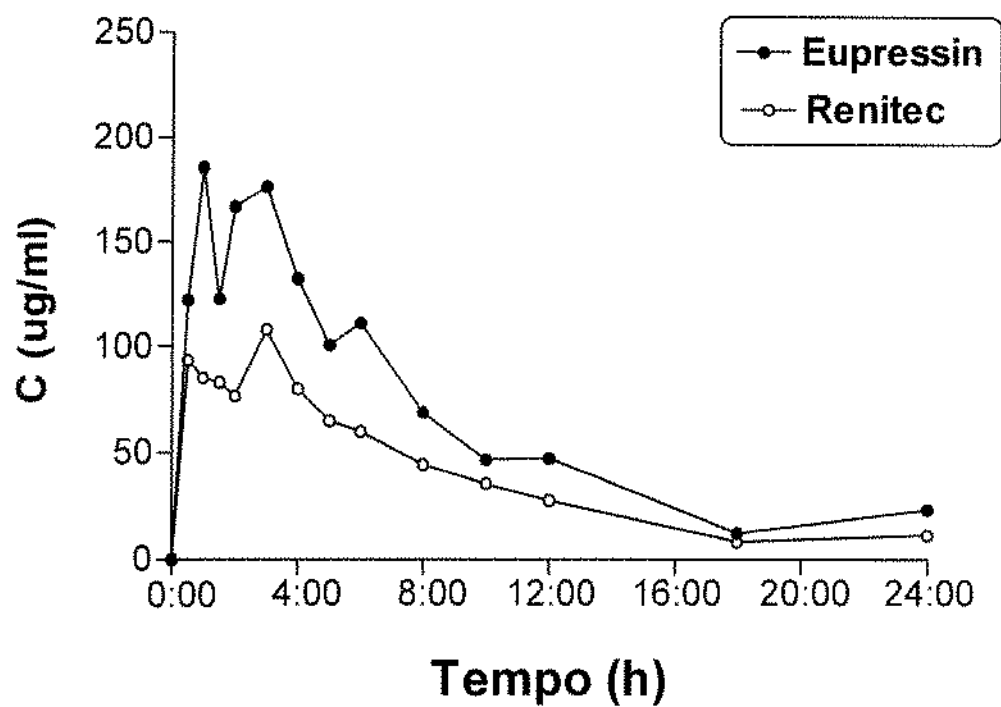
Dados da Concentração individual vs Tempo (Figura) e Parâmetros Farmacocinéticos Médios (Tabelas) para Enalapril Total.

VOL. I - ELM



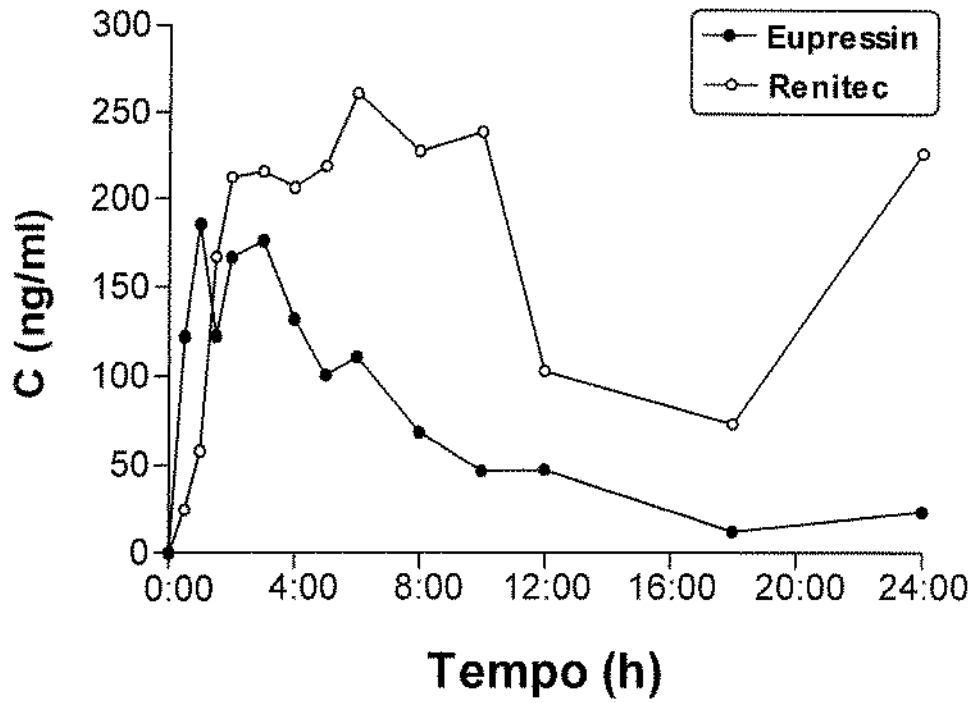
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1911	1489
C _{max} ng/ml	328	339
t _{max} h	1.5	3

VOL. II - LFF



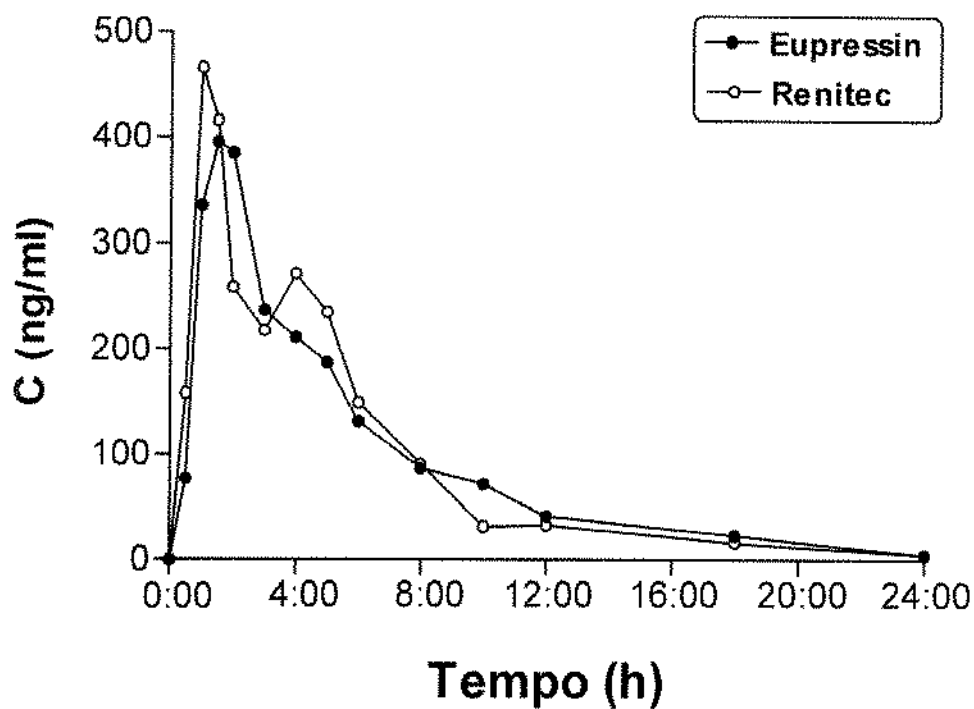
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1270	885
C _{max} ng/ml	200	108
t _{max} h	2	3

VOL. III - JRC



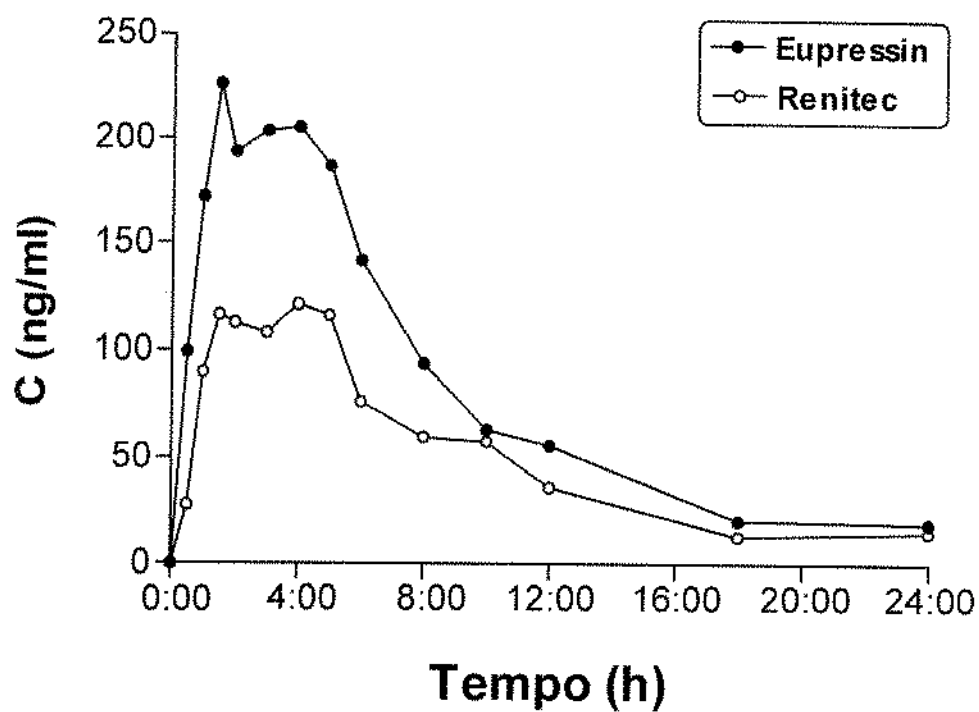
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1481	2885
C _{max} ng/ml	185	261
t _{max} h	1	6

VOL. IV - JMP



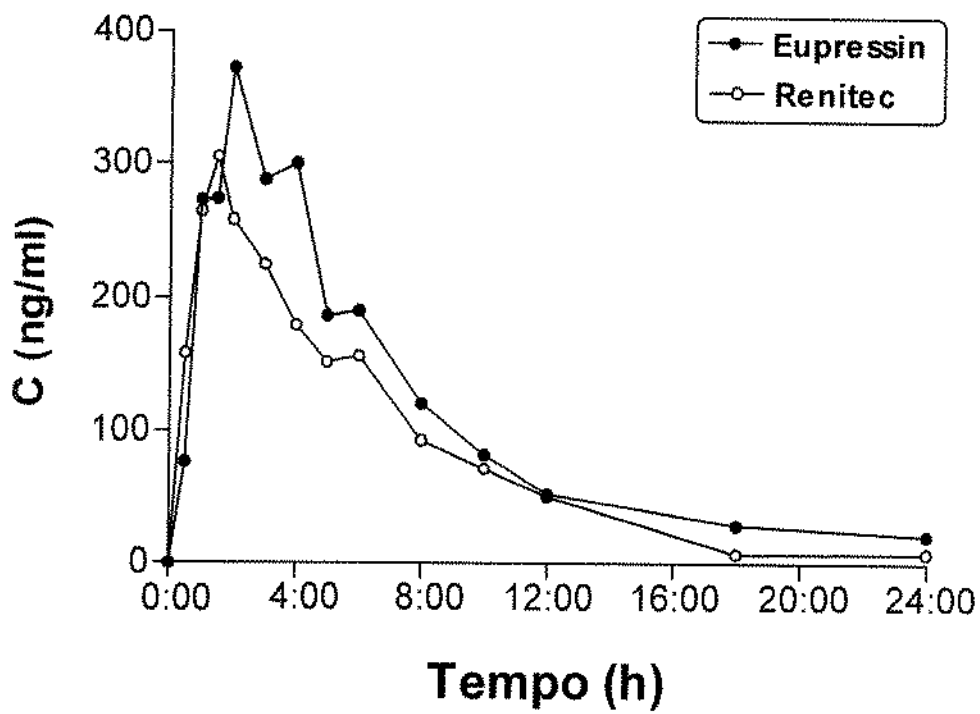
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	2161	2152
C _{max} ng/ml	396	466
t _{max} h	1.5	1

VOL. V - NS



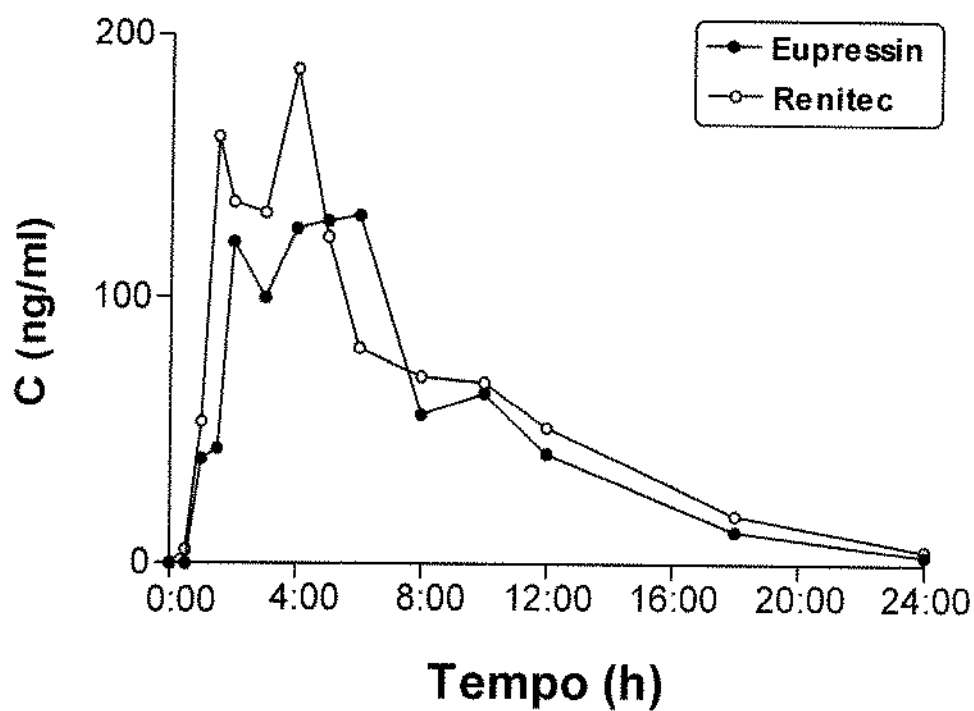
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1163	1922
C _{max} ng/ml	121	226
t _{max} h	4	1.5

VOL. VI - SAP



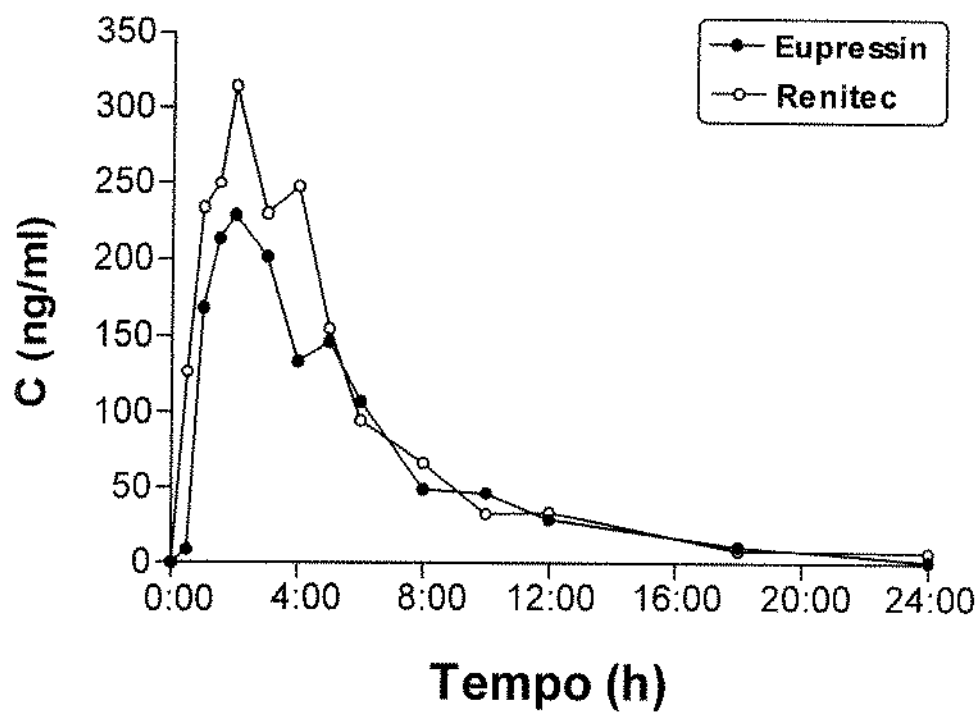
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	2508	1950
C _{max} ng/ml	373	305
t _{max} h	2	1.5

VOL. VII - ATS



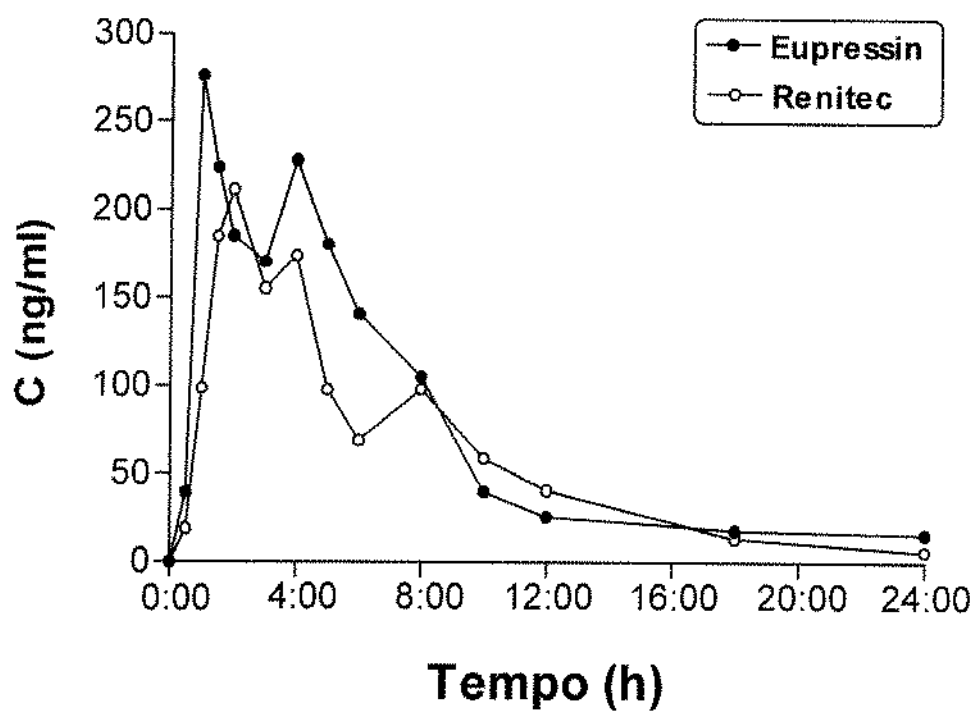
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1167	1383
C _{max} ng/ml	131	187
t _{max} h	6	4

VOL. VIII - JDM



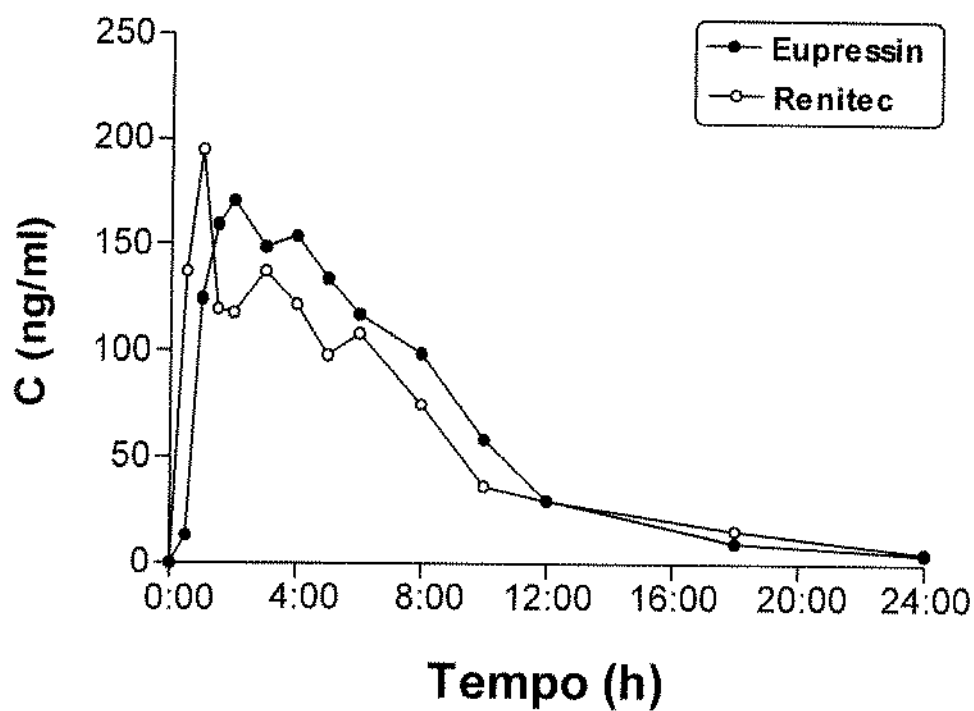
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1386	1722
C _{max} ng/ml	228	315
t _{max} h	2	2

VOL. IX - ASR



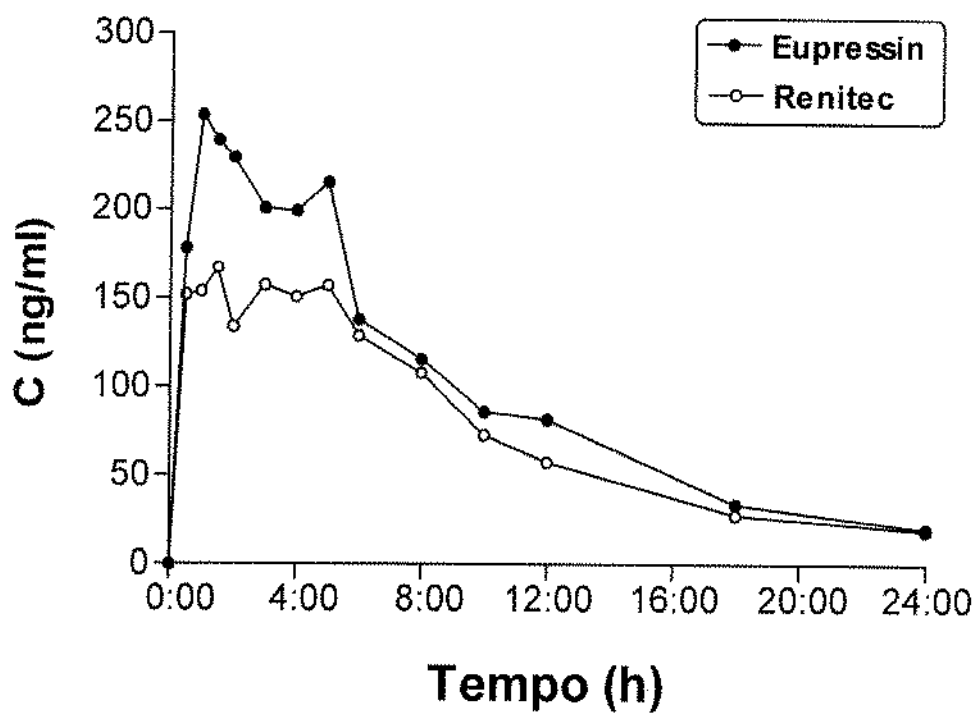
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1749	1421
C _{max} ng/ml	276	212
t _{max} h	1	2

VOL. X - CAS



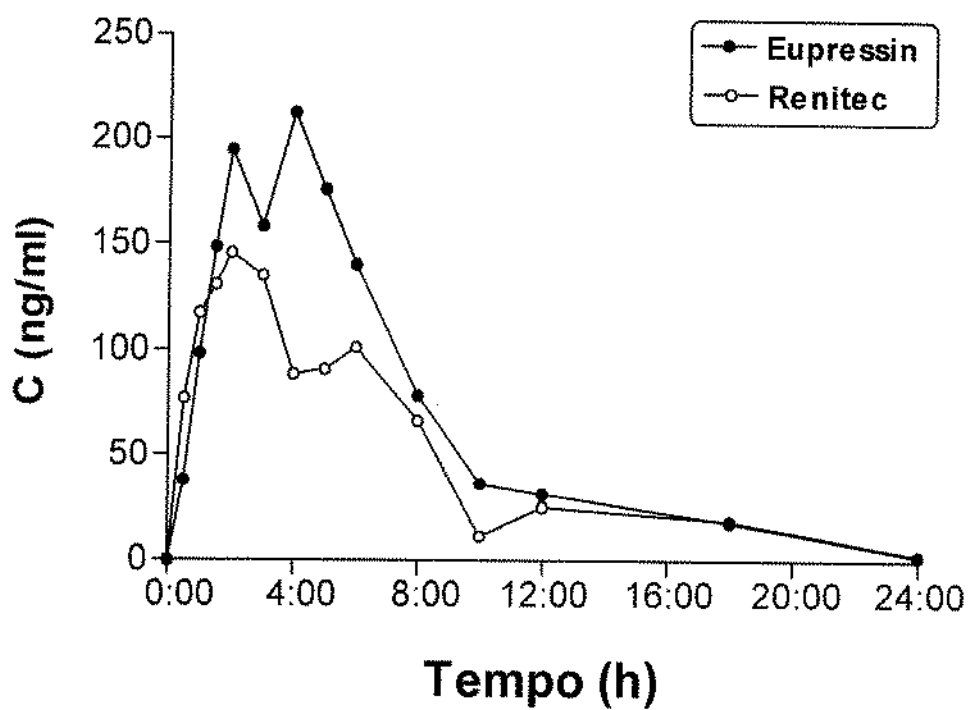
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1397	1285
C _{max} ng/ml	171	195
t _{max} h	2	1

VOL. XI - AVS



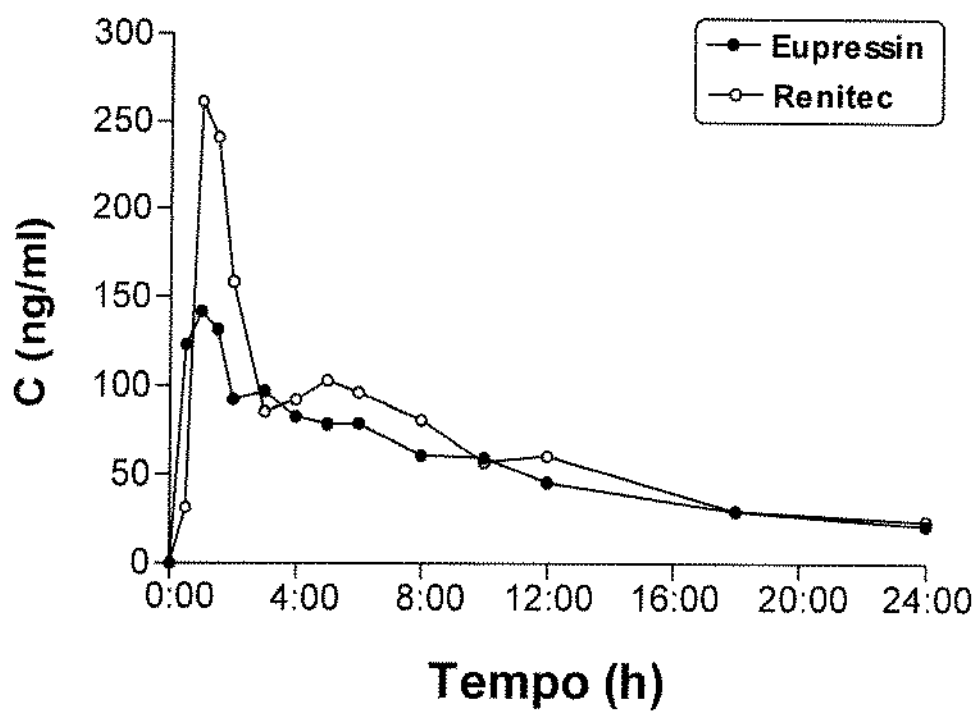
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	2327	1813
C _{max} ng/ml	254	167
t _{max} h	1	1.5

VOL. XII - ES



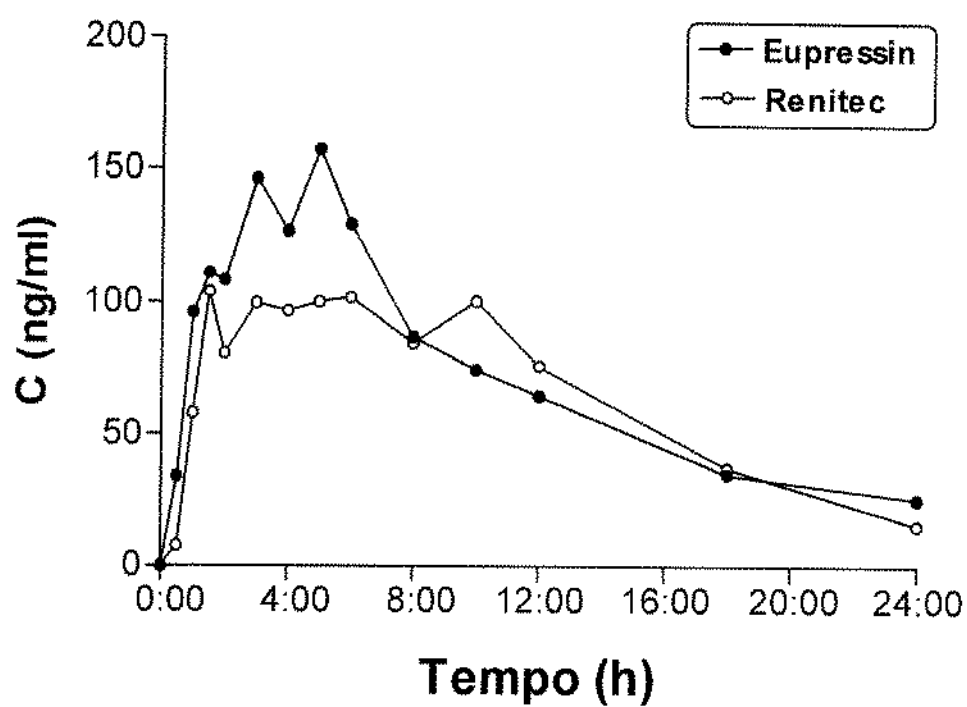
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1515	1114
C_{max} ng/ml	213	146
t_{max} h	4	2

VOL. XIII - IM



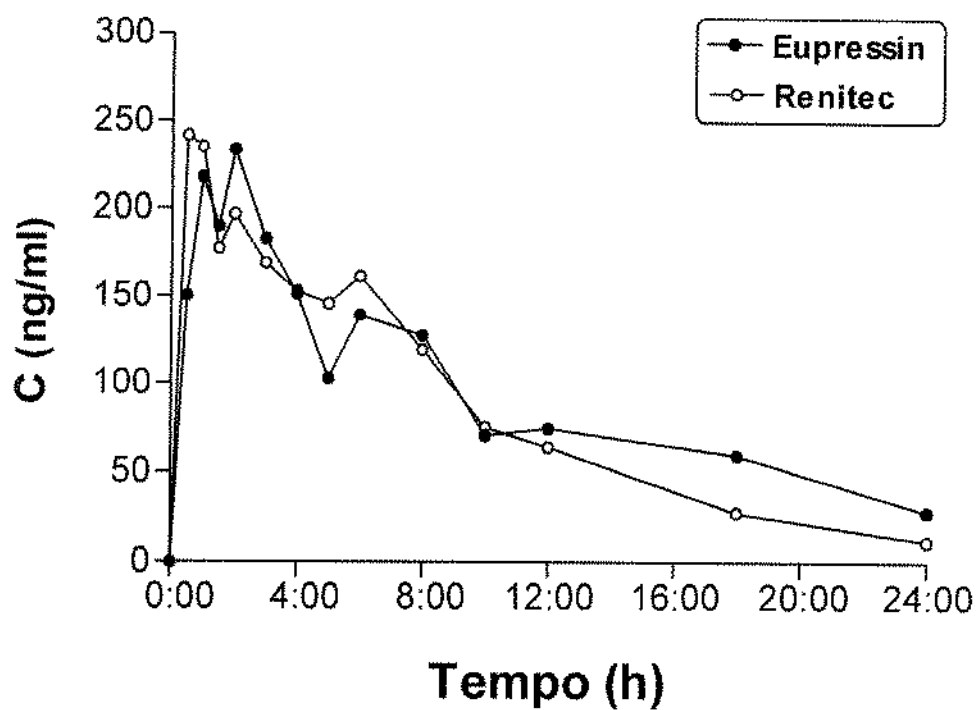
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1311	1583
C _{max} ng/ml	142	261
t _{max} h	1	1

VOL. XIV - EM



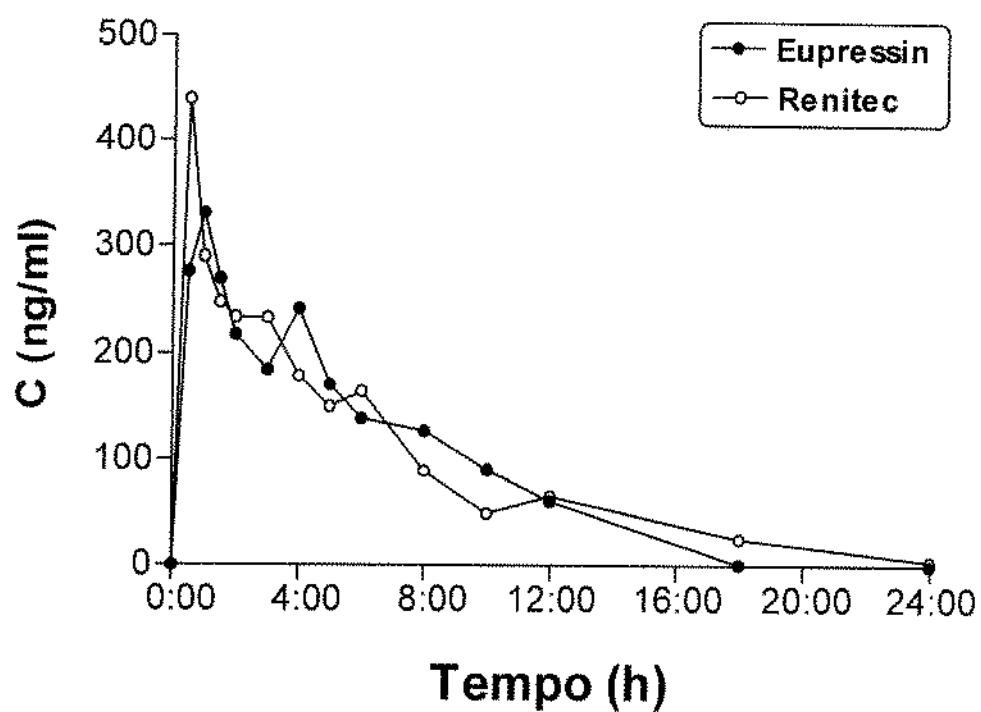
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1695	1541
C_{max} ng/ml	158	104
t_{max} h	5	1.5

VOL. XV - ESM



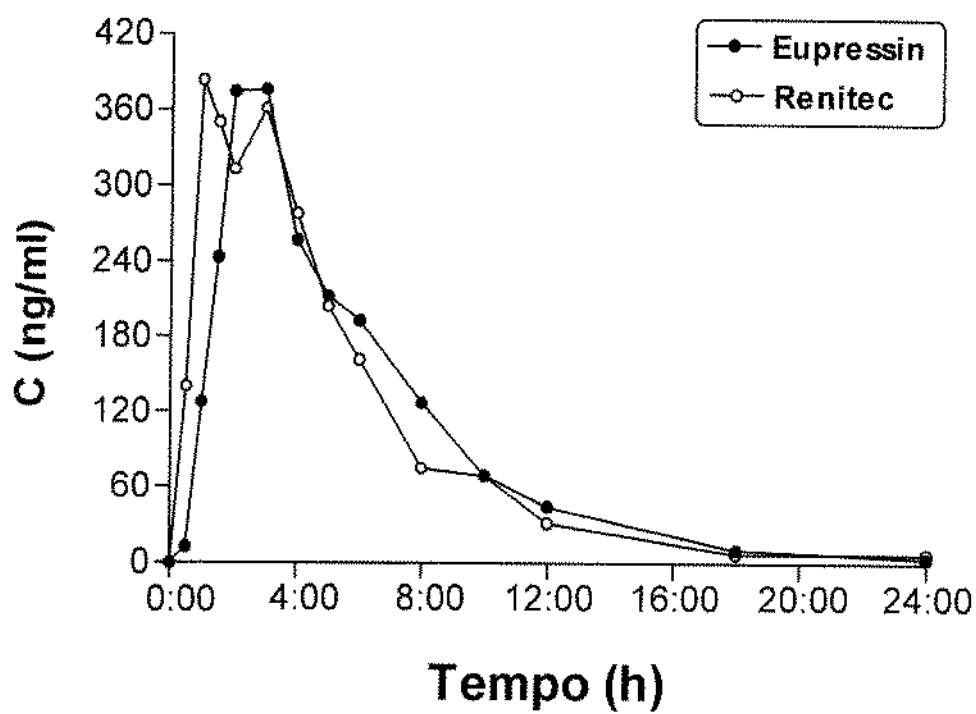
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	2238	2032
C _{max} ng/ml	234	242
t _{max} h	2	0.5

VOL. XVI - AFP



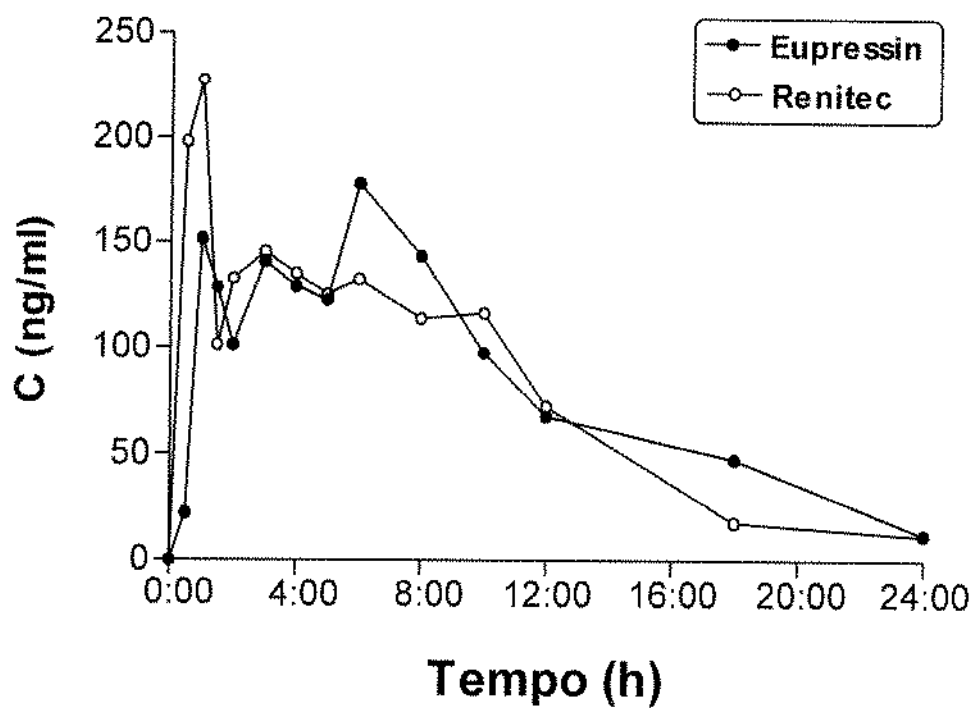
	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	2100	2182
C _{max} ng/ml	331	440
t _{max} h	1	0.5

VOL. XVII - JRM



	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	2256	2241
C _{max} ng/ml	376	383
t _{max} h	3	1

VOL. XVIII - LFC



	Eupressin	Renitec
AUC [0-24] ng/ml*h	1964	1862
C _{max} ng/ml	178	227
t _{max} h	6	1

ABSTRACT

ABSTRACT

Two different normal-release enalapril maleate tablet formulations were evaluated with respect to their relative bioavailability (Eupressin tablets, 10 mg, from Biosintética as the test formulation vs. Renitec tablets, 10 mg, from Merck Sharp & Dhome, as the reference formulation). A single 20 mg oral dose was administered to eighteen healthy male adult volunteers and bioequivalence between both formulation was assessed by comparing both serum enalaprilat and total enalapril (enalaprilat plus enalapril maleate) concentration vs. time curves. Angiotensin converting enzyme (ACE) activity was also quantified in each serum sample. The following pharmacokinetic parameters were obtained for each formulation: area under the time-concentration curves from 0 to 24 h ($AUC_{[0-24]}$), maximum achieved concentration C_{max} and the time at which they occurred (T_{max}). When serum enalaprilat concentration vs. time curves were employed to assess bioequivalence, both formulations were bioequivalent for the extent but not for the rate of absorption. However, no differences for either the extent or the rate absorption were observed when total serum enalapril vs. time curves were analyzed. ACE activity vs. time curves were similar for both formulations and showed that ACE was inhibited by 90% at 3 - 5 h after enalapril administration and remained still inhibited by approximately 50% 24 h after. At this time, circulating enalaprilat or total enalapril levels were more than ten-fold reduced with respect to C_{max} . These results show that complete bioequivalence between both formulations can be concluded from total serum enalapril concentration data, and that serum ACE activity is not a suitable pharmacodynamic approach to assess bioequivalence.

PHARMACOKINETICS AND DISPOSITION

W. Ribeiro · M. N. Muscará · A. R. Martins
H. Moreno Jr · G. B. Mendes · G. de Nucci

Bioequivalence study of two enalapril maleate tablet formulations in healthy male volunteers

Pharmacokinetic versus pharmacodynamic approach

Received: 29 May 1995 / Accepted in revised form: 30 October 1995

Abstract. *Objective:* Two different conventional release enalapril maleate tablet formulations were evaluated for their relative bioavailability (Eupressin tablets 10 mg, Biosintética as the test formulation vs Renitec tablets 10 mg Merck Sharp & Dhome, as the reference formulation). A single 20 mg oral dose of each preparation was administered to 18 healthy male adult volunteers and their bioequivalence was assessed by comparing the serum enalaprilat and total enalapril (enalaprilat plus enalapril maleate) concentration-time curves. Angiotensin converting enzyme (ACE) activity was also quantified in each serum sample.

Results: The pharmacokinetic parameters obtained for each formulation were the area under the time-concentration curve from 0 to 24 h ($AUC_{[0-24]}$), maximum concentration C_{max} and the time at which it occurred (t_{max}). When serum enalaprilat concentration-time curves were employed to assess bioequivalence, the formulations were bioequivalent in the extent but not in the rate of absorption. However, no difference in either the extent or the rate of absorption were observed when serum total enalapril vs time curves were analysed. ACE activity-time curves were similar for both formulations and showed that ACE was 90% inhibited 3-5 h after enalapril administration, and till approximately 50% after 24 h (after). At that time, circulating enalaprilat and total enalapril levels were less than the tenth of C_{max} .

Conclusion: The results show that complete bioequivalence of the two formulations can be concluded from serum total enalapril concentration data, and that

serum ACE activity is not a suitable pharmacodynamic variable for assessing bioequivalence.

Key words Bioavailability, Enalapril formulations; pharmacokinetics, ACE-activity, human

Introduction

Enalaprilat (MK422, N-[(S)-1-carboxy-3-phenylpropyl]-L-alanyl-L-proline) is a potent angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, widely used in essential and renovascular hypertension [1, 2]. It reduces the plasma levels of angiotensin II and aldosterone [3, 4, 5] and increases endogenous bradykinin concentrations [6, 7].

Enalaprilat is sold as the maleate ester (MK421, enalapril), which has enhanced gastrointestinal absorption. About 60% of a dose of enalapril is absorbed after oral administration. The compound itself is not a potent ACE inhibitor but its subsequent *in vivo* hydrolysis in the liver results in production of the active diacid form, enalaprilat, which itself is poorly absorbed [1, 8]. The peak plasma concentration of the pro-drug is generally observed about 1 h after oral administration, whereas the C_{max} of enalaprilat occurs after 2-4 h [2, 9, 10].

A significant proportion of enalaprilat (43%) is eliminated in the urine [11, 12, 13]. Elimination is biphasic, with an initial phase which reflects renal filtration (elimination half-life 2-6 h), and a subsequent prolonged phase (elimination half-life of 36 h), which represents equilibration of the drug from tissue distribution sites. The prolonged phase does not contribute to drug accumulation following repeated administration, but it is thought to be of pharmacological significance in mediating the effects of the drug [9, 10].

Various studies have shown a correlation between the plasma enalaprilat concentration and the inhibition of ACE activity [11, 12, 13], as well as the

Mastercopy

Please insert your corrections in
this copy and send this copy to
the publisher

W. Ribeiro · M. N. Muscará · H. Moreno Jr · G. B. Mendes
G. de Nucci (✉)

Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit,
Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences,
UNICAMP, P.O. Box 6111, 13084-100, Campinas, SP, Brazil

A. R. Martins
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of
Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto,
SP, Brazil

2280037B

Dispatch: 6/3 Journal: ETCP

Editor

distribution of ACE inhibition in tissues after the oral administration of enalapril [14, 15].

We have evaluated the bioequivalence of two different conventional-release pharmaceutical formulations of enalapril maleate (10 mg tablets). They were assessed by comparing the serum enalaprilat and total enalapril concentration-time curves. The correlation between the plasma concentration of enalaprilat and total enalapril and plasma ACE activity was also examined.

Subjects and methods

Subjects

Eighteen healthy male adult volunteers, aged 20 to 36 y (mean (SEM) 30 (1) years), body weight 49.7 to 96.6 kg (mean (SEM) 70 (4) kg) participated in the study. All subjects gave their written informed consent and the clinical protocol was approved by the University Hospital Ethics Committee. The volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal, haematological and psychiatric disorders, as determined by the individual history, physical examination, ECG and routine laboratory tests (blood glucose, urea, creatinine, SGOT, SGPT, alkaline phosphatase, γ -GT, cholinesterase, total bilirubin, total protein, albumin, uric acid, sodium, potassium, chloride, haemoglobin, haematocrit, total and differential white cell counts, erythrocyte sedimentation rate, and routine urinalysis). The volunteers were hospitalised at 23:00 h on the night prior to the study after eating their normal evening meal. After an overnight fast, the subject received a single oral dose of 20 mg enalapril maleate (two 10 mg tablets) as either the test or the reference formulation, in a randomised cross-over manner. The two test periods were separated by a 2 week wash-out interval. Three hours after dosing, the subjects were given 200 ml tap water, but were not given food for 6 hours after drug administration, after which time a standard lunch was available. No other food was allowed during the "in-house" period. Liquid refreshment was permitted ad libitum after lunch, but drinks containing xanthine compounds (including tea, coffee and cola) were avoided.

At each blood sampling time, systolic and diastolic arterial pressures (measured non-invasively with a sphygmomanometer) and heart rate were recorded.

Drugs and reagents

Commercially available 10 mg enalapril maleate tablets were obtained from Biosintética (Eupressin[®], lot N° 93030513; EUP) and from Merck Sharp & Dhome (Renitec[®], lot N° 92041446; REN), SP, Brazil.

Compound MK351A (the p-hydroxy-benzamidine derivative of lisinopril) and rabbit anti-lisinopril antiserum were a gift from Dr. M. Hichens, Merck, Sharp & Dhome Research Laboratories, USA.

Dibasic potassium phosphate was obtained from Merck Ind. Quim., RJ. Other reagents, including disodium EDTA, sodium azide, bovine serum albumin, dextran (MW 162,000) and charcoal, were obtained from Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA.

Blood sampling

Blood samples for serum drug quantification were taken from a suitable forearm vein before and 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18

and 24 h after dosing. On each occasion, one 10 ml sample was collected in a clean tube from an indwelling venous catheter. Blood samples were allowed to clot at room temperature and the sera were then separated by centrifugation (2,000 g, 10 min) and stored at -20°C until assayed. All samples from a given volunteer were assayed in the same run in order to avoid inter-assay variation.

Sample analysis

Serum samples were analysed for their content of enalaprilat and total enalapril (enalaprilat plus enalapril maleate) by radioimmunoassay (RIA). The method was originally developed for the determination of serum enalaprilat using ^{125}I -labelled MK351A as the tracer and a specific antibody raised against lisinopril [16]

Iodination of compound 351-A

MK351A, an active site-directed inhibitor of ACE, was iodinated by the chloramine T method [16]. Unreacted ^{125}I was eliminated by passing the iodination mixture through a Sep-Pak C_{18} cartridge. ^{125}I -MK351A was further purified by HPLC using a Bondapak C_{18} column equilibrated with 90% solvent A (100 mM Na_2HPO_4 plus 0.2% H_3PO_4) and 10% solvent B (90% aqueous acetonitrile plus 0.2% H_3PO_4) and eluted with a linear gradient (10–50% B in 60 min) at 1.0 ml/min. 0.5 ml fractions were collected. Mono- ^{125}I -MK351A (retention time 34.3 min) was well resolved from the di-iodo-compound (retention time 45 min) and from 351-A (retention time 29.8 min). Fractions containing the mono- ^{125}I -compound were pooled (total volume 4 ml) and contained a total activity of 156.5 μCi and specific activity of about 2,000 $\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$.

Radioimmunoassay

20 μl serum and standard curve samples (constructed by spiking blank serum with known amounts of enalaprilat ranging from 0.34 to 85 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) were added to 200 μl assay buffer (0.05 M dibasic potassium phosphate, 0.01 M disodium EDTA, 0.1% sodium azide and 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bovine serum albumin, pH adjusted to 7.5). ^{125}I -MK351A 100 μl diluted in assay buffer (equivalent to 16,000 cpm per tube) and 500 μl of a 1:10,000 dilution of rabbit anti-lisinopril antiserum in assay buffer. After 18 h incubation at 4°C , a dextran-charcoal suspension (2% charcoal plus 0.4% dextran in assay buffer without albumin) was added and the tubes were vortex-mixed, followed by a further incubation for 15 min on ice. All the tubes were centrifuged at 4°C (2,000 g, 20 min), and a 800 μl aliquot of the supernatant was separated for counting radioactivity in a gamma spectrometer (Beckman Gamma 5500, Beckman, USA).

The total enalapril concentration was quantified by RIA, after previous deesterification of enalapril maleate to enalaprilic acid with a crude rat liver esterase preparation. Briefly, a rat liver was homogenised in 10 volumes (w/v) cold saline and was centrifuged for 30 min at 4,800 g and 4°C . The supernatant was aliquoted and stored at -20°C . The serum samples and standard curve (constructed by spiking enalapril-free serum with known amounts of enalapril maleate from 2.1 to 512 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) were incubated with 10 μl supernatant from the rat liver homogenate (diluted 1:5 at the time of use) for 12 h at room temperature. This mixture was then assayed by RIA as described above.

Sample enalaprilat and total enalapril concentrations were calculated using the linear regression plot resulting from the logit transformation of the corrected B/B_0 values, and the log-transformed enalaprilat and total enalapril standard concentration curves, respectively.

Under these conditions, the RIA had a sensitivity of $0.1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ enalaprilat (the concentration at which corrected B/B_0 value equals 0.90). Inter and intra-assay coefficients of variation were less than 5% and 8%, respectively, for enalaprilat concentrations ranging from 1 to $200 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Serum ACE assay

Serum ACE activity was determined by measuring the amount of hippuric acid released by the enzyme from the synthetic substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine at pH 8.3 and 37°C [17]. The released hippuric acid was quantified spectrophotometrically at 383 nm after reaction with cyanuric chloride [18]. The assay sensitivity was $0.1 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. The observed inter and intra-assay coefficients of variation were 6 and 2%, respectively, for serum ACE activities ranging from 1 to $60 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$. The degree of serum ACE inhibition (as %) was calculated as $100 \times (A_t - A_0) / A_0$, where A_t represents the serum ACE activity at time t after enalapril administration, and A_0 is the serum ACE activity before enalapril administration.

Pharmacokinetic and statistical analyses

Serum enalaprilat and total enalapril concentrations were plotted as a function of time and the following pharmacokinetic parameters were obtained for each formulation from the curves: area under the concentration-time curve from 0 to 24 h ($AUC_{[0-24]}$; calculated by the trapezoidal rule), the maximum achieved concentration (C_{max}) and the time of its occurrence (t_{max}). From the terminal log-decay phase, a first order elimination constant (k_e) was estimated by linear regression and the terminal half-life value ($t_{1/2}$) was estimated using the equation $t_{1/2} = \ln 2 \cdot k_e^{-1}$.

Individual test/reference ratios (EUP/REN) for $AUC_{[0-24]}$ and C_{max} , and individual test/reference differences (EUP-REN) for t_{max} were obtained for assessment of bioequivalence. All individual $AUC_{[0-24]}$ values for enalaprilat and total enalapril represented more than 80% of the corresponding areas under the concentration-time curves when extrapolated to infinity (average 90%), which justified the employment of $AUC_{[0-24]}$ as a true index of the extent

of drug absorption. The data were analysed statistically by parametric (one-way ANOVA) and non-parametric (Wilcoxon's signed rank test [19]) tests.

Results

Enalapril was well tolerated in the administered dose, and no adverse effect was reported. No significant variation in blood pressure or heart rate as observed at any time after the administration of either of the enalapril maleate formulations when compared with the basal value.

The time-courses of the enalaprilat (Panel a) and total enalapril (Panel b) concentrations in 18 healthy male volunteers are shown in Fig. 1. The pharmacokinetic parameters of enalaprilat obtained for both the enalapril maleate tablet formulations are shown in Table 1, together with the statistical analysis for bioequivalence assessment. The 90% confidence intervals for individual $AUC_{[0-24]}$, $t_{1/2}$ and k_e ratios lay within the bioequivalence range 80–125%. The 90% confidence interval for individual C_{max} ratios was wider than the bioequivalence range of 80–125% and individual t_{max} differences were not significantly different from zero.

The complete pharmacokinetic parameters of enalapril obtained for the two enalapril maleate tablet formulations are shown in Table 2, together with the statistical analysis for bioequivalence assessment. In this case, no significant difference was observed in any of the pharmacokinetic parameters analysed. The serum ACE inhibition-time curves after both enalapril maleate formulations are shown in Fig. 2. Serum ACE activity before enalapril administration was 45.9 (2.9)

Table 1. $AUC_{[0-24]}$, C_{max} , k_e , $t_{1/2}$ and t_{max} values for enalaprilat after administration of 20 mg of each formulation to 18 healthy male volunteers (Eupressin, EUP and Renitec, REN)

Parameter	EUP	REN	EUP/REN % ratios	
			Parametric	Non-parametric ^a
$AUC_{[0-24]}$ ($\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$)				
Geom. mean	631	553	110.9	112.4
90% CI	516–771	443–691	99.6–123.6	99.8–125.0
C_{max} ($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)				
Geom. mean	80	71	112.3	114.6
90% CI	65–98	55–92	96.2–131.0	92.6–136.1
k_e (h^{-1})				
Geom. mean	0.17	0.18	–	–
90% CI	0.15–0.20	0.15–0.20	–	–
$t_{1/2}$ (h)				
Geom. mean	4.0	3.9	–	–
90% CI	3.5–4.7	3.4–4.5	–	–
t_{max} (h)				
Median	4.0	4.0	–0.1 ^b	0.0
Range	1.5–8.0	1.5–8.0	–0.7–0.6 ^c	–0.5–0.5

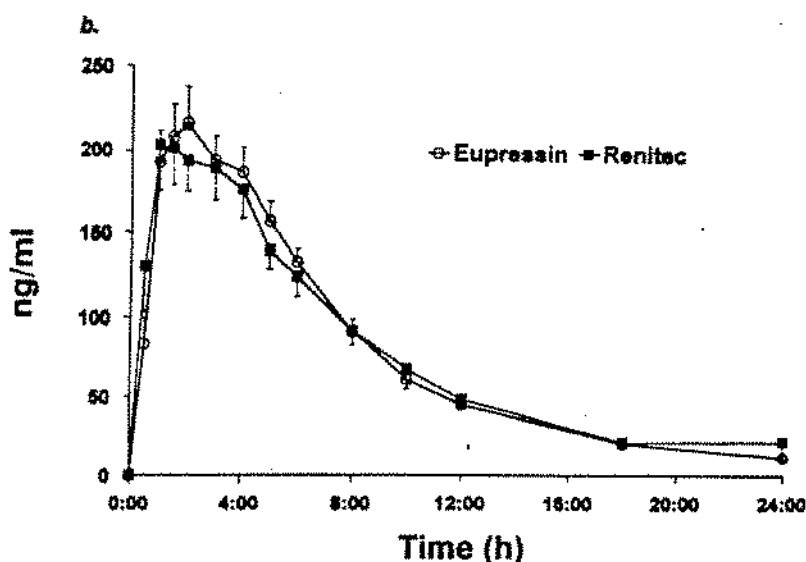
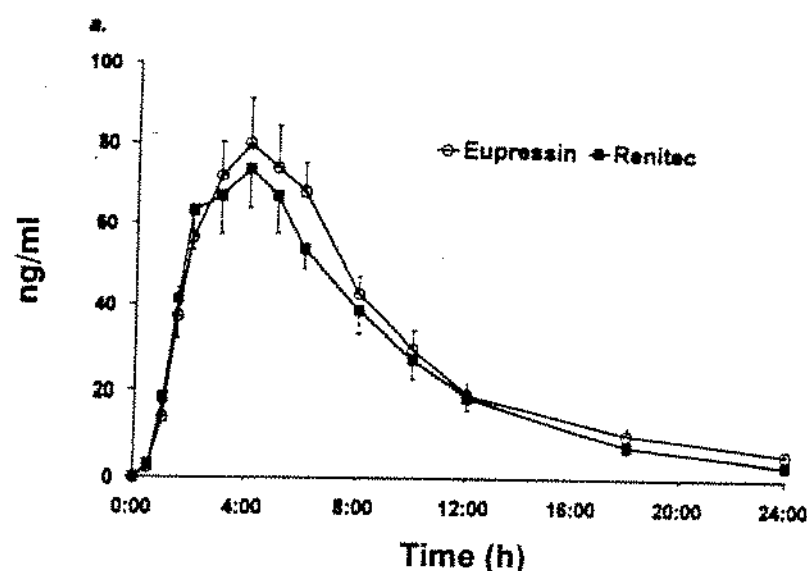
^a According to Hauschke et al. [19] and the FDA [20, 21], non-parametric results are expressed as point estimate and 90% CI of individual ratios, except for t_{max} (expressed as point estimate and 90% CI of individual differences)

^b Arithmetic mean of individual differences

^c 90% CI of individual differences

224
60
1440

Fig. 1 Serum enalaprilat (a) and total enalapril (b) concentrations (mean with SEM) versus time curves in 18 healthy male volunteers after a single dose (2×10 mg) of each enalapril maleate tablet formulation



and $44.2 (4.3) \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$ in the Eupressin and Renitec, trials, respectively. No differences were observed in the basal serum ACE values between the two periods, showing no "carry-over" effect.

The mean values of the inhibition of serum ACE activity plotted as a function of the mean serum enalaprilat concentrations are shown in Fig. 3. A single binding site Michaelis-Menten type relationship described this relation of the form $Y = Y_{\max} \times [X] / (I_{50} + [X])$, where Y is % ACE inhibition; $[X]$ is enalaprilat concentration (in $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$), I_{50} is enalaprilat concentration causing 50% ACE inhibition, and Y_{\max} is the maximum attainable ACE inhibition with respect to the basal value. The values obtained from the curve by non-linear regression were $I_{50} = 3.8 (0.2) \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ and $Y_{\max} = 94.7 (0.7)\%$ ($r: 0.997$; $P < 0.05$). The Lineweaver-Burke double reciprocal plot of the experimental values confirmed the suitability of the mathematical model (see insert in Fig. 3).

Discussion

The US Food and Drug Administration (US FDA) has stated that the bioavailability of a given pharmaceutical formulation in vivo can be determined by measurement of the active drug ingredient, therapeutic moiety or metabolites in biological fluids as a function of time, or by quantification of an appropriate acute pharmacological effect [20].

When enalaprilat concentration-time curves (Fig. 1a) were employed to assess bioequivalence, no significant difference in the extent of absorption was observed between the two formulations (assessed by inclusion of the 90% confidence interval for individual $\text{AUC}_{[0-24]}$ ratios in the bioequivalence range of 80–125%). As the 90% confidence interval for individual C_{\max} ratios was wider than the bioequivalence range, bioequivalence could not be concluded for the rate of absorption, even though individual t_{\max} differences were

Table 2. $AUC_{[0-24]}$, C_{max} , k_e , $t_{1/2}$ and t_{max} values for total enalapril after administration of 20 mg of each formulation to 18 healthy male volunteers

Parameter	EUP	REN	EUP/REN %ratios	
			Parametric	Non-parametric ^a
$AUC_{[0-24]}$ ($ng \cdot h \cdot ml^{-1}$)				
Geom. mean	1682	1736	96.9	105.2
90% CI	1501-1886	1544-1953	84.1-111.7	86.3-113.7
C_{max} ($ng \cdot ml^{-1}$)				
Geom. mean	227	242	93.8	95.9
90% CI	196-262	203-289	81.1-108.4	82.9-109.1
k_e (h^{-1})				
Geom. mean	0.16	0.16	-	-
90% CI	0.14-0.19	0.14-0.18	-	-
$t_{1/2}$ (h)				
Geom. mean	4.4	4.4	-	-
90% CI	3.7-5.1	3.9-5.0	-	-
t_{max} (h)				
Median	2.0	1.5	0.6 ^b	0.5
Range	1.0-6.0	0.5-6.0	-0.3-1.4 ^c	-0.25-1.25

^a According to Hauschke et al. [19] and the FDA [20, 21], 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

Fig. 2 Serum ACE inhibition (relative to basal activity; mean with SEM) versus time curves in 18 healthy male volunteers after a single administration (2×10 mg) of each formulation

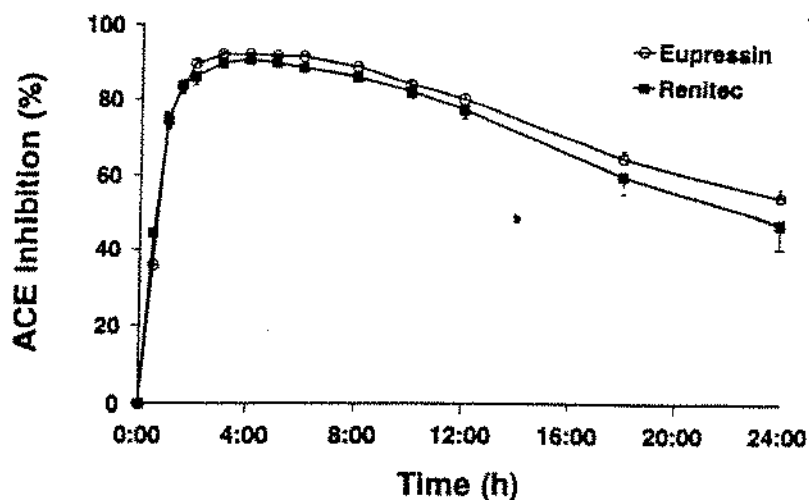
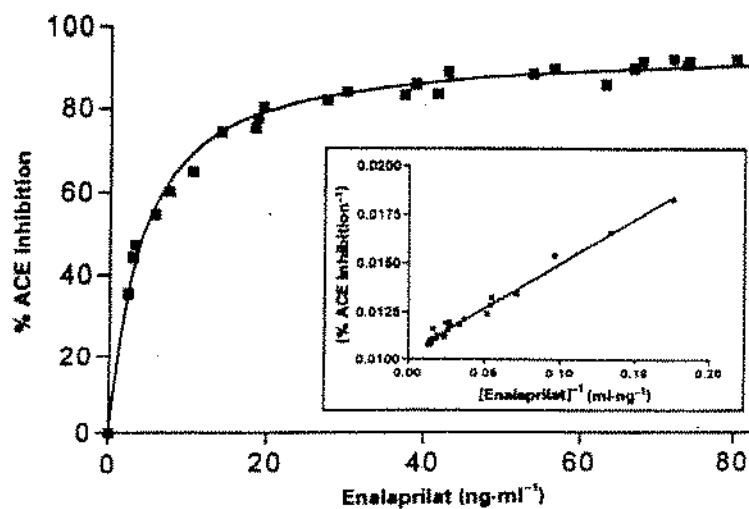


Fig. 3 Relationship between mean serum ACE inhibition (relative to basal activity) and mean serum enalaprilat concentrations in 18 healthy male volunteers after single doses (2×10 mg) of both formulations. The insert shows the Lineweaver-Burke double-reciprocal plot



not significantly different from zero (Table 1). When total enalapril concentration-time curves (Fig 1b) were employed to assess bioequivalence, no statistically significant differences were observed between the formulations in either the extent or rate of enalapril absorption (Table 2).

As shown above, these conclusions about the bioequivalence of the two formulations based either on enalaprilat or total enalapril concentrations are based on US FDA requirements [20, 21]. The conclusions reached using the AUC, C_{max} , K_e , $t_{1/2}$, and t_{max} values were identical when analysed by parametric or non-parametric tests (Table 1).

Enalapril is an orally active pro-drug, which is hydrolysed by hepatic esterases to the active moiety enalaprilat [1, 2]. As a consequence, the endogenous enzymatic activity represents an additional kinetic pathway that has an important influence on the circulating enalaprilat concentration. Both in vitro [22] and in vivo [23] differences in hepatic esterase activity towards enalapril have been reported in normal and cirrhotic humans. This could explain the inter-subject variability that led to non-inclusion of the 90% confidence interval for individual enalaprilat C_{max} ratios in the 80–125% range. For this reason, we suggest that quantification of the total drug is more appropriate for evaluating the bioequivalence of enalapril maleate formulations.

Based on the pharmacodynamic approach also accepted by the US FDA, no conclusion could be drawn from the arterial blood pressure measurements, since no significant hypotensive effect was observed at any time at the dose administered (data not shown). However, serum ACE inhibition a priori could be an appropriate acute pharmacological effect; serum ACE inhibition-time curves were similar after both formulations (Fig 2). Maximum ACE inhibition (approximately 90% with respect to basal value) was observed 3–5 h after enalapril administration and remained high for up to 24 h after dosing (approximately 50%), when circulating enalaprilat or total enalapril concentrations were 10–20 fold lower than the C_{max} values.

From the relationship observed between the degree of serum ACE inhibition and the circulating enalaprilat concentration (Fig 3), it can be concluded that ACE inhibition is proportional to the circulating enalaprilat concentration up to a few $ng \cdot ml^{-1}$. Higher enalaprilat concentrations would almost totally inhibit serum ACE activity. Thus, the measurement of serum ACE activity is not a sensitive pharmacodynamic assay for assessing enalapril bioavailability after normal therapeutic doses.

In conclusion, our assessment of the bioequivalence of two commercially available formulations of enalapril maleate has shown that the pharmacodynamic approach is inadequate for this purpose, and that the pharmacokinetic procedure based on the quantification of serum total enalapril concentrations is to be preferred. Other pro-drugs must be individually evaluated,

as the US FDA proposals for the assessment of bioavailability are general and nonspecific.

References

- Todd PA, Goal KL (1992) Enalapril: A reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in hypertension. *Drugs* 43: 346–383
- Todd PA, Heel RC (1986) Enalapril: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs* 31: 198–243
- Ferguson RK, Vlasses PH, Swanson BN, Mojaverian P, Hichens M (1982) Effects of enalapril, a new converting enzyme inhibitor, in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 32:48–53
- Sánchez RA, Marcó E, Gilbert HB, Raffaele P, Brito M, Moledo LI (1985) Natriuretic effect and changes in renal haemodynamics induced by enalapril in essential hypertension. *Drugs* 30 [Suppl 1]:49–58
- Sánchez RA, Ramírez AJ, Muscará MN, Gilbert HB, Marcó E, Moledo LI (1987) Inhibitory effects of enalapril on serum aldosterone in essential hypertension. *Medicina (Bs. As.)* 47:256–260
- Sybertz EJ, Baum T, Ahn HS, Nelson S, Eynon E (1983) Angiotensin converting enzyme inhibitor activity of SCH 31846, a new non-sulphydryl inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* 5:643–654
- Hui SCG, Dai S, Ogle CW (1984) Potentiation of depressor responses to arachidonic acid by angiotensin converting enzyme inhibitors in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 11:621–625
- Patchett AA, Harris E, Tristram EW, Wyvratt MJ, Wu MT, Taub D, Peterson ER, Ikeller TJ, Broeke J, Payne LG, Ondeyka DL, Thorsett ED, Greenlee WJ, Lohr NS, Hoffsommer RD, Joshua H, Ruyle WV, Tothrock JW, Aster SD, Maucock AL, Robinson FM, Hirschmann R, Sweet CS, Ulm EH, Gross DM, Vassil TC, Stone CA (1980) A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature* 288:280–283
- Kelly JG, O'Malley K (1990) Clinical pharmacokinetics of the newer ACE inhibitors, a review. *Clin Pharmacokinet* 19:177–196
- MacFadyen RJ, Meredith PA, Elliot HL (1993) Enalapril clinical pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships. *Clin Pharmacokinet* 25:274–282
- Donnelly R, Meredith PA, Elliot HL, Reid JL (1990) Kinetic-dynamic relations and individual responses to enalapril. *Hypertension* 15:301–309
- Weisser K, Schloos J, Lehmann K, Düsing R, Vetter H, Mutschler E (1991) Pharmacokinetics and converting enzyme inhibition after morning and evening administration of oral enalapril to healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 40:95–99
- Witte K, Weisser K, Neubeck M, Mutschler E, Lehman K, Hopf R, Lemmer B (1993) Cardiovascular effects, pharmacokinetics and converting enzyme inhibition of enalapril after morning versus evening administration. *Clin Pharmacol Ther* 54:177–186
- Dzau VJ (1988) Circulation versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77 [Suppl 1]: 11–14
- Falkenhahn M, Gohike P, Paul M, Stoll M, Unger T (1994) The renin-angiotensin system in the heart and vascular wall: new therapeutic aspects. *J Cardiovasc Pharmacol* 24:S6–S13
- Hichens M, Hand EL, Mulcahy WS (1981) Radioimmunoassay for angiotensin converting enzyme inhibitors. *Ligand* 4:43
- Cushman DW, Cheung HS (1970) Spectrophotometric assay and properties of the ACE of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20:1637–1648
- Hurst PL, Lovell-Smith CJ (1981) Optimized assay for serum ACE activity. *Clin Chem* 27:2048–2052

19. Hauschke D, Steinijans VW, Diletti E (1990) A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 28:72-78
20. Food and Drug Administration. Bioavailability and Bioequivalence Requirements. Food and Drug Administration, 4-1-1985 Edition. Federal Register, Part 320, pp 154-173
21. Food and Drug Administration (1993) In vivo bioequivalence guidances. *Pharmacopeial Forum* 19:6501-6508
22. Larmour I, Jackson B, Cubela R, Johnston CI (1985) Enalapril (MK421) activation in man: importance of liver status. *Br J Clin Pharmacol* 19:701-704
23. Ohnishi A, Tsuboi Y, Ishizaki T, Kubota K, Ohno T, Yoshida H, Kanazaki A, Tanaka T (1989) Kinetics and dynamics of enalapril in patients with liver cirrhosis. *Clin Pharmacol Ther* 45:657-665

Influence of gastric acid secretion blockade and food intake on the bioavailability of a potassium diclofenac suspension in healthy male volunteers

A. POLI², R.A. MORENO¹, W. RIBEIRO¹, H.B. DIAS¹, H. MORENO JR¹, M.N. MUSCARÁ¹ and G. DE NUCCI¹

¹Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, Brazil and ²Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Abstract. The bioavailability of a single dose of a potassium diclofenac (KDIC) suspension (Flogan, Merck, 7ml, 105 mg) was studied in 13 healthy male volunteers in the fasting state (placebo phase, PLA), after gastric acid secretion blockade (subacute pretreatment with omeprazole, OME phase) and after food intake (FOOD phase). A 14-day washout period between phases was adopted. Serum samples were obtained over a 24 hour interval and the diclofenac concentrations were determined by high pressure liquid chromatography with ultraviolet detection. From the serum diclofenac concentration vs time curves, the $AUC_{[0-\infty]}$ (area under the concentration vs time curves from 0 to infinity), C_{max} (maximum achieved concentration), t_{max} (time to achieve C_{max}), K_e (terminal first order elimination constant), half-life values ($t_{1/2}$) and $AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$ ratio as an index of diclofenac clearance, were obtained. All these variables were analyzed using both parametric and non-parametric statistics. In the presence of food, KDIC absorption was delayed (as shown by lower C_{max} and greater t_{max} values) and decreased (as shown by lower $AUC_{[0-\infty]}$ values), and the serum diclofenac concentration vs time curves showed a biphasic pattern. Omeprazole pretreatment did not change the absorption parameters. Both of these treatments altered the diclofenac clearance, as assessed by the $AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$, $t_{1/2}$ and K_e values, although the changes were not considered to be clinically significant, because of the wide therapeutic range for diclofenac. The delay in the rate of diclofenac absorption produced by food intake was not due to an increase in the gastric pH, and could be of particular importance when rapid analgesia is desired.

Key words: potassium diclofenac suspension - human volunteer pharmacokinetics - bioavailability - gastric acid blockade - omeprazole - food intake - drug interaction

Introduction

Diclofenac ([2-(2,6-dichloroanilino)phenyl]acetic acid) is a potent nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID) belonging to the phenyl acetic group, and is widely used in its sodium salt form in cases of chronic and acute inflammation [Altman 1986, Calabro 1986, Kantor 1986, Zuckner 1986]. The potassium salt of diclofenac (KDIC) has been marketed mainly in Latin America and has been prescribed for acute conditions to provide fast analgesic and antiinflammatory effects [Bahamonde and Saavedra 1990, Verstraeten and Bakshi 1991].

The main problem associated with NSAID therapy is the ability of these drugs to induce gastrointestinal injury, most notably gastric ulceration, bleeding and perforation, as well as an increased risk of bleeding from preexisting peptic ulcers [Soll et al. 1991]. In an attempt to reduce NSAID-induced mucosal lesions and ulcer formation or exacerbation, several clinical practices have been adopted including the oral administration of the drug at mealtimes, the use of special preparations such as enteric-coated tablets or the concomitant administration of antacids [Brzozowski et al. 1993], histamine H_2 receptor antagonists [Van Berge Henegouwen and Smout 1991], prostanoids [Miller 1992] or proton-pump inhibitors [Scheiman et al. 1994].

Drugs dissolved in biological fluids exist as predominantly weak ionizable species and are absorbed across the plasma membrane in their nonpolar or unionized forms. The ionized forms cannot cross the membrane due to the hydrophobic nature of the latter. Consequently, the pH of the microenvironment is critical in determining movement across the membrane [Wilson et al. 1989].

Received March 9, 1995; accepted in revised form October 24, 1995.

Correspondence to Dr. Gilberto de Nucci, Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, PO Box 6111, 13084-100 Campinas, SP, Brazil.

The major physiological stimulus for acid secretion in the stomach is the ingestion of food, especially if the meal has a high protein content which possesses the greatest buffering capacity. The buffering action of food usually produces a temporary increase in gastric pH [Wilson et al. 1989]. Furthermore, the presence of food may influence the absorption of several drugs and can either enhance, delay or reduce their uptake thereby changing their bioavailabilities [Toothaker and Welling 1980].

Omeprazole is a proton-pump inhibitor and a potent blocker of basal gastric acid secretion, thus increasing the gastric pH. This drug therefore represents a therapeutic option for the treatment of certain peptic acid disorders [Lampkin et al. 1990].

Since KDIC can be clinically co-administered with the proton-pump inhibitor omeprazole and/or with food intake, pharmacokinetic interactions which could affect the bioavailability of diclofenac may occur.

In this study, we have compared the pharmacokinetics of a KDIC suspension in healthy male volunteers in the fasting state (placebo phase, PLA), after gastric acid secretion blockade (attained by subacute pretreatment of the volunteers with omeprazole, OME phase) and after food intake (FOOD phase).

Subjects, material and methods

Clinical protocol

Thirteen healthy male volunteers aged between 21 and 47 years (mean \pm SEM: 29.4 \pm 6.3 yr) and weighing 55 to 95 kg (mean \pm SEM: 77.5 \pm 10.1 kg) were selected for the study. The volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, gastrointestinal, neurological and hematological diseases as determined within 4 weeks before the start of the study, by medical history, physical examination and laboratory screenings: for fasting blood glucose, urea, creatinine, AST, ALT, total bilirubin, total protein, serum albumin, alkaline phosphatase, sodium, potassium, chloride, uric acid, urinalysis, hemoglobin, hematocrit, total and differential white blood cell counts. All the volunteers gave their written informed consent to participate in the study, and the clinical protocol was approved by the Ethics Committee of the university hospital.

The study had a 3-stage design with a 14-day washout period between treatments. During each stage, the volunteers were hospitalized at 09:00 p.m. having already had a regular evening meal. After an overnight fast they received 105 mg of KDIC as a suspension (Flogan).

Gastric acid secretion blockade was achieved by administering omeprazole (Losec, 20 mg/day, p.o. as a single dose, for 5 days prior to hospitalization). Placebo was administered in the same manner as described for omeprazole. The efficacy of the treatment was assessed by measuring the pH of the gastric juice (collected via an intragas-

tric cannula) before the first administration of either placebo or Losec and then before KDIC administration. This part of the study (administration of placebo and Losec) was carried out in a double-blind manner.

The influence of food intake on the pharmacokinetics of KDIC was assessed by comparing the pharmacokinetic profile after a standard breakfast with the placebo profile. The standard breakfast was composed of one sandwich consisting of 2 slices of bread (~40 g) and 2 slices of cheese (~30g), 1 cup of whole milk (~250ml), and 2 pieces of papaya (~250g).

Blood samples were collected at 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 and 24 hours after KDIC administration, and the serum diclofenac concentrations were determined by reversed-phase HPLC with ultraviolet detection as previously described [Mendes et al. 1994].

Pharmacokinetic and statistical analysis

The maximum observed serum concentration (C_{max}) and the time required for this to be reached (t_{max}) were obtained from the drug concentration vs time curves. The terminal elimination rate constant (K_e) was estimated by the least square regression of the points describing a terminal log-linear decay phase. The half-life values ($t_{1/2}$) were derived from K_e where $t_{1/2} = \ln 2/K_e$. The areas under the diclofenac concentration vs time curves from 0 to 24 h ($AUC_{[0-24]}$) were calculated using the trapezoidal method, and from 0 to infinity ($AUC_{[0-\infty]}$) were calculated using the trapezoidal method up to the time at which the serum diclofenac concentration was above the detection limit of the method (10 ng/ml), and posterior addition of the value C/K_e (C: last detectable diclofenac concentration). An estimate of diclofenac clearance was made using the method of Schall et al. [1994], and consisted of the calculation of the ratio $AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$.

The obtained pharmacokinetic parameters were expressed as geometric means with their respective 90% confidence intervals, except for t_{max} for which the arithmetic mean was determined. Individual ratios were statistically analyzed using both parametric (one-way ANOVA for ln-transformed data) and non-parametric methods [Hauschke et al. 1990], with the exception of t_{max} , where individual non-transformed differences were analyzed.

The assessment of bioequivalence as defined by Steijns et al. [1991] was also used to determine whether a pharmacokinetic interaction had taken place. The bioequivalence range for the individual ratios of the ln-transformed variables was defined as 0.8 – 1.25.

Pharmaceuticals

The commercial KDIC suspension Flogan (7 ml equivalent to 105 mg KDIC) is marketed by Merck S.A. Ind. Quím., RJ, Brazil, and omeprazole (Losec, 20 mg tablet) by Merrel Lepetit Farm. Ind. Ltda., SP, Brazil.

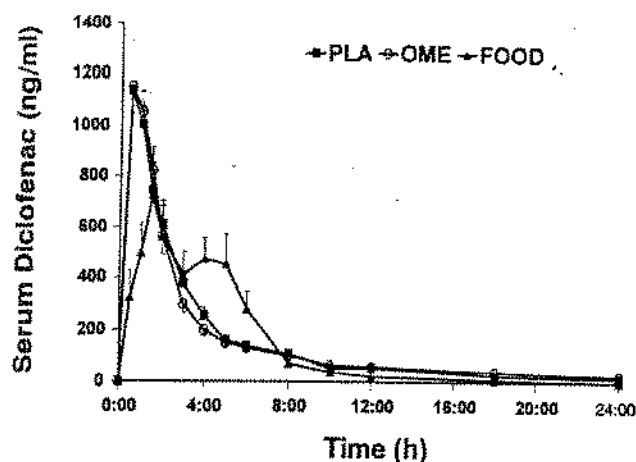


Fig. 1 Serum diclofenac concentration (mean \pm SEM) versus time curves obtained in 13 healthy male volunteers following a single administration of 105 mg KDIC (7 ml of Flogan suspension) after placebo (PLA), gastric acid secretion blockade (OME) and food intake (FOOD)

Results

Diclofenac and omeprazole were well-tolerated at the administered doses and no adverse effects were reported. After omeprazole treatment, the gastric juice pH was significantly increased from 1.67 ± 0.11 (PLA phase) to 6.90 ± 0.13 ($p < 0.01$, $n = 13$; Student's paired t-test).

Figure 1 shows the mean serum diclofenac concentration vs time curves for the PLA, OME and FOOD phases. The major mean pharmacokinetic parameters derived from the serum diclofenac concentration vs time curves are presented in Table 1.

Parametric and non-parametric analysis of individual $AUC_{[0-\infty]}$, C_{max} percentual ratios and t_{max} differences between OME and PLA phases did not show any statistically significant differences, as shown by their inclusion in the 80 – 125% interval (Table 2). However, the diclofenac clearance index $AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$, as well as K_e and $t_{1/2}$ were altered by the subacute treatment with omeprazole (Table 2a).

FOOD treatment altered the diclofenac pharmacokinetics, as shown by the non-inclusion of the individual $AUC_{[0-\infty]}$, C_{max} , $AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$, K_e and $t_{1/2}$ percentual ratios from the 80 – 125% interval, and the individual t_{max} differences (Table 2b).

Discussion

Omeprazole, like diclofenac, is biotransformed in the organism [Stierlin et al. 1979, Gugler and Jensen 1985]. Apart from its inhibitory activity on proton-pump and gastric acid secretion [Lampkin et al. 1990, Scheiman et al.

Table 1 Mean KDIC pharmacokinetic parameters obtained in 13 healthy male volunteers after the ingestion of 105 mg KDIC (7 ml of Flogan suspension) under different conditions. PLA, placebo; OME, omeprazole; FOOD, food intake; CI, confidence interval

Parameter	PLA	OME	FOOD
$AUC_{[0-24]}$ (ng h ml ⁻¹)			
Geom. mean	3,459	3,564	3,114
90% CI	2,987 – 4,005	3,186 – 3,986	2,617–3,706
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng h ml ⁻¹)			
Geom. mean	3,502	3,644	3,114
90% CI	3,007 – 4,078	3,246 – 4,092	2,617–3,707
$AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$			
Geom. mean	1,897	1,643	2,023
90% CI	1,578 – 2,282	1,331 – 2,029	1,528 – 2,678
C_{max} (ng/ml)			
Geom. mean	1,330	1,276	1,052
90% CI	1,084 – 1,631	1,136 – 1,435	827–1,338
K_e (h ⁻¹)			
Geom. mean	0.37	0.32	0.45
90% CI	0.29 – 0.47	0.26 – 0.39	0.37 – 0.55
$t_{1/2}$ (h)			
Geom. mean	1.95	2.21	1.54
90% CI	1.55 – 2.47	1.80 – 2.71	1.26 – 1.88
t_{max} (h)			
Median	– 0.5	0.5	3.0
Range	0.5 – 4.0	0.5 – 1.0	0.5 – 5.0

1994], omeprazole may also alter drug pharmacokinetics since it inhibits hepatic microsomal enzyme activity [Rogerson et al. 1977]. Omeprazole prevents the metabolism of diazepam and phenytoin by inhibiting this enzyme system [Gugler and Jensen 1985] and this effect could account for the decrease observed in diclofenac clearance, and the consequent increase in $t_{1/2}$ (Table 2a).

Another mechanism by which omeprazole affects drug pharmacokinetics is by altering drug absorption. For instance, omeprazole increases the absorption of bismuth from tripotassium dicitrate bismuthate [Treiber et al. 1994]. Diclofenac is a weak acid ($pK_a = 4.0$) and very liposoluble (partition coefficient n-octanol/buffer, pH 7.4 = 13.4), and could be well absorbed in the low pH of the stomach. Although omeprazole significantly increased the gastric pH (from 1.67 to 6.90), it did not affect the diclofenac $AUC_{[0-\infty]}$, C_{max} and t_{max} , indicating that gastric pH does not alter diclofenac absorption.

The administration of the KDIC suspension in the presence of food delayed the rate of diclofenac absorption (as shown by the greater t_{max} values). Thus, KDIC should not be administered with food when rapid analgesia is desired. Food administration also reduced the absorption of diclofenac (as shown by the lower C_{max} and $AUC_{[0-\infty]}$ values) and changed the absorption pattern. However, because of the wide therapeutic range for diclofenac, the latter finding probably has little or no clinical relevance. Al-

Table 2a Statistical analysis of the intergroup $AUC_{[0-\infty]}$, $AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$, C_{max} , K_e and $t_{1/2}$ individual ratios and t_{max} individual differences for KDIC, PLA, placebo; OME, omeprazole; FOOD, food intake. CI, confidence interval. (*) According to Hauschke et al. [1990]. (**) Arithmetic mean

OME/PLA	Parametric		Non-Parametric*	
	Geom. mean	90% CI	Point estimate	90% CI
$AUC_{[0-\infty]}$				
% Ratio	104.1	90.5 – 119.7	103.3	89.4 – 122.7
$AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$				
% Ratio	86.6	68.4 – 109.7	85.9	67.8 – 109.2
C_{max}				
% Ratio	96.0	80.2 – 115.0	96.8	78.1 – 115.8
K_e				
% Ratio	85.4	67.9 – 107.4	86.6	67.2 – 112.1
$t_{1/2}$				
% Ratio	113.5	79.8 – 161.3	99.5	76.3 – 164.6
t_{max}				
Difference (h)	-0.42**	-0.93 – -0.08	-0.25	-0.5 – 0.0

Table 2b

FOOD/PLA	Parametric		Non-Parametric*	
	Geom. mean	90% CI	Point estimate	90% CI
$AUC_{[0-\infty]}$				
% Ratio	88.9	75.6 – 104.6	88.5	74.9 – 106.7
$AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$				
% Ratio	106.6	76.3 – 149.0	107.8	76.9 – 148.3
C_{max}				
% Ratio	79.1	56.7 – 110.4	80.4	54.3 – 111.0
K_e				
% Ratio	120.1	88.2 – 163.6	120.1	87.2 – 165.1
$t_{1/2}$				
% Ratio	78.8	57.2 – 108.6	75.1	56.1 – 100.5
t_{max}				
Difference (h)	1.8**	0.8 – 2.8	1.8	0.8 – 2.5

though food in the stomach elevates gastric pH, other factors such as the viscosity of the stomach contents, gastric emptying rate and the volume of gastric secretions [Wilson et al. 1989] may also explain this observation.

The diclofenac clearance was decreased 13.4% by omeprazole and increased 6.6% by food intake. These changes were statistically significant since the 90% CI for individual $AUC_{[0-\infty]}/t_{1/2}$ percentual ratios were not included in the 80 – 125% range (Steinijans et al. 1991). Since an important overlap with the equivalence range was detected, these changes may reflect intersubject variation rather than true pharmacokinetic interaction. In any case, we feel they are too discrete to be of potential clinical significance.

REFERENCES

- Altman R 1986 International experience with diclofenac in osteoarthritis. *Am J Med 80 (Suppl 4B):* 48-52
- Bahamonde BLA, Saavedra CH 1990 Comparison of the analgesic and antiinflammatory effects of diclofenac potassium versus piroxicam versus placebo in ankle sprain patients. *J Int Med Res 18:* 104-111
- Brzozowski T, Konturek SJ, Majka J, Drowdzowicz D, Pytko-Polonczyk J, Nawert C 1993 Supralox: a novel aluminium containing antacid with gastroprotective and ulcer healing activity. *Eur J Gastroenterol Hepatol 5:* 165-171
- Calabro JJ 1986 Efficacy of diclofenac in ankylosing spondylitis. *Am J Med 80 (Suppl 4B):* 58-63
- Gugler R, Jensen JC 1985 Omeprazole inhibits oxidative drug metabolism. Studies with diazepam and phenytoin in vivo and 7-ethoxycoumarin in vitro. *Gastroenterology 89:* 1235-1241
- Hauschke D, Steinijans VW, Diletti E 1990 A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 28:* 72-78
- Kantor TG 1986 Use of diclofenac in analgesia. *Am J Med 80 (Suppl 4B):* 64-69
- Lampkin TA, Ouillet D, Hak LJ, Dukas GE 1990 Omeprazole: a novel antisecretory agent for the treatment of acid-peptic disorders. *DICP, Ann Pharmacother 24:* 393-402
- Mendes GBB, Franco LM, Moreno RA, Fernandes AG, Muscardá MN, de Nucci G 1994 Comparative bioavailability of two suspension formulations of potassium diclofenac in healthy male volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther 26:* 399-405
- Miller DR 1992 Treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy. *Clin Pharm 11:* 690-704
- Rogerson TD, Wilkinson CF, Hetarski K 1977 Steric factors in the inhibitory interaction of imidazoles with microsomal enzymes. *Biochem Pharmacol 26:* 1039-1042
- Schall R, Hundt HKL, Laus HG 1994 Pharmacokinetic characteristics for extent of absorption and clearance in drug/drug interaction studies. *Int J Clin Pharmacol Ther 32:* 633-637
- Scheiman JM, Behler EM, Loeffler KM, Elta GH 1994 Omeprazole ameliorates aspirin-induced gastroduodenal injury. *Dig Dis Sci 39:* 97-103
- Soll AH, Weinstein WM, Kurata J, McCarthy D 1991 Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulcer disease. *Ann Intern Med 114:* 307-319
- Steinijans VW, Hartmann M, Huber R, Radke HW 1991 Lack of pharmacokinetic interaction as an equivalence problem. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 29:* 323-328
- Stierlin H, Faigle JW, Sallman A, Küng W, Richter WJ, Kriemler H-P, Alt KO, Winkler T 1979 Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and in man. I. Isolation and identification of principal metabolites. *Xenobiotica 9:* 601-610
- Toothaker RD, Welling PG 1980 The effect of food on drug bioavailability. *Ann Rev Pharmacol Toxicol 20:* 173-199
- Treiber G, Walker S, Klotz U 1994 Omeprazole-induced increase in the absorption of bismuth from tripotassium dicitrate bismuthate. *Clin Pharmacol Ther 55:* 486-491
- Van Berge Henegouwen GP, Smout AJPM 1991 The management of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal ulcers. *Scand J Gastroenterol 26 (Suppl 188):* 87-91
- Verstraeten A, Bakshi R 1991 Diclofenac potassium for the treatment of traumatic joint distortion: an open multicentre study. *J Int Med Res 19:* 165-170
- Wilson CG, Washington C, Washington N 1989 Overview of epithelial barriers and drug transport. In: Wilson CG, Washington N (eds) *Physiological Pharmaceutics. Biological barriers to drug absorption*. Chichester, Ellis Horwood Limited, pp 17-68
- Zuckner J 1986 International experience of diclofenac in rheumatoid arthritis. *Am J Med 80 (Suppl 4B):* 39-42