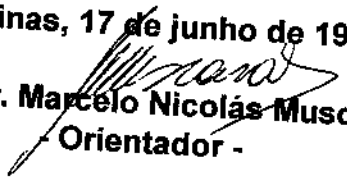


Maria Lúcia Martins

**“ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS
FORMULAÇÕES DE COMPRIMIDOS DE
ATENOLOL EM VOLUNTÁRIOS SADIOS”**

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso
de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia da
Farmacêutica Maria Lúcia Martins.

Campinas, 17 de junho de 1997


Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará
Orientador -

Campinas

1997

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	7/UNICAMP
	M366c
V.	Ex.
TOMBO B.	31.290
PROG.	281.197
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/03/97
N.º CPD	

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

CM-00099521-3

M366c Martins, Maria Lúcia
 "Estudo de bioequivalência de duas formulações de comprimidos de
 atenol em voluntários sadios" / Maria Lúcia Martins. Campinas, SP :
 [s.n.], 1997.

Orientador : Marcelo Nicolás Muscará
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

I. Medicamentos. 2. Medicamentos - biodisponibilidade. I.
 Marcelo Nicolás Muscará. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Maria Lúcia Martins

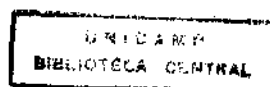
**“ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS
FORMULAÇÕES DE COMPRIMIDOS DE
ATENOLOL EM VOLUNTÁRIOS SADIOS”**

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

Orientador: **Marcelo Nicolás Muscará**

Campinas

1997





UNICAMP

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador

PROF. DR. MARCELO NICOLÁS MUSCARÁ

Membros:

1. PROF. DR. MARCELO NICOLÁS MUSCARÁ

2. PROFA. DRA. MARIA ELISABETE AMARAL DE MORAES

3. PROF. DR. LUIZ ALBERTO MAGNA

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

Data: 17/06/97

A João Guilherme e Gersulina,
meus pais.

A todos os que lutam e persistem,
nas mais variadas trincheiras.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela minha vida.

A meus pais, pelo incentivo, amor e paciência.

Ao Prof Dr. Gilberto de Nucci, pela oportunidade e confiança.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará, pela orientação na realização deste trabalho e principalmente pela amizade.

Ao José Claudio, meu irmão; à Cassia, minha cunhada, ao Bruno, Marcelo e Ana Claudia, meus sobrinhos pela paciência e carinho durante todo o mestrado.

Aos amigos Simone (Soprinho), Anicleto Poli (Nic), Pamela (Pisco), Marcos (Rosquinha), Evandro, Heidi, Paula, e Claudia (Sinval) pelo companheirismo e constante estímulo.

Aos demais amigos do departamento, Sérgio, Wellington, Leonardo, Flávia, Claudomiro, Marli, Helô, Renata Pereira, Renata Zanardo, Sisi, Martinha, Luciana Nathan, Luciana Bizeto, Yoko e André pela amizade.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade Ciências Médicas da UNICAMP, principalmente às secretárias Maria das Dores Ponciano, Solange, Rita e Gislaíne.

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	<i>Pág</i> <i>i</i>
Capítulo I - Introdução Geral	1
Conceitos.....	3
Parâmetros para determinar bioequivalência.....	6
Capítulo II - Estudo de Bioequivalência de duas formulações comprimidos de atenolol em voluntários sadios	7
Introdução	8
Objetivos	15
Materiais e métodos	16
Resultados	22
Discussão	28
Summary	33
Referências Bibliográficas	34
Bibliografia Consultada.....	44
Anexos	45
Anexo I.....	45
Anexo II.....	64

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1. Estrutura química do atenolol e metoprolol (padrão interno).....	10
Figura 2. Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca em função do tempo obtido após a administração oral de 50 mg de atenolol em 18 voluntários sadios.....	23
Figura 3. Cromatograma típico obtido após injeção de 50 µl da amostra de: painel: (a): Plasma branco (b): amostra de plasma de voluntário coletada 6 h depois da administração de 50 mg de atenolol.....	24
Figura 4. Média das concentrações plasmáticas (média $\pm$ DP) de atenolol em função do tempo para as duas formulações de atenolol (50mg) administradas em 18 voluntários sadios.....	25

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
Tabela 1. Tabela de randomização.....	17
Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos de atenolol obtidos após a administração de cada uma das formulações de atenolol 50 mg nos 18 voluntários masculinos saudáveis.....	26
Tabela 3. Análise estatística das razões individuais teste / referência de $AUC_{(0-24)}$, AUC , C_{max} , k_e , $t_{1/2}$, e C_{max}/AUC , e das diferenças teste - referência de t_{max} entre ambas formulações de atenolol.....	27

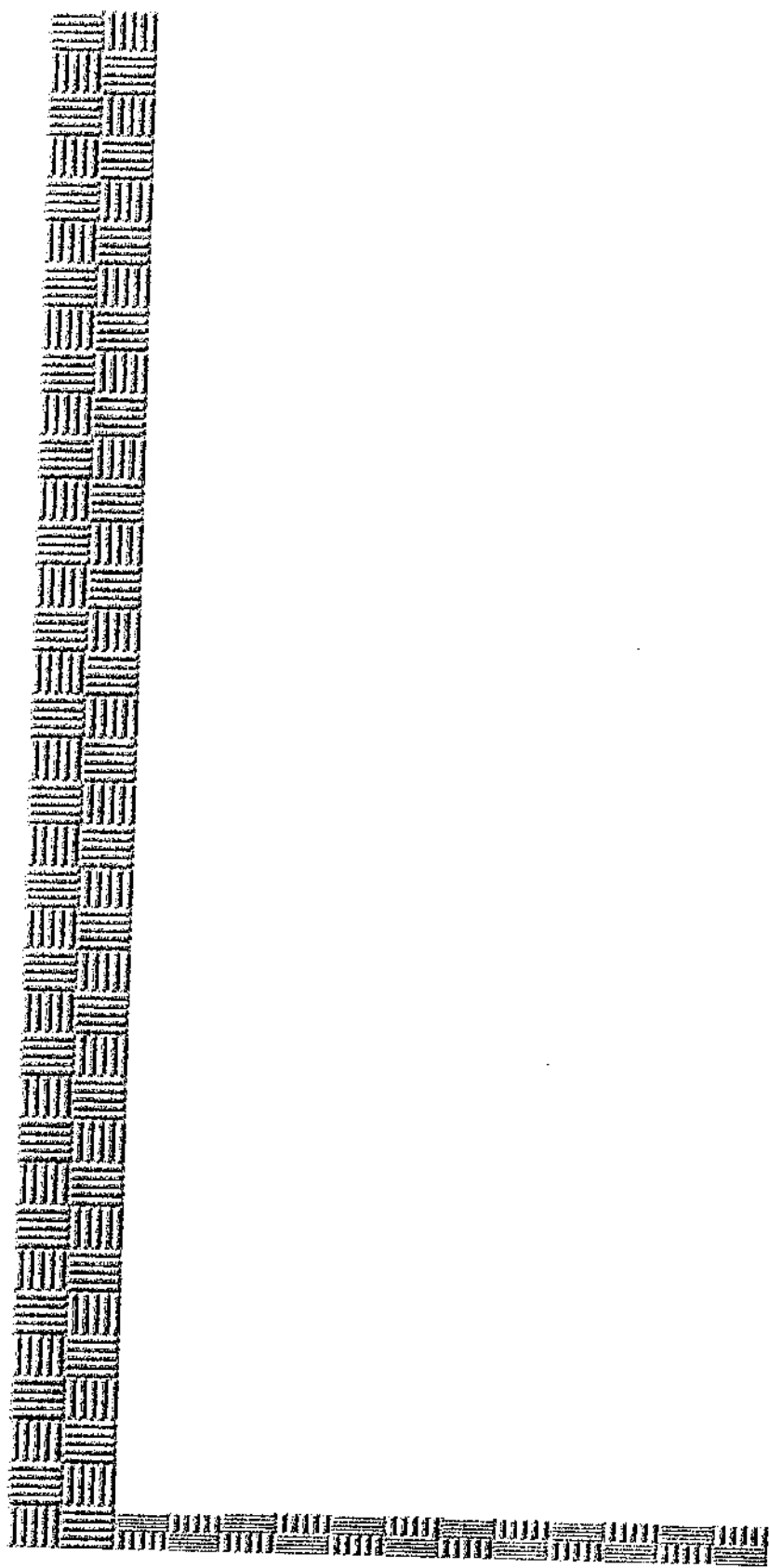
LISTA DE ABREVIATURAS

- AUC** - Área sob a curva da concentração em função do tempo.
- $t_{\max}$** - Tempo da concentração plasmática máxima atingida.
- $C_{\max}$** - Concentração máxima atingida.
- $T_{1/2}$** - Tempo de meia vida da droga.
- K_e** - Constante de eliminação.
- HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência.
- ANOVA** - Análise de variância.
- EDTA** - Ácido etilendinitrilotetracético.
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$** - Fosfato monossódico 1-hidrato.
- HCl** - Ácido clorídrico.
- SDS** - Dodecil sulfato de sódio.
- EU** - União Européia
- FDA** - Food and Drug Administration.



*“Todo meu saber consiste em
saber que nada sei”*

(SÓCRATES)



Resumo

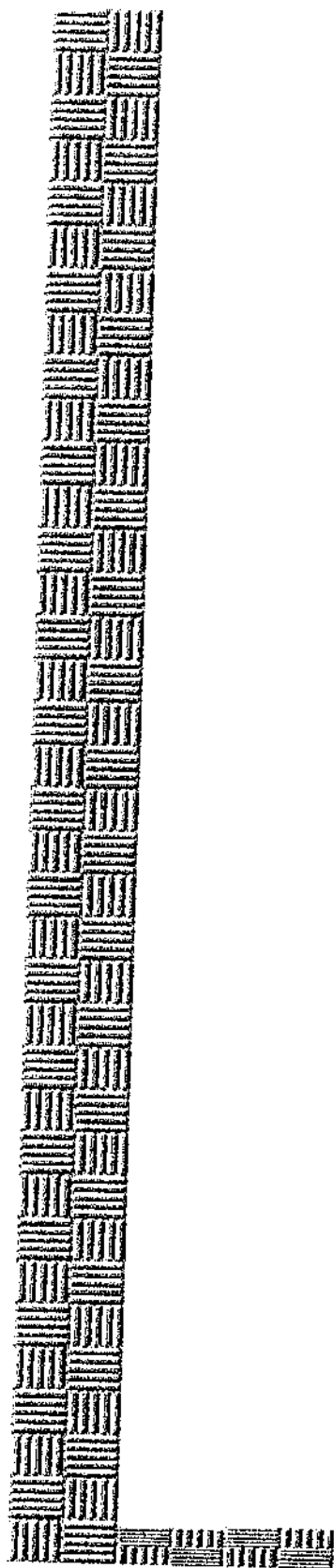
Neste trabalho foram comparadas as biodisponibilidades de duas formulações de comprimidos de atenolol: Atenol, comprimidos 50 mg, (Laboratório Wellcome ICI; formulação de referência) *versus* Angipress, comprimidos 50 mg (Laboratório Biosintética; formulação teste), em dezoito voluntários sadios do sexo masculino.

O protocolo clínico constava de dois períodos randômicos, com intervalo de quatorze dias entre as doses, aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Os voluntários, após uma triagem, foram hospitalizados às 23 horas ao dia anterior do estudo clínico sob jejum e, às 7 horas do dia seguinte, iniciou-se o ensaio clínico. Os voluntários receberam uma única dose de atenolol de cada formulação. As amostras de sangue foram obtidas imediatamente antes e a intervalos regulares, até 24 horas após a administração da droga.

A concentração plasmática de atenolol foi determinada por HPLC com detecção fluorimétrica. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos de cada formulação de atenolol foram: área sobre a curva da concentração plasmática em função do tempo de 0 até 24 h ($AUC_{[0-24]}$), concentração máxima alcançada (C_{max}) e o tempo empregado para ser alcançada (t_{max}), meia vida de eliminação ($t_{1/2}$), constante de eliminação terminal de primeira ordem (k_e) e a área sobre a curva extrapolada ao infinito ($AUC_{[0-\infty]}$). Todos os parâmetros farmacocinéticos foram analisados por métodos estatísticos paramétricos e não-paramétricos. As duas formulações de comprimidos de atenolol não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em biodisponibilidade.

Com base nos resultados obtidos e de acordo com os requerimentos estipulados pela EU e a FDA (EUA) as duas formulações foram consideradas bioequivalentes, com referência tanto à velocidade quanto ao grau de absorção.



CAPÍTULO I

Introdução geral

As drogas há muitos anos, têm sido a forma mais usada de intervenção terapêutica, disponível aos médicos. A fé nos produtos naturais, principalmente de plantas, predominou até meados de 1920. O avanço da química orgânica sintética tornou possível a síntese de moléculas antes naturais e a moderna indústria farmacêutica começou a se desenvolver. Os produtos naturais são até importantes no campo da farmacologia terapêutica, notavelmente na quimioterapia, mas as novas químicas sintéticas são, agora, as origens de novas drogas.

A maioria das drogas hoje, são fabricadas e comercializadas por mais de uma indústria farmacêutica. O estudo de biofarmácia evidenciou bem que o método de produção empregado e a formulação final da droga pode afetar a sua biodisponibilidade. Por causa da plethora de drogas contendo a mesma quantidade de ingrediente ativo, médicos, farmacêuticos e outros devem selecionar produtos que tenham efeito terapêutico equivalente.

Então, o estudo comparativo de biodisponibilidade de dois ou mais produtos de drogas (biocquivalência) vem facilitar a escolha de uma forma farmacêutica, além de cooperar para a melhor assistência farmacêutica ao paciente, principalmente em casos de drogas desenvolvidas para o tratamento de doenças mais sérias, como por exemplo antiarrítmicos, anti-hipertensivos, antiepiléticos, antidiabéticos, etc. A escolha da forma farmacêutica deve obedecer a um critério: assegurar ao medicamento o máximo de ação com o mínimo de inconvenientes, atentando às funções normais, a fim de que o medicamento não as prejudique. "*Primum non nocere*" que é o mais importante dos aforismas de Hipócrates.

CONCEITOS

Bioequivalência: Equivalentes farmacêuticos são considerados bioequivalentes quando apresentam biodisponibilidade similar, isto é, não são significativamente diferentes quanto a velocidade e extensão de absorção, quando dados na mesma dose molar e estudados nas condições experimentais similares, seja em dose única ou em doses múltiplas.

Equivalentes farmacêuticos são formas farmacêuticas que contêm quantidades idênticas do mesmo princípio ativo, por exemplo: o mesmo sal ou éster da mesma espécie terapêutica, em idênticas formas farmacêuticas, mas não necessariamente contendo os mesmos ingredientes inativos (excipiente). Apresentam também requisitos iguais na farmacopéia, quanto à identidade, potência, qualidade e pureza, uniformidade de conteúdo e velocidade de desintegração e (ou) dissolução.

Biodisponibilidade é a velocidade e extensão pela qual a substância ativa ou a molécula terapêutica de uma droga é absorvida a partir de uma forma farmacêutica e torna disponível no sítio de ação.

A biodisponibilidade dos produtos farmacêuticos pode ser muito variável. O problema consiste em determinar a variação na velocidade de absorção dos produtos que pode ter uma consequência terapêutica, devido a produção de sintomas tóxicos ou a redução do efeito terapêutico, a exemplo do ocorrido com o cloranfenicol, fenitoína e digoxina, na década de 60.

A liberação de um fármaco, a partir de uma forma farmacêutica, pode influenciar a velocidade e magnitude da absorção. A desintegração da forma de dosagem e a dissolução possuem um papel relevante na absorção do fármaco, pois, a maior parte deles são absorvidos por difusão passiva. Os testes de dissolução *in vitro* devem ter uma correlação com os testes de dissolução *in vivo*, no trato gastrointestinal, para muitas determinações de bioequivalência e biodisponibilidade clínica, obtendo com isso, uma redução nos custos e tempo gasto no desenvolvimento de droga.

A biodisponibilidade de um fármaco pode ser influenciada por alguns fatores, tais como:

Fatores Fisiológicos

As razões pelas quais as pessoas diferem em suas respostas à droga são várias e incluem: causas genéticas, doenças, idade, fluxo urinário e sanguíneo e uma variedade de fatores de caráter ambiental.

O tempo de esvaziamento gástrico tem grande influência na absorção de um fármaco, principalmente naquele que é absorvido em sítio específico do trato gastrointestinal. No caso de fármacos que são absorvidos através do epitélio gástrico, a absorção é bastante favorecida pela sua maior permanência no estômago. Por isso, o uso racional de voluntários em jejum em investigações clínicas tem sido para diminuir a variabilidade na absorção de droga, [WILSON & WASHINGTON, 1989]. A velocidade de esvaziamento estomacal pode ser influenciado por estados de nervosismo, hiperacidez, ação de outro fármaco e alimentação

A presença de alimento deve influenciar a absorção de várias drogas e pode tanto aumentar, retardar ou diminuir. A penicilina V e G, teofilina e a eritromicina têm sua absorção reduzida pela presença de alimento, mas esta presença retarda a absorção de certas drogas como a digoxina, cimetidina e metronidazol [TOOTHAKER & WELLING, 1980], alimentos com alta concentração de metais polivalentes, bem como, cálcio, magnésio, alumínio e zinco inibem a absorção da tetraciclina, [WILSON & WASHINGTON, 1989].

Os líquidos digestivos secretados pela ingestão de alimento pode alterar a absorção de droga. O aumento da secreção da bile, influenciada pela ingestão de alimento, com seus componentes tensoativos e solubilizantes pode acelerar a dissolução e absorção de fármacos lipossolúveis.

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

hepático. A fração do fármaco intacta que chega na circulação sistêmica pode ser baixa ou quase nula, como o que ocorre com o propranolol [DAY *et al.*, 1979].

Fatores Farmacotécnicos

Estes são os mais importantes tais como: formulação farmacêutica, via de administração da droga, drogas administradas concomitantemente por que podem afetar profundamente a biodisponibilidade dos fármacos numa forma farmacêutica. A natureza do sal ou composto usado, sua velocidade de dissolução *in vivo*, tamanho das partículas e seu estado físico, propriedades hidrófilas ou lipófilas de princípio ativo, presença de agentes complexantes, competição molecular pela absorção, nas associações terapêuticas exercem grande influência na velocidade de dissolução dos fármacos no trato gastrointestinal. Existe uma relação direta entre a biodisponibilidade e a velocidade de dissolução. A forma farmacêutica que libera rapidamente seu fármaco, à medida que ocorre a dissolução, tende a uma melhor absorção do que aqueles em que a liberação ocorre mais lentamente e de maneira incompleta. A adição de certos adjuvantes influi também na velocidade de absorção, o que é importante para a escolha de associações medicamentosas.

Transgressão terapêutica

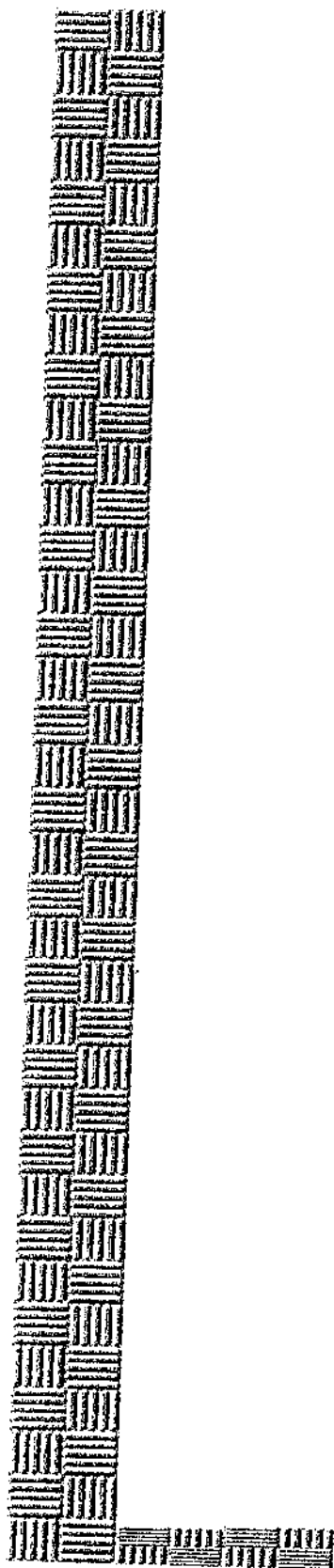
As medicações prescritas nem sempre são tomadas de modo correto pelo paciente. O fato é que boa parte dos pacientes não seguem de modo adequado as instruções de como tomar seus medicamentos. Esta transgressão terapêutica pode interferir na biodisponibilidade do fármaco, habitualmente representada por dosagem errada, engano nos intervalos de tempo ou sequência de medicamentos. Em pessoas idosas a transgressão terapêutica é mais acentuada devido à negligência e falta de memória. Quando há três ou mais medicamentos diferentes, a desobediência é ainda maior. O médico deve saber caracterizar a droga quanto, a tamanho, cor e formato a fim de diversificar, quando são

necessários mais de um medicamento. É conveniente rebatizar os 'remédios' conforme os objetivos desejados: 'comprimidos para o coração', 'comprimidos para pressão', etc.

PARÂMETROS PARA DETERMINAR A BIOEQUIVALÊNCIA

Para se determinar a biodisponibilidade e estabelecer a bioequivalência de produtos de droga pode se aplicar os seguintes parâmetros:

- Concentração máxima atingida no plasma (C_{max})
- Tempo empregado para atingir a concentração plasmática máxima (t_{max})
- Área sob a curva de concentração de droga versus tempo (AUC)
- Meia vida plasmática da droga ($t_{1/2}$)
- Constante de eliminação (k_e)
- Velocidade de absorção C_{max}/AUC



CAPÍTULO II

***Estudo de Bioequivalência de
duas formulações comprimidos
de atenolol em voluntários
sadios do sexo masculino***

I NTRODUÇÃO

O conceito de dois modelos de atividade de catecolamina foi primeiro descrito por Langley & Dale. Em 1940, Ahlquist conceituou as ações alfa e beta bloqueadoras das catecolaminas. Em 1950, James Black introduziu o pronetanol e o propranolol na terapêutica da *angina pectoris* e arritmias. Logo em seguida, compostos bloqueadores dos receptores β adrenérgicos foi observados não só por serem inibidores competitivos do receptor β adrenérgico como por possuírem ação depressiva direta e atividade estabilizadora de membrana. Compostos mais recentes como o pindolol, notou-se ter atividade agonista parcial. O atenolol foi descrito subsequentemente como um antagonista "cardioseletivo" ou β adrenérgico seletivo (PRICHARD, 1988).

O atenolol é um antagonista seletivo de receptor β_1 -adrenérgico hidrofílico, sem atividade simpatomimética intrínseca ou atividade estabilizadora de membrana (HERRY, 1977; HEEL *et al.*, 1979; MAJID *et al.*, 1979; FRISHMAN, 1982; EGGINGER, 1993), com uma duração de atividade de ao menos 24 h (SCOTT *et al.*, 1982; WADWORTH, MURDOCH, BROGDEN, 1991). Depois de muitos anos de uso clínico, o atenolol está bem estabelecido, e é uma opção de tratamento de várias enfermidades cardiovasculares, tais como hipertensão leve a moderada (DOUGLAS, JONES & CRUICKSHANK, 1976; COOPE, 1983) e *angina pectoris* estável (ERIKSSEN, OSVIK, DEDICHEN, 1977; FITZGERALD, 1979; GLAZIER *et al.*, 1986). Entretanto, ele também mostra ser eficaz no tratamento de algumas arritmias cardíacas (HOMBACH, BRAUN, HOPP, 1981; WADWORTH *et al.*, 1991) e tem sido associado com redução de mortalidade cardiovascular em pacientes com hipertensão e em pacientes com infarto miocárdico

(CONWAY *et al.*, 1976; CRUIKSHANK, 1988; ROSSI *et al.*, 1983; YUSUF, SLEIGHT, ROSSI, 1983). O atenolol efetivamente diminui a pressão arterial em pacientes idosos com hipertensão e em mulheres com hipertensão, associada com gravidez (WADWORTH *et al.*, 1991; COOPE, 1983).

Há várias vantagens terapêutica e diferenças farmacodinâmicas entre as drogas β bloqueadoras, bem como, um menor efeito de drogas antagonistas seletivas de receptor β_1 adrenérgico sobre o músculo liso bronquial (DECALMER *et al.*, 1978; PRICHARD, 1988) e no SNC devido à sua baixa solubilidade lipídica e limitada penetração no cérebro (CRUIKSHANK, *et al.*, 1980; WADWORTH *et al.*, 1991).

Após administração oral, o atenolol é absorvido parcialmente, somente 50% da droga é biodisponível (MASON *et al.*, 1979; MACAINSH *et al.*, 1980;). O pico da concentração plasmática máxima é atingido de 2 a 4 horas após a administração [IRSHAID *et al.*, 1996]. O atenolol se liga pobremente a proteínas plasmáticas e apenas 5% da droga é metabolizada no fígado (REEVES *et al.*, 1978; MASON *et al.*, 1979). Devido à sua hidrossolubilidade (CRUIKSHANK, 1982), o atenolol é eliminado principalmente pelos rins na forma inalterada (WARREN, WALER, MACAINSH, 1983; STSCHITZKY, 1993). O efeito do regime de dosagem de 50, 100 e 200 mg de atenolol uma vez por dia, quando comparado, não mostrou nenhuma diferença importante entre as doses (MAJID *et al.*, 1979, SCOTT, *et al.*, 1982).

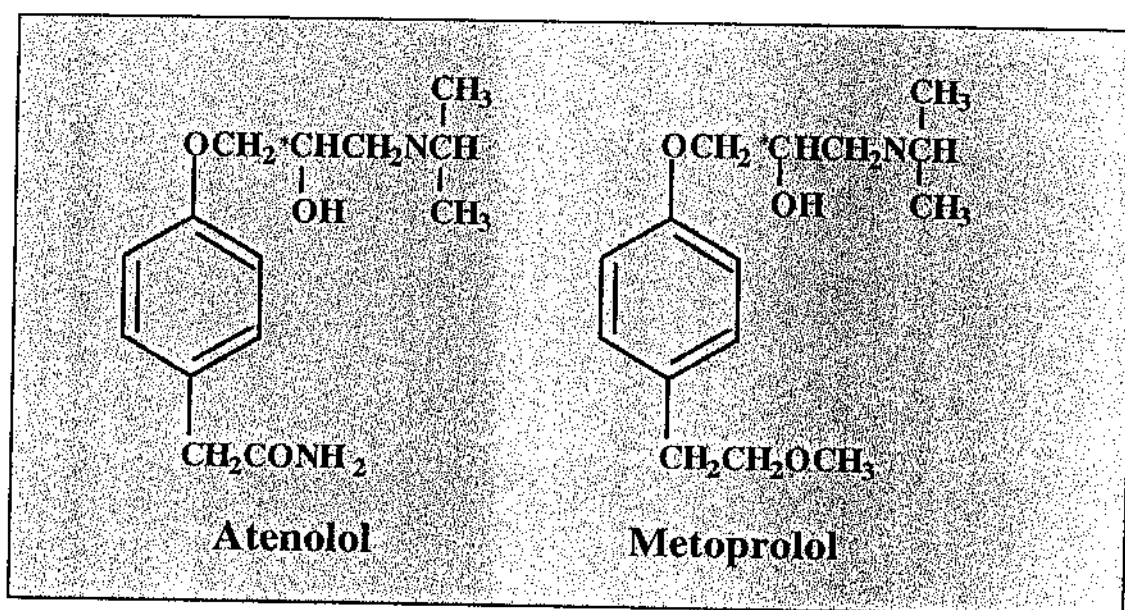


Figura 1. Estrutura química do atenolol e metoprolol (padrão interno)

O atenolol [4-(2-hidroxi-3-propoxi-amino-isopropil)-metil etil) amino] propoxi] benzeno acetoamida], é uma droga básica (pK_a : 9.6) [HEEL, 1987], com um coeficiente de partição de 0.015 (n-octanol / tampão com pH 7.4, à 37°C)

Todos os betabloqueadores, até hoje desenvolvidos, têm estrutura química semelhante à do isoproterenol. A fig. 1 mostra a estrutura química do atenolol e do metoprolol (padrão interno). Ambos apresentam a estrutura fundamental dos betabloqueadores: a fenoxipropanolamina N-alquilada. A parte responsável pela afinidade pelos receptores beta adrenérgicos é a cadeia alifática lateral e a hidroxila ligada ao carbono beta.

O atenolol é comercialmente disponível como uma mistura racêmica [(R,S) ou rac-atenolol], sendo a forma (-)S- o isômero ativo, enquanto o enantiômero (+)R- possui pouca ou nenhuma atividade farmacológica [EGGINGER *et al.*, 1993;]. A presença de um carbono assimétrico na sua estrutura molecular indica a presença de dois isômeros

opticamente ativos (enantiômeros). Uma molécula que têm ao menos um par de enantiômeros é um composto quiral (ex. propranolol, verapamil, ibuprofeno, warfarina). A mistura de enantiômeros em 1:1 é uma mistura racêmica [TRIGGLE, 1995].

EFEITOS FARMACOLÓGICOS

Hipertensão

O atenolol diminui os aumentos de pressão sistólica e diastólica em todos os graus de severidade (HARRY, 1977; SHANKS *et al.*, 1977; HEEL *et al.*, 1979; PLOSKER & CLISSOLD, 1992).

Estudos comparativos tem demonstrado que o atenolol quando administrado oralmente, reduz a pressão sanguínea numa extensão e proporção de pacientes similares às doses terapêuticas de outros antagonistas de receptores β -adrenérgico (como acebutalol, celiprolol, betaxolol, indenolol, metoprolol, nadolol, pindolol, propranolol, tertatolol), inibidores de enzima conversora de angiotensina (como, captopril, enalapril e lisinopril), antagonistas de cálcio (como a amlodipina, diltiazem, felodipina, nifedipina e verapamil), doxasim e alfametildopa (WADWORTH *et al.*, 1991). Neste sentido, SOUCEK, PRASEK e SPINAROVA (1993) relataram uma queda acentuada da pressão arterial e da frequência cardíaca após a primeira semana de tratamento de pacientes hipertensos com atenolol, sem ocorrência de hipotensão ortostática. Assim, a maioria dos pacientes hipertensos respondem favoravelmente ao tratamento com uma dose diária de 50 mg de atenolol, administrado oralmente. Embora na prática, doses maiores sejam empregadas com frequência, alguns estudos comparativos que utilizaram a variação da dose não mostraram diferenças significativas no efeito anti-hipertensivo observado entre as doses de 50 mg, 100 mg e 200 mg, administradas uma vez ao dia (DOUGLAS, JONES, CRUICKSHANK, 1976, RASMUSSEN *et al.*, 1982; SCOTT *et al.*, 1982; ROBERTSON *et al.*, 1983)

Angina pectoris

O atenolol reduz efetivamente a frequência destes episódios de angina e o consumo de trinitrato de glicerina em pacientes com angina (ROY, DAY, SOWTON, 1975). Durante prova de esforço na esteira, o atenolol reduziu os índices eletrocardiográficos de isquemia miocárdica, com dor ou sem dor, e melhorou o tempo de exercício (MAJID *et al.*, 1979). Foi demonstrado que o atenolol é efetivo em reduzir a angina e episódios isquêmicos em pacientes nos quais estas situações são resultantes de um aumento da demanda ou redução do suprimento de oxigênio, devido a constrição coronariana (GLAZIER *et al.*, 1986). Os episódios de isquemia silenciosa são reduzidos com ou sem aumento da frequência cardíaca precedendo o quadro (Glazier *et al.*, 1986). Portanto, os pacientes com doença isquêmica cardíaca têm uma melhora da angina após tratamento com atenolol. O atenolol deve ser iniciado na dose de 50 mg/dia; esta podendo ser aumentada para 100 mg/dia, embora estudos de variação da dose, em geral, não tenha mostrado benefícios maiores. No tratamento da angina, o atenolol é tão efetivo quanto o propranolol, e melhor do que a nifedipina e nitratos (NEILL *et al.*, 1981, DEANFIELD *et al.*, 1984). O atenolol pode ser associado de forma segura com agentes anti-anginosos como os mono e dinitratos (NEILL *et al.*, 1981) e o antagonista de cálcio nifedipina [Findlay, 1983]. Estudos têm sugerido que em pacientes com angina estável severa, a retirada abrupta de atenolol não leva a riscos maiores [Walker *et al.*, 1985 e Erikssen *et al.*, 1977].

Arritmias Cardíacas

As arritmias supraventriculares e ventriculares podem responder ao atenolol apesar de raramente ser a droga de escolha no tratamento de arritmia ventricular (ROSSI, *et al.*, 1983). Em pacientes com taquicardia supraventricular paroxística, o atenolol intravenoso (HOMBACH, *et al.*, 1981) pode ser usado agudamente para interromper a taquicardia, seguido de 50 - 100 mg/dia via oral, como tratamento profilático (HEEL, 1979). O antagonista de cálcio verapamil é comumente usado nesta situação, mas o atenolol não deve ser dado nas 48 horas após o verapamil e vice-versa. O atenolol em doses baixas,

25 - 50 mg/dia via oral, pode ser usado em combinação com digoxina no controle da frequência ventricular.

Infarto do miocárdio

Quando administrado precocemente no infarto do miocárdio, o atenolol reduz significativamente a frequência de extrassístoles ventriculares complexas (RAMSDALE, FARAGHER, BENNET, 1982; YUSUF *et al.*, 1983; CRUIKSHANK, 1988). Ainda mais, o atenolol produz alívio da dor isquêmica, em infarto agudo do miocárdio. Este alívio coincide com uma redução significativa na frequência cardíaca e na pressão sistólica (YUSUF *et al.*, 1983). O atenolol reduz a mortalidade cardiovascular em pacientes com hipertensão e em pacientes com infarto miocárdico (PRICHARD, 1988; WADWORTH *et al.*, 1991).

Hipertensão durante gravidez

O atenolol tem sido usado, com sucesso, na hipertensão arterial de mulheres grávidas (PRICHARD, 1988; WADWORTH *et al.*, 1991). A droga reduz de forma significativa a pressão arterial, prevenindo a proteinúria e o número de admissões hospitalares (THORLEY, MCAINSH, CRUIKSHANK, 1981). Não há efeitos adversos na prole (RUBIN, BUTTERS, CLARK, 1983, 1984, FABREGUES *et al.*, 1992, RANEM & JOUPPILA, 1995)

Idosos

O atenolol, efetivamente, diminui a pressão arterial em pacientes idosos com hipertensão (WADWORTH *et al.*, 1991). Os pacientes idosos apresentam efeitos adversos similares aos dos pacientes jovens (CRUIKSHANK, 1981 e COOPE *et al.*, 1983).

Hipertensão Associada com *Diabetes Mellitus*

O atenolol é preferível aos beta bloqueadores não seletivos para uso em diabéticos, uma vez que não possui efeitos metabólicos mediados pelos receptores β_2 adrenérgicos. Entretanto, o atenolol pode suprimir a taquicardia associada a hipoglicemia e os pacientes diabéticos devem ser avisados que este sinal associado a hipoglicemia é consideravelmente menor com atenolol do que com os beta-bloqueadores lipofílicos (RYAN *et al.*, 1983).

OBJETIVOS

Determinar a bioequivalência de duas formulações de atenolol (Atenol, comprimidos, 50 mg do laboratório Wellcome ICI, como formulação referência, *versus* Angipress, comprimidos, 50 mg do laboratório Biosintética, utilizado como formulação teste, baseada na comparação dos valores obtidos dos parâmetros farmacocinéticos de cada formulação calculados a partir da medida das concentrações plasmáticas de atenolol.

*M*ATERIAIS E *M*ÉTODOS

Foram selecionados dezoito voluntários do sexo masculino, com idade variável entre 21 a 43 anos (média $\pm$ EP: 30 ± 6.0 anos), peso corporal de 55.6 a 96.2 kg (média $\pm$ EP: 75.5 ± 11.5 kg), através de uma consulta médica realizada no ambulatório da unidade de farmacologia clínica. Durante a triagem foram obtidas informações relativas à história clínica e ao passado dos voluntários (anamnese) além de exames físicos.

Na avaliação clínica, os dezoito voluntários selecionados não apresentaram sinais ou sintomas de doenças cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica e psiquiátrica. Os resultados dos exames dos voluntários, tais como, eletrocardiograma e bioquímicos estavam dentro da faixa do normal, portanto, corroborando o estado de higidez:

- Hemograma completo e velocidade de hemossedimentação.
- Uréia e creatinina séricas.
- Transaminases (glutamato - oxalacetato e glutamato - piruvato) , fosfatase alcalina, Gama glutamil transpeptidase e bilirrubina.
- Glicemia de jejum.
- Proteínas totais e albumina.
- Sódio, cloro e potássio
- Urina I
- Protoparasitológicos

Após comprovação da higidez dos voluntários, eles foram submetidos a uma entrevista livre para avaliação da saúde mental, bem como das condições emocionais para

participar do ensaio clínico. Em seguida eles foram conscientizados da natureza do estudo e ainda foram esclarecidas as dúvidas remanescentes. Os voluntários, logo após assinaram um termo de consentimento para participarem do ensaio clínico. O protocolo clínico foi aprovado pelo comitê de Ética do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

PROTOCOLO CLÍNICO

O estudo clínico realizou-se por delineamento aleatório cruzado de dois períodos, com intervalo de “washout” de quatorze dias entre as doses, e segundo a tabela de randomização mostrada a seguir:

Tabela 1. Tabela de randomização

Voluntário Nº	Fase I	Fase II
01	Atenol	Angipress
02	Angipress	Atenol
03	Atenol	Angipress
04	Angipress	Atenol
05	Atenol	Angipress
06	Atenol	Angipress
07	Angipress	Atenol
08	Angipress	Atenol
09	Angipress	Atenol
10	Angipress	Atenol
11	Angipress	Atenol
12	Angipress	Atenol
13	Angipress	Atenol
14	Atenol	Angipress
15	Atenol	Angipress
16	Angipress	Atenol
17	Angipress	Atenol
18	Atenol	Angipress

Os voluntários foram hospitalizados na véspera do início do estudo e tiveram assistência de médicos e enfermagem especializados.

Os indivíduos receberam dieta geral até às 23 horas, quando iniciaram o jejum, visando então o início do ensaio clínico previsto para às 7:00 h do dia seguinte.

Após 8 horas de jejum, foi feita uma coleta de sangue imediatamente antes da administração do atenolol. As outras coletas foram feitas após administração de uma única dose de 50 mg de uma das preparações de atenolol, o qual seguiu rigorosamente a lista de randomização (tabela 1). O medicamento foi administrado com 200 ml de água potável.

Os voluntários não ingeriram qualquer alimento sólido até 8 horas após a administração do atenolol; a partir de então, eles receberam dieta geral.

Durante o período de internação, os voluntários não ingeriram quaisquer alimentos diferentes da dieta padrão. A ingestão de líquidos foi permitida após o almoço, mas bebidas contendo xantinas (incluindo chá, café e bebidas a base de cola) foram evitadas.

COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas através de "butterfly" heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário, imediatamente antes da administração de atenolol e nos seguintes intervalos: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 18.0 e 24.0 horas após a administração das formulações. Foram coletados 10 ml de sangue por amostra e foram colocados em tubos de vidros contendo EDTA devidamente identificados. Prévio a cada coleta foram registrados os valores de pressão arterial e frequência cardíaca.

Depois da coleta as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos e o plasma foi separado em tubo de vidros de 5 ml identificados e em seguida foi estocado no freezer à -20°C, até serem analisadas.

ANÁLISES DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS

As amostras de um único voluntário foram analisadas no mesmo dia, evitando assim variações interensaio. A concentração plasmática de atenolol foi medida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) do tipo fase reversa - par iônico e os picos foram monitorados através de detector de fluorescência.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A curva de calibração foi preparada a partir da diluição de uma solução "stock" de atenolol [1000 ng/ml em metanol / água: 50 / 50 (v/v)] com plasma branco obtido dos voluntários, nas concentrações de 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/ml de atenolol.

Foi pipetado 1 ml da amostra de plasma dos voluntários (em paralelo com os pontos da curva de calibração) em um tubo de vidro. Em seguida foram adicionados 100 µl de uma solução de metoprolol (padrão interno; 8 µg/ml em metanol / água 50 / 50 v/v) e mais 400 µl de uma solução de hidróxido de sódio 0.25M para a alcalinização do meio. Após uma rápida agitação em vortex, foram adicionados 7 ml de uma mistura composta de cicloexano / n-butanol (50/50 v/v). A mistura foi rigorosamente vortexeada por 3 min e centrifugada à 3500 rpm por 10 min. A fase orgânica foi transferida para outro tubo contendo 500 µl de uma solução aquosa de HCl 0.1 M para ser re-extraído em meio ácido. Em seguida o tubo foi agitado em vortex por mais 2 min e centrifugado à 3500 rpm por 1 min. A fase orgânica foi desprezada e a fase aquosa foi evaporada a 37°C sob corrente de nitrogênio. O resíduo foi ressuspendido com 100 µl de fase móvel e 50 µl foram injetados no cromatógrafo.

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A fase móvel era constituída de uma mistura de acetonitrila / metanol / tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 M) contendo 0.1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) na

proporção 35 / 15 / 50 (v/v), respectivamente. A fase móvel foi bombeada a um fluxo de 1 ml/min através de uma coluna Waters C₁₈ μ Bondapak 10 μ m, 3.9 x 300 mm, à temperatura ambiente. O eluato foi monitorado por fluorescência com excitação à 240 nm e emissão à 300 nm (atenuação: 64). O sistema cromatográfico era constituído de uma bomba Waters 510 (Millipore, EUA) acoplado a um detector de fluorescência Shimadzu RF535 (Shimadzu, Japão), e o sinal de saída captado por registrador potenciométrico Bryans 28000 (Bryan Southern Instruments, Grã Bretanha).

A quantificação das amostras dos voluntários foi obtido por plotar as razões da altura do pico de atenolol / metoprolol com aquelas amostras de plasma branco contaminado com quantidades conhecidas de atenolol (20, 50, 100, 200, 500 e 1000 ng / ml) e 800 ng de metoprolol.

ANÁLISE ESTATÍSTICA E FARMACOCINÉTICA

As curvas individuais de concentração plasmáticas de atenolol em função do tempo foram obtidas para cada uma das formulações. A concentração máxima atingida (C_{max}) e o tempo gasto para atingir a concentração plasmática máxima (t_{max}) foram obtidos a partir de cada curva. A área sob a curva da concentração de atenolol vs. tempo de 0 - 24 horas ($AUC_{[0-24]}$) foi calculada pela regra dos trapézios.

A constante de eliminação terminal de primeira ordem (k_e) foi calculada através da equação de regressão linear entre o logaritmo da concentração e o tempo para os pontos que descreviam a fase de eliminação das curvas de concentração vs. tempo. O tempo de meia vida plasmática ($t_{1/2}$) foi calculado utilizando a equação $t_{1/2} = \ln(2) / k_e$. A extrapolação das $AUC_{[0-24]}$ ao infinito (AUC) foi realizado pela adição do valor C_{24} / k_e às $AUC_{[0-24]}$ calculadas (onde C_{24} = concentração plasmática 24 h após dose, calculada a partir da equação de regressão linear obtida para estimar as k_e).

A bioequivalência entre ambas formulações foi avaliada através do cálculo das razões individuais teste / referência para C_{max} , $AUC_{[0-24]}$, AUC, $t_{1/2}$, k_e e C_{max}/AUC e as

diferenças individuais teste - referência para $t_{\max}$, junto com as médias e os intervalos de confiança (IC) de 90%. A inclusão dos IC 90% para as razões percentuais dentro do intervalo 80 - 125%, e a inclusão do valor "zero" dentro do IC 90% para as diferenças foram analisadas empregando testes paramétrico (ANOVA para dados não transformados e transformados por logaritmo) e não-paramétrico (teste de Wilcoxon de soma dos escores, de acordo com HAUSCHKE *et al.*, 1990). Para tais cálculos, empregou-se o programa de computador "Bioequivalence Program for two-Period Crossover Studies", versão 3.4.

DROGAS E REAGENTES

Os comprimidos de 50 mg de atenolol foram obtidos do laboratório Biosintética (formulação teste, Angipress - 50 mg, lote: 94102701, validade: 10/99) e do laboratório Wellcome ICI (formulação de referência Atenol 50 mg, lote: 48894, validade: 08/98).

Padrões de atenolol e metoprolol (padrão interno para HPLC), dodecil sulfato de sódio e acetonitrila (grau cromatográfico) foram obtidos da Sigma Chemical. Co. (St. Louis, MO, EUA).

Ciclohexano, n-butanol e hidróxido de sódio (grau analítico) foram fornecidos pela Casa da Química Indústria e Comércio Ltda (SP, Brasil). Outros reagentes, tais como ácido clorídrico e fosfato monobásico hidratado, foram adquiridos da Merck Indústrias Químicas (RJ, Brasil). Metanol (grau cromatográfico) foi obtido do Laboratório Montecatini Group (Milano, Itália).

RESULTADOS

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

Uma queda mínima na pressão sistólica e diastólica (aproximadamente 10 mmHg em posição supina) foi observada entre 8 e 10 horas após a administração de atenolol (figura 2), com ambas as formulações apresentando perfis similares. Além disso, quando comparados aos valores basais, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na pressão sistólica e diastólica e na frequência cardíaca, a qualquer tempo.

A figura 3 mostra um exemplo de cromatograma obtido pelo método de HPLC descrito acima. Os tempos de retenção foram de 5.5 e 8 min para atenolol e metoprolol, respectivamente. Com o método empregado, a menor concentração plasmática quantificável de atenolol foi de 20 ng/ml (correspondente a uma altura de pico com valor sinal / ruído = 5). A curva de calibração mostrou linearidade na faixa de 20 ng/ml à 1000 ng/ml, com coeficiente de regressão maior ou igual à 0.999, e valores do intercepto não significantemente diferente de zero. Os valores dos coeficientes de variação (CV%) inter-ensaio foram 21.3, 10.5, 9.0, 4.4, 7.6, e 2.2 % para concentrações plasmáticas de atenolol de 20, 50, 108, 200, 500 and 1000 ng/ml respectivamente (número de replicatas entre 14 e 17 para cada concentração). A variação intra-ensaio foi determinada por ensaio de seis replicatas de amostras plasmáticas de concentrações de 55, 214, and 1081 ng/ml dentro de uma mesma corrida e os CV% obtidos foram 6.3, 2.6, e 4.3% para cada concentração, respectivamente.

As curvas das médias das concentrações plasmáticas de atenolol em função do tempo obtidas após a administração oral de cada formulação de atenolol de 50 mg são mostradas na figura 4.

A Tabela 2 mostra os valores das médias geométricas e os intervalos de confiança de 90% para $AUC_{[0-24]}$, AUC , k_e , $t_{1/2}$, C_{max} , e C_{max}/AUC , assim como os valores das medianas de t_{max} para cada formulação

A Tabela 3 mostra as análises estatísticas das razões individuais teste / referência para $AUC_{[0-24]}$, AUC , k_e , $t_{1/2}$, C_{max} e C_{max}/AUC , bem como a inclusão dos IC 90% para as médias geométricas dentro da faixa de bioequivalência de 80 - 125%. As diferenças individuais de t_{max} entre as formulações foram estatisticamente diferentes de zero, como mostrado pelo fato de que o IC 90% para diferenças individuais teste - referência não incluiu o valor zero.

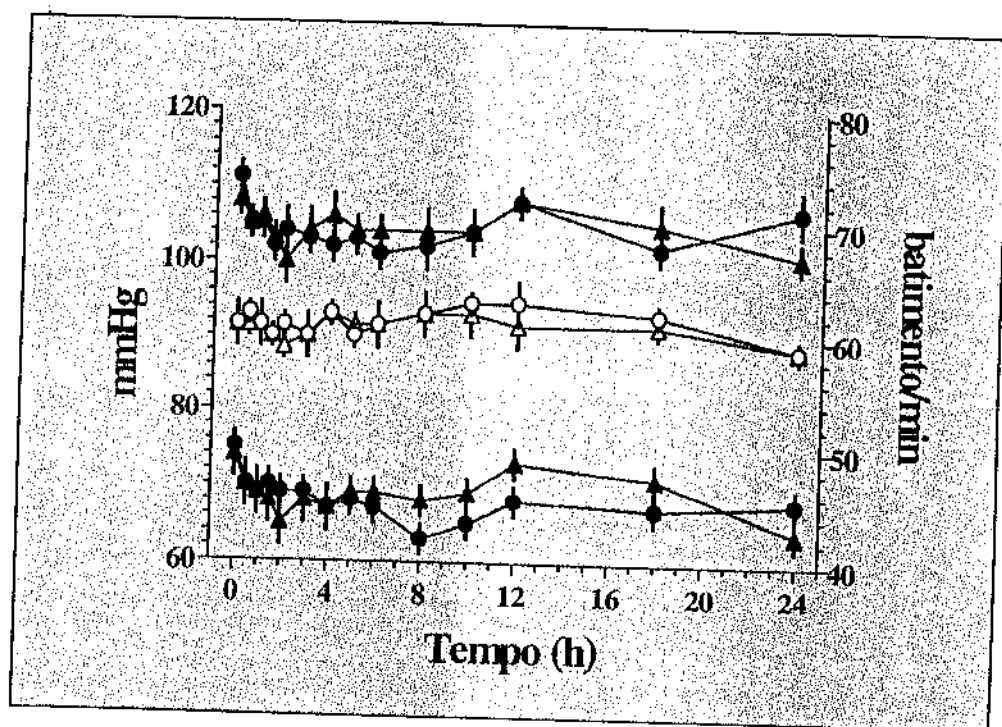


Figura 2. Medidas de pressão arterial (símbolos cheios) e frequência cardíaca (símbolos vazios) em função do tempo obtidos após a administração oral de 50 mg de atenolol (círculos: Angipress; triângulos: Atenol) em 18 voluntários sadios no período das 24 h de internação.

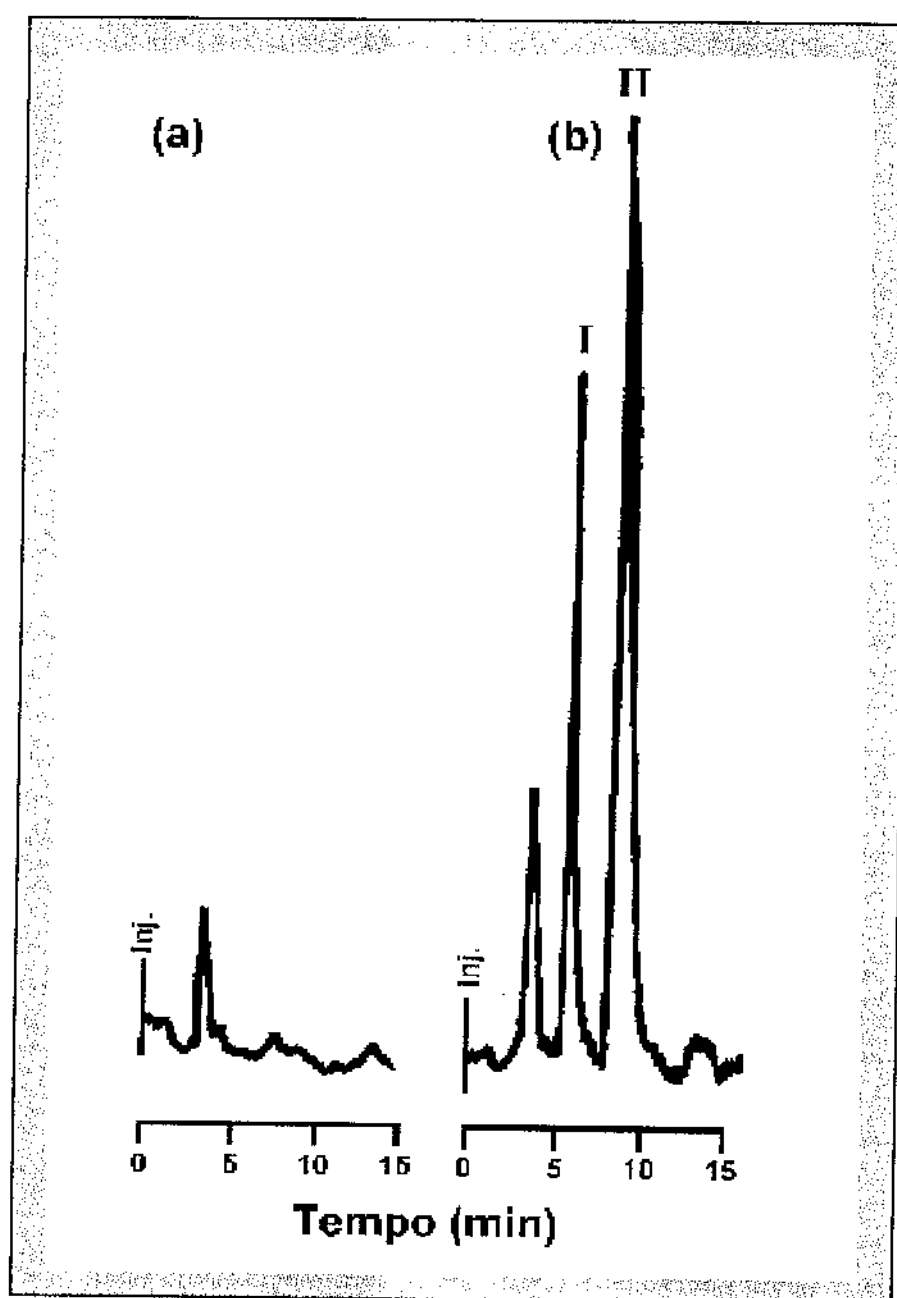


Figura 3. Exemplo de cromatograma obtido após a injeção de:

Painel a: plasma branco. Observe-se a ausência de picos interferentes aos tempos de retenção dos compostos de interesse.

Painel b: amostra de plasma de voluntário coletada 6 h após a administração de 50 mg de atenolol (Atenol; painel b). A concentração de atenolol medida nesta amostra foi de 170 ng/ml.

Pico I: atenolol; pico II: metoprolol (padrão interno).

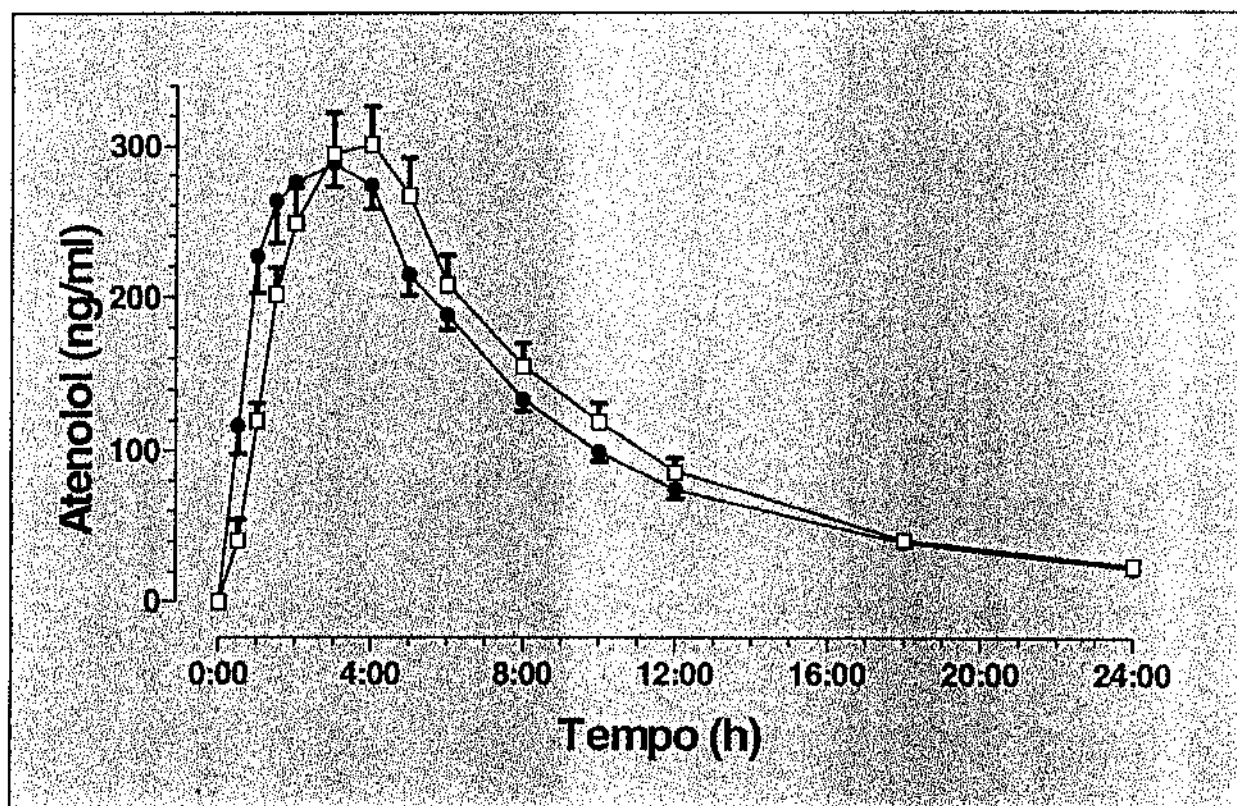


Figura 4. Concentrações plasmáticas (médias aritméticas $\pm$ EP) de atenolol em função do tempo para as duas fórmulações de atenolol (50mg) administradas em 18 voluntários sadios. Angipress: quadrados vazios; Atenol: círculos cheios.

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos de atenolol obtidos após a administração de cada uma das formulações de atenolol 50 mg nos 18 voluntários masculinos sadios.

Parâmetro	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{(0-24)}$ (ng h ml ⁻¹)		
Média geométrica	2610	2561
IC 90%	2288 - 2977	2331 - 2814
AUC (ng h ml ⁻¹)		
Média geométrica	2789	2721
IC 90%	2455 -3168	2479 - 2987
C_{max} (ng/ml)		
Média geométrica	328	327
IC 90%	280 - 385	290 - 368
k_e (h ⁻¹)		
Média geométrica	0.137	0.134
IC 90%	0.127 -0.147	0.126 - 0.142
$t_{1/2}$ (h)		
Média geométrica	5.0	5.1
IC 90%	4.7 - 5.4	4.9 5.5
t_{max} (h)		
Mediana	3	2.5
Faixa	1.5 - 5	1 - 4
C_{max}/AUC (h ⁻¹)		
Média geométrica	0.118	0.120
IC 90%	0.108 - 0.128	0.112 - 0.129

Tabela 3: Análise estatística das razões individuais teste / referência de $AUC_{(0-24)}$, AUC , C_{max} , k_e , $t_{1/2}$, e C_{max}/AUC , e das diferenças teste - referência de t_{max} entre ambas formulações de atenolol.

ANGIPRESS / ATENOL	Paramétrico		Não-paramétrico*	
	Média geom.	IC 90%	Ponto estimado	IC 90%
$AUC_{(0-24)}$				
razão %	99.6	88.1 - 112.6	100.5	89.4 - 112.6
AUC				
razão %	99.7	88.1 - 112.9	99.8	88.3 - 109.7
C_{max}				
razão %	98.0	86.5 - 111.0	99.2	84.5 - 114.0
k_e				
razão %	97.2	89.2 - 105.8	98.6	90.2 - 106.2
$t_{1/2}$				
razão %	102.8	94.4 - 111.9	101.1	93.9 - 111.6
t_{max} (h)				
diferença (h)	0.8**	0.3 - 1.3#	1.0	0.25 - 1.25#
$C_{max} / AUC_{(0-\infty)}$				
razão %	97.8	90.6 - 105.5	98.1	91.9 - 106.0

*de acordo com HAUSCHKE *et al.*, [1990];

**média aritmética;

IC 90% para as diferenças individuais.

DISSCUSSÃO

O método de HPLC descrito neste trabalho é similar a outras metodologias previamente publicadas, como aquelas de YEE (1979), TEITELBAUM (1991). O método utilizado provou ser de fácil execução, simples, rápido e reproduzível. O tempo de retenção alcançado pelo padrão interno e o não aparecimento de picos tardios permitiu que todas as amostras de um único voluntário fossem analisadas num mesmo dia de trabalho a fins de evitar as variações inter ensaio.

A mistura dos solventes cicloexano / n-butanol utilizado em nosso método apresentou os melhores resultados quando comparado com outros solventes ou misturas, incluindo o heptano, diclorometano, acetato de etila ou metil-1-butanol. Entretanto, a capacidade de alta extração dessa mistura de solvente tornou necessário uma re-extração em meio ácido a fins de se obter cromatogramas sem interferência de compostos endógenos do plasma. Solução de ácido clorídrico 0.1 M provou ser mais apropriado para a re-extração dos compostos de interesse do que outros ácidos testados, tais como fosfórico, sulfúrico ou acético. A detecção dos picos de atenolol e metoprolol por fluorescência após a re-extração proporcionou um método suficientemente sensível (20 ng/ml) para alcançar os objetivos desse estudo.

A adição de SDS (um reagente de par iônico hidrofóbico) na fase móvel, resultou em uma resolução satisfatória dos picos do atenolol e metoprolol, apesar da grande similaridade estrutural e cromatográfica. Em nosso laboratório recentemente fizemos uso dessa estratégia para separar adequadamente a cetirizina de seu derivado epoxi P026

(MUSCARÁ *et al.*, 1995), e no nosso conhecimento, o único método publicado de HPLC de fase reversa - par iônico para a separação de β -bloqueadores em amostras de plasma é aquele descrito por SHEN *et al.*, (1992).

Como já mencionado anteriormente, o atenolol é comercializado como mistura racêmica, sendo que somente o isômero S é o composto farmacologicamente ativo. Diferente de outros β -bloqueadores (como por exemplo o propranolol) no qual um dos isômeros interfere com a farmacocinética do outro isômero, o atenolol não apresenta variação na farmacocinética de seus isômeros. Desta forma, EGGINGER *et al.*, (1993) tem demonstrado que o perfil farmacocinético do enantiômero ativo (S) não é diferente quando é administrado cada isômero individualmente ou como mistura racêmica. Estes resultados junto com o estudo de bioequivalência recentemente publicado por IRSHAID *et al.*, (1996), autorizarão-nos para realizar uma avaliação da bioequivalência de duas formulações de atenolol com base na concentração plasmática da mistura racêmica de atenolol.

A Tabela 2 mostra a média dos valores de $AUC_{[0-24]}$, AUC, C_{max} , $t_{1/2}$, k_e , C_{max}/AUC e t_{max} . Tais valores foram similares para ambas formulações e foi observado um importante grau de sobreposição entre seus intervalos de confiança de 90% para as médias geométricas. Os valores observados para $t_{1/2}$, t_{max} , AUC e C_{max} estão de acordo com aqueles relatados por outros autores para este tipo de formulação farmacêutica (CLEMENTI *et al.*, 1994; BOYD *et al.*, 1989; MILLER & GUERTIN, 1992; STOSCHITZKY *et al.*, 1993; EGGINGER *et al.*, 1993).

O valor médio de $AUC_{[0-24]}$ foi aproximadamente de 94% da AUC (extrapolada ao infinito) para ambas formulações, e nenhum voluntário mostrou valores menores de 85%. Isso permite o cálculo do grau de biodisponibilidade relativo a partir dos valores de $AUC_{[0-24]}$ de acordo com os requerimentos da União Européia (EU), que estipula um mínimo de 80% da AUC.

A tabela 3 mostra que os intervalos de confiança de 90% das médias das razões individuais de $AUC_{[0-24]}$, AUC, C_{max} , k_e , $t_{1/2}$ e C_{max}/AUC (após a transformação pelo logaritmo) estiveram incluídos dentro da faixa de bioequivalência de 80 - 125% quando

analisados seja por métodos paramétrico ou não paramétrico. As diferenças de t_{max} foram estatisticamente diferentes de zero, como mostrado pelos intervalos de confiança de 90% obtidos por testes paramétrico e não paramétrico. Estes resultados mostram que ambas formulações são claramente bioequivalentes para a extensão de absorção como requerido pela US FDA (1985, 1993). Entretanto, os resultados obtidos nas diferenças individuais de t_{max} faz com que as conclusões sobre bioequivalência para a velocidade de absorção devam ser mais discutidas. Apesar de C_{max} e t_{max} serem considerados como indicadores da velocidade de absorção, muitos autores tem questionado a utilidade e as limitações desses parâmetros para decidir sobre o problema de bioequivalência, dados os efeitos que o esquema de amostragem tem sobre eles. Neste sentido, ENDRENYI *et al.*, (1991) têm demonstrado que C_{max} não apenas reflete a velocidade de absorção, mas também a extensão, como evidenciado pela alta correlação observada entre este parâmetro e AUC, e propôs a razão C_{max}/AUC como melhor indicador da velocidade de absorção. Neste estudo, a média geométrica e o intervalo de confiança de 90% para as razões individuais teste / referência para C_{max}/AUC ou C_{max} estiveram totalmente incluídos dentro da faixa de bioequivalência de 80 - 125%. Com base nesses resultados, as conclusões sobre a presença de bioequivalência para velocidade de absorção seriam opostas aos resultados observados com referência às diferenças significantes dos t_{max} entre ambas formulações. Nos requerimentos da UE consta que a importância de t_{max} como um índice de velocidade de absorção “somente faz sentido se houver necessidade clinicamente relevante para a liberação rápida ou ação ou sinais de relação entre concentração e efeitos adversos” (SALMONSON, 1996).

Como mostrado na Tabela 2, as medianas de t_{max} para as duas formulações de comprimidos de atenolol de 50 mg são 2.5 e 3 h, com largos intervalos de valores (1 - 4 e 1.5 - 5 h para as formulações referência e teste, respectivamente). Como já mencionamos, quando os valores de pressão arterial ou frequência cardíaca foram comparados não foram observadas quaisquer diferenças significantes, apesar de ambas formulações terem causado uma queda na pressão sanguínea. Considerando estas observações, nós podemos concluir que as diferenças de t_{max} entre ambas formulações de atenolol (média 0.8 h) não são de significância clínica, mesmo quando administrado cronicamente em pacientes cardíacos.

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

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

Concluir sobre a bioequivalência de duas ou mais formulações que contém a mesma droga e a mesma dosagem administradas pela mesma via consiste em comparar as biodisponibilidades relativas. Então, a existência de bioequivalência implica que não deve haver diferenças estatísticas entre as formulações. Por isso são usados vários testes estatísticos para comparar tais biodisponibilidades. Os testes estatísticos paramétricos geralmente assumem que os dados têm uma distribuição normal. A transformação dos dados de AUC, C_{max} , k_e e $t_{1/2}$ pela aplicação da função logaritmo é realizada, desse modo os dados transformados distribuem-se normalmente.

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

O "Two One-sided Tests" (paramétrico: Schuirmann [1987], não-paramétrico: Hauschke *et al.*, [1990]) é o método usado para determinar grandes diferenças (por exemplo maior que 20%) entre as médias dos parâmetros. Os intervalos de confiança são estimados para as médias das amostras, baseado na distribuição de Student dos dados. Neste teste requerido pelo FDA, o intervalo de confiança de 90% da razão das médias dos dois produtos deve estar dentro de $\pm 20\%$ (STEINIJANS *et al.*, 1988) para medida da velocidade e extensão de absorção da droga. O limite inferior do intervalo de confiança de 90% para a razão das médias não pode ser menor que 0.80, enquanto que o superior não pode ser maior que 1.20. Então o intervalo de confiança de 90% é uma função do tamanho da amostra e variabilidade do estudo, incluindo a variabilidade inter e intra-indivíduo.

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

SUMMARY

The bioavailability of two atenolol tablet formulations: Angipress (from Laboratórios Biosintética, SP, Brazil), and Atenol (from Wellcome ICI Laboratory, SP, Brazil) were compared in eighteen healthy male volunteers who received a single dose of 50 mg of each formulation, in an open randomized two period crossover fashion with a fourteen day washout interval between doses. Plasma samples were obtained over a 24 h interval and atenolol concentrations were determined by HPLC with fluorimetric detection. From the plasma atenolol concentration vs time curves, $AUC_{[0-24]}$ (area under the concentration vs time curves from 0 to 24 h), C_{max} (maximum achieved concentration), t_{max} (time to achieve C_{max}), $t_{1/2}$ (terminal first order elimination half-life), k_e (terminal first order elimination constant) and AUC (area under the concentration vs time curves extrapolated to infinity) were obtained. All these variables were analysed using both parametric and non-parametric statistics. The two atenolol tablet brands did not show statistically significant differences in bioavailability as assessed by analyses of $AUC_{[0-24]}$, AUC, C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, and k_e values. Based on these results and on the United States Food and Drug Administration (FDA) and the European Union requirements, we conclude that both formulations are bioequivalent.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERY, A.; DEPLAEN, J.; LIJNEN, P.; MCAINSH, J.; REYBROUCK, T. - Relationship between blood level of atenolol and pharmacological effect. **Clin Pharmacol Ther** 21: 691-699, 1977.
- BASSON, R.P.; CERIMELE, B.J.; DESANTE, K.A.; HOWEY, D.C. - t_{max} : An unconfound metric for rate of absorption in single dose bioequivalence studies. In: "Bio International: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics," International Conference of F.I.P. "Bio-Internacional 96" held in Tokyo, Japan, april22-24. K.K. Midha & T.Nagai. pp.90-93, 1996.
- BETTS, T.A. & ALFORD, C. - Beta-blocking drugs and sleep. A controlled trial. **Drugs** 25: 268-272, 1983.
- BOYD, R.A.; CHIN, K.S.; PEDRO, O.D.; WILLIAMS, R.L.; GIACOMINI, K.M. - The pharmacokinetics of the enantiomers of atenolol. **Clin Pharmacol Ther** 45: 403-410, 1989.
- BROWN, H.G. - Clinical pharmacological observations on atenolol a beta-adrenoceptor blocker. **Clin Pharmacol Ther** 20: 524-534, 1976.

- CLEMETI, W.A.; GARVEY, T.Q.; CLIFTON, G.D.; MCCOY, R.A.; BRANDT, S.; SCHWART, Z. - Single dose Pharmacokinetics of (S)-Atenolol Administered Orally as a Single Enantiomer Formulation and as a Racemic Mixture (Tenormin). **Chirality** 6: 169-174, 1994.
- CONWAY, F.J.; FITSGERALD, J.D.; MCAINSH, J.; ROWLANDS, D.J.; SIMPSON, W.T. - Human pharmacokinetic and pharmacodynamic studies on atenolol (ICI 66, 082), a new cardioselective beta-adrenoceptor blocking drug. **Br J Clin Pharmacol** 3: 267-272, 1976.
- COOPE, J.R. - Multicentre trial of treatment of hypertension in the elderly in primary care. **Drugs** 25: 87-88, 1983.
- CREAN, P.A.; CRAKE, T.; MULCAHY, D.; WRIGHT, C.; MOCKUS, L.; FOX, K.M. - Effect of antianginal agents on silent myocardial ischaemia. **Clin Sci** 71 (suppl 15), 1986.
- CRUICKSHANK, J.M. - The clinical implications of hydrophilicity and cardioselectivity in beta-blockers. **Int J Clin Pharmacol Res** 11: 185-189, 1982.
- CRUICKSHANK, J.M.; NEILIL-DWYER, G.; CAMERON, M.M; MCAINSH, J - Beta-adrenoceptor-blocking agents and the blood-brain barrier. **Clin Sci** 59: 453-455, 1980.
- CRUICKSHANK, J.M. - Beta blockers, bradycardia and adverse effects. **Acta Ther** 7: 309-321, 1981.
- CRUICKSHANK, J.M. - Beta-blockade in acute myocardial infarction. **J Cardiovas Pharmacol** 12: suppl1:59-70, 1988.
- DAY, J.L.; METCALFE, J.; SIMPSON, C.N. - Adrenergic mechanisms in control of plasma lipid concentrations. **Br Med J** 284: 1145-1148, 1982.

- DAY, J.L.; SIMPSON, N.; METCALFE, J.; PAGE, R.L. - Metabolic consequences of atenolol and propranolol in treatment of essential hypertension. **Br Med J** 1: 77- 80, 1979.
- DECALMER, P.B.S.; CHATERJEE, S.S.; CRUICKSHANK, J.M.; BENSON, M.K.; STERLING, G.M. - Beta-blockers and asthma. **Br Heart J** XL: 184-189, 1978.
- DOUGLAS-JONES, A.P. & CRUICKSHANK, J.M. - Once-daily dosing with atenolol in patients with mild to moderate hypertension. **Br J Pharmacol** 4: 523-527, 1976.
- EDRENYI, L.; FRITSCH, S.; YAN, W. - C_{max}/AUC is a clearer measure than C_{max} for absorption rates in investigations of bioequivalence. **Int J Clin Pharmacol Ther** 29: 394-399, 1991.
- EGGINGER, G.; LINDNER, W.; KARH, S.; STSCHITZKY, K. - Stereoselective HPLC bioanalysis of atenolol enantiomers in plasma: application to a comparative human pharmacokinetic study. **Chirality** 5: 506-512, 1993.
- ERKSEN, J.; OSVIK; DEDICHEN, J. - Atenolol in the treatment of angina pectoris. **Acta Med Scand** 201: 579-584, 1977.
- FABREGUES, G.; ALVAREZ, L.; VARAS-JURI, P.; DRISALDI, S.; CERRATO, C.; MOSCHETTONI, C.; PITUELO, D.; BAGLIVO, H.P.; ESPER, R.J. - Effectiveness of atenolol in the treatment of hypertension during pregnancy **Hypertension** 19 (2 Suppl): II129-31, 1992.
- FAGARD, R.; AMERY, A.; DEPLAEN, J.F.; LIJNEN, P.; MINNOTTEN, A. - Relative value of beta-blockers and thiazides for initiating antihypertensive therapy. **Acta Cardiol** 31: 411-426, 1976.
- FINDLAY, I.; DARGIE, H.J.; FORD, M.; ELLIOT, T. - The combination of nifedipine and atenolol in angina pectoris: efficacy and effect on left ventricular function. **Circulation** 68: Abstract 210, 1983.

- FITZGERALD, J.D. - Atenolol. In Goldberg M E (ed) Pharmacological and biochemical properties of drug substances, vol 2. **Am Pharmaceutical Association**, Washington, 1979.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - In vivo bioequivalence guidances. **Pharmacopeial Forum 19**: 6501-6508, 1993.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (4-1-1985 Edition), Federal Register, part 320: **Bioavailability and Bioequivalence Requirements**, pp 154-173.
- FORSHUND, T.; FYHRQUIST, F.; HORTLING, L. - Sustained antihypertensive effect of captopril combined with diuretics and beta-adrenergic blocking drugs in patients with resistant hypertension. **Acta Med Scand 213**: 299-303, 1983.
- FRISHMAN, W.H. - Atenolol and Timolol, two new systemic β -adrenoceptor antagonists. **N Engl J Med 306**:1424-1462, 1982
- GEISLER, L.S. - Hoffge Intoxikationen mit Beta-rezeptorenblockers. **Munchener Medizinische Wochenschrift 125**: 434-436, 1983.
- GLAZIER, J.J.; CHIERCHIA, S.; GEROSA, S.; CREAN, P.A.; BERKENBOOM, G.; MASERI, A. - Atenolol prevents silent and painful ischaemia in patients with mixed angina. 59th Scientific Session of American **Heart Association**. Dallas, 1986
- HARRY, J.D. - The demonstration of atenolol as a beta-blocking drug in man. **Postg Med J 53**: 65-69, 1977.
- HAUSCHKE, D.; STEINJANS, V.W.; DILETTI, E. - A distribution- free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. **Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 28**: 72-78, 1990.
- HEEL, R.C.; BROGDEN, R.N.; SPEIGHT, T.M., AVERY, G.S. - Atenolol: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in angina pectoris and hypertension. **Drugs 17**: 425-460, 1979.

- HOLT, D.W.; BHAMRA, R.; THORLEY, K.J.; FOWLER, M.B.; JACKSON, G. - High performance liquid chromatographic measurement of atenolol: placental transfer and expression in breast milk. **Br J Clin Pharmacol** 14: 148-149, 1982.
- HOMBACH, V.; BRAUN, V.; HOPP, H.W. - Antiarrhythmic effects of acute betablokade with atenolol on supraventricular tachycardias at rest and during exercise. **Klinische Wochenschrift** 59: 123-133, 1981.
- IRSHAID, Y.M.; RAWASHDEH, N.M.; AWWADI, F.F.; KATO, M.K. - Comparative pharmacokinetics of two brands of atenolol following a single oral administration. **Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol** 34: 457-461, 1996.
- ISIS (First International Study of Infarct Survival) Collaborative Group, Radcliffe Infirmary, Oxford, England - Randomised trial of intravenous atenolol among 16027 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS - I, **Lancet** 2: 57-66, 1986.
- JOHANSSON, G. & REGARDH, C.G. - Clinical pharmacokinetics of beta-adrenoceptor blocking drugs. **Clin Pharmacokinetics** 1: 233-263, 1976.
- KOFAHL, B.; HENKE, D.; MUTSCHLER, E. - Direct enantiospecific HPLC bioanalysis of (R,S)-atenolol on a chiral stationary phase. **Chirality** 5: 479-482, 1993.
- LAWRENCE, D.S.; SAHAY, J.N.; CHATTERJEE, S.S.; CRUICKSHANK, J.M. - Beta-blockers in asthma. **Drugs** 25: 232-236, 1983.
- LIEDHOLM, H.; MELANDER, A.; BITZEN, P.O. - Accumulation of atenolol and metoprolol in human breast milk. **Eur J Clin Pharmacol** 20: 229-231, 1981.
- MAJID, P.A.; VAN DER VIJGH, W.J.F.; FEITJER, P.J.; WADEH, R.; VAN DER WALL, E.E.; ROOS, J.P. - Once daily atenolol (Tenormine) in the treatment of angina pectoris. Observations on clinical efficacy, pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Europ J Cardiol** 9: 419-435, 1979.

- MASON, W.D.; WINER, N.; KOCHAK, G.; COHEN, I.; BELL, R. - Kinetics and absolute bioavailability of atenolol. **Clin Pharmacol Ther** 25: 408- 415, 1979.
- MASON, W.D.; WINER, N.; KOCKAK, G.; COHEN, I.; BELL, R. - Kinetics and absolute bioavailability of atenolol. **Clin Pharmacol Ther** 25: 408-415, 1979.
- MCAINSH, J. - Pharmacokinetics of atenolol. Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series n° 19, 1980.
- MCAINSH, J.; SIMPSON, W.T.; HOLMES, B.F.; YOUNG, J.; ELLIS, S.H. - Bioavailability of atenolol formulations. **Biopharmaceutics and Drug Disposition** 1: 323-332, 1980.
- MCAREAVY, D.; LATHAM, L.; LORIMER, A. R. - The combined drug trial: a comparison of antihypertensive agents added to treatment when blood pressure is uncontrolled by beta-blocker and thiazide. **First European Meeting on Hypertension**, Milan, 1983.
- MILLER, L.G. & GREENBLATT, D.J. - Determination of atenolol in plasma by high-performance liquid chromatography with application to single-dose pharmacokinetics. **J Chromatogr** 381:201-204, 1986.
- MILLER, R.B. - A validated high-performance liquid chromatography method for the determination of atenolol in whole blood. **J Pharm Biomed Anal** 9: 849-853, 1991.
- MILLER, R.B. & GUERTIN, Y. - High Performance liquid Chromatography assay for the derivatized enantiomers of atenolol in whole blood. **J Liq Chromatogr** 15: 1289-1302, 1992.
- MORRIS, R.G.; SACCOIA, N.C.; SALLUSTIO, B.C.; ZACEST, R. - Improved high-performance liquid chromatography assay for atenolol in plasma and urine using fluorescence detection. **Ther Drug Monit** 13: 345-349, 1991.

- MUSCARÁ, M.N. & DE NUCCI, G. - Comparative bioavailability of single doses of tablet formulations of cetirizine dihydrochloride in healthy male volunteers. **Int J Clin Pharmacol Ther** 33: 27-31, 1995.
- NEIL-DWYER, G.; BARTLETT, J.; MCAINSH, J.; CRUICKSHANK, J.M. - Beta-adrenoceptor blockers and the blood brain barrier. **Br J Clin Pharmacol** 11: 549-553, 1981.
- PETRIE, J.C.; GALLOWAY, D.B.; WEBSTER, J.; SIMPSON, W.T.; LEWIS, J.A. - Atenolol and bendrofluazide in hypertension. **Br Med J** 4: 133-135, 1975.
- PRICHARD, B.N.C.; BATTERSBY, L.A.; CRUICKSHANK, J.M. - Overdosage with beta-adrenergic blocking agents. Adverse Drug Reactions and Acute Poisoning **Reviews** 3: 91-111, 1984.
- PRICHARD, B.N. - Beta-blockage therapy and cardiovascular disease. Past, present, and future. **Postgrad-Med** 29: 8-18, 1988.
- RAMSDALE, D.R.; FARAGHER, E.B.; BENNET, D.H. - Ischemic pain relief in patients with acute myocardial infarction by intravenous atenolol. **Am Heart J** 103: 459-467, 1982.
- RANEM, J.; & JOUPPILA, P. - Uterine and fetal hemodynamics and fetal cardiac function after atenolol and pindolol infusion. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 62: 195-201, 1995.
- RASMUSSEN, S.; ARNUNG, K.; ESKIDSEN, P.C.; NIELSEN, P.E. - A comparative study of atenolol and metoprolol in the treatment of hypertension. **Br J Clin Pharmacol** 12: 887-891, 1981.
- REEVES, P.R.; MCAINSH, J.; MCINTOSH, D.A.; WINROW, M.J. - Metabolism of atenolol in man. **Xenobiotica** 8: 313- 320, 1978.

- ROBERTSON, J.I.S.; KAPLAN, N.M.; CALDWELL, A.D.S.; SPEIGHT, T.M. (eds) - Symposium on beta-blockers in the 1980s. Focus on atenolol. **Drugs** 25 (suppl 2), 1983.
- ROSSI, P.R.F.; YUSUF, S.;RAMSDALE, D.;FURZE, L.; SLEIGHT, P. - Reduction of ventricular arrhythmias by early intravenous atenolol in suspected acute myocardial infarction. **Br Med J** 286: 506-510, 1983.
- ROSSNER, S. & WEINER, L.; - A comparison of the effects of atenolol and metoprolol on serum lipoproteins. **Drugs** 25: 322-325, 1983.
- ROSTOCK, G.; VOGEL, I.; STULICH, M.; GUNZEL, R. -.Bioequivalence of a new atenolol formulation. **Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol** 30:482-483, 1992.
- ROY, P.; DAY, L.; SOWTON, E. - Effect of new B adrenergic blocking agent, atenolol (Tenormin) on pain frequency, trinitrin consumption and exercise ability. **Br Med J** 3:195-197, 1975.
- RUBIN, P.C.; BUTTERS, L.; CLARK, D.M. - Obstetric aspects of the use in pregnancy-associated hypertension of the beta-adrenoceptor antagonist atenolol. **Am J Obstet Gynecol** 148: 389-392, 1984.
- RUBIN, P.C.; BUTTERS, L.; CLARK, D.M. -. Placebo-controlled trial of atenolol in treatment of pregnancy associated hypertension. **Lancet** 1: 431-434, 1983.
- RYAN, J.R.; LACORTE, W.; JAIN, A.; MCMAHON, F.G. - Response of diabetics treated with atenolol in propranolol to insulin- induced hypoglycaemia. **Drugs** 25: 256-257, 1983.
- SALMONSON, T. Current practice of BA/BE requirements for immediate release products in the EU. Abstract from "Bio International: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics," **Internacional Conference of F.I.P. "Bio-Internacional 96"**, Tokyo, Japan, april 22-24, pp 16-19, 1996.

- SCOTT, A.K.; RIGGBY, J.W.; WEBSTER, J.; HAWKSWORTH, J.M.; PETRIE, J.C.; LOVELL, H.G. - Atenolol and metoprolol once daily in hypertension. **Br Med J** **284**: 1514-1516, 1982.
- SHAND, D.G. - Pharmacokinetic properties of the beta- adrenergic receptor blocking drugs. **Drugs** **7**: 39-47, 1974.
- SHEN, J.; WANWIMOLRUK, S.; HUNG, C.T.; ZOEST, A.R. Quantitative analysis of β -blockers in human plasma by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography using a microbore column. **J Liq Chromatogr** **14**: 77-793, 1991.
- STOSCHITZKY, K.; EGGINGER, G.; ZERNIG, G.; KLEIN, W.; LINDNER, W. Stereoselective features of (R)-and (S)-atenolol: Clinical pharmacological, pharmacokinetic and radioligand binding studies. **Chirality** **5**: 15-19, 1993.
- TERRY, S. & TEITELBAUM, Z. A liquid chromatographic method for determination of atenolol in human plasma. **J Liq Chromatogr** **14**: 3735-3744, 1991.
- THORLEY, K.J.; MCAINSH, J.; CRUIKSHANK, J.M. - Atenolol in the treatment of pregnancy-induced hypertension. **Br J Clin Pharmacol** **12**: 725-730.
- TOOTHAKER, R.D. & WELLING, P.G. - The effect of food on drug bioavailability. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol** **20**: 173-199, 1980.
- TRIGGLE, D.J. Chiral drugs and their effect on the pharmaceutical industry. **Pharmaceutical New** **2**: 19-21, 1995.
- WADSWORTH, A.N.; MURDOCH, D.; BROGDEN, R.N. - Atenolol reappraisal of its properties and therapeutic uses in disorders cardiovascular. **Drugs** **42**: 468-510, 1991.
- WALKER, P.R.; MARSHALL, A.J.; BARRIT, D.W.; FAR, S.; BAUMINGER, B.; WALLTERS, G. - Abrupt withdrawal of atenolol in severe angina pectoris. Comparison with the effects of treatment. **Br Heart J** **53**: 276-282, 1985.

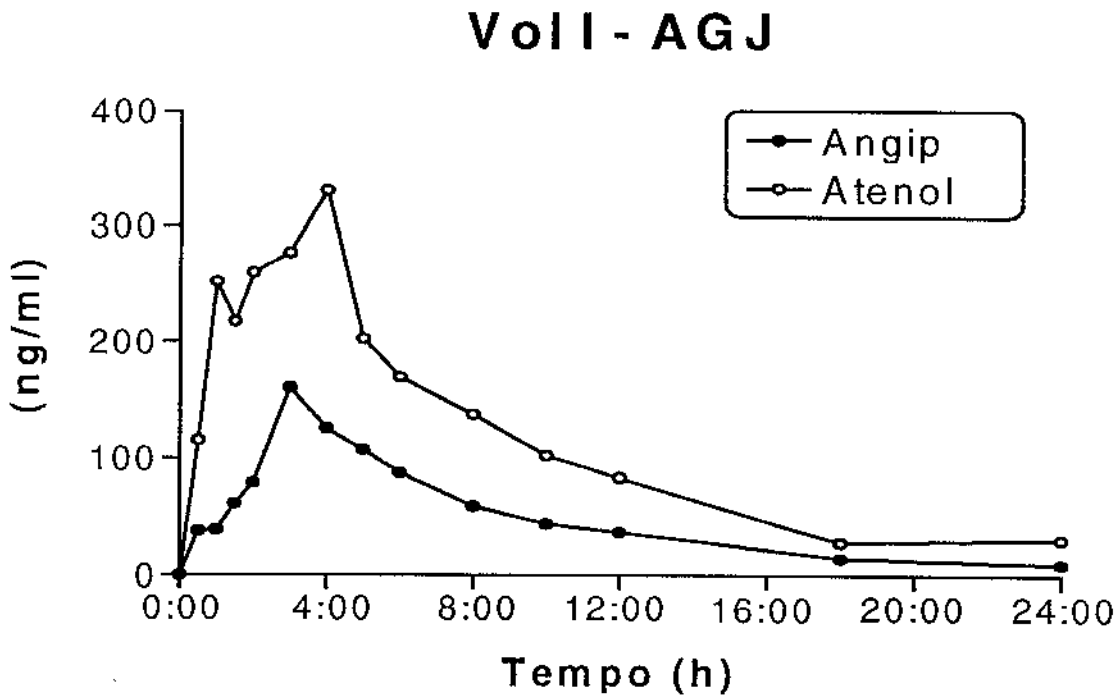
- WARREN, D.J.; WALLER, D.G.; MCAINSH, J. - Beta-blockers and renal function **Drugs** **25**: 108-112, 1983.
- WEBSTER, J.; JEFFERS, T. A.; GALLOWAY, D. B.; PETRIE, J. C.; BARKER, N. P. - Atenolol, methyldopa and chlorthalidone in moderate hypertension. **Br Med J** **1**: 76-78, 1977
- WESTERLUND, A. - Central Nervous System side effects with hydrophilic and lipophilic beta-blockers. **Eur J Clin Pharmacol** **8**: 73-76, 1985
- WILSON, C.G. & WASHINGTON, N. - Physiological Pharmaceutics-Biological Barriers to Drug Absorption. In: Small intestine: transit and absorption of drugs. England, Ellis Horwood Limited, 1989. p69-90.
- YEE, Y.G.; RUBEN, P.; BLASCHKE, T.F. Atenolol determination by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **J Chromatogr** **171**: 357-362, 1979.
- YUSUF, S.; SLEIGHT, P.; ROSSI, P. - Reduction in infarct size, arrhythmias and chest pain by early intravenous beta-blockade in suspected acute myocardial infarction. **Circulation** **67**: 132-141, 1983.
- ZACHARIAS, F.J. & COWAN, K.J. - Comparison of propranolol and atenolol in hypertension. **Postgrad Med J** **53** (suppl 3): 111, 1977.
- ZACHARIAS, F.J. & CRUIKSHANK, J.M. - Treating the elderly hypertensive, **Acta Ther** **5**: 179-192., 1979.

Bibliografia Consultada

- BERMUDEZ, J.; Remédio: Saúde ou indústria? A produção de medicamentos no Brasil. Dumará, Brasil, 1992 122p.
- CÁRCAMO, E. C. Introduccion a la farmacocinetica, Washington, The general secretariat of the organization of American States, 1982.
- SHARGEL, L. & ANDRECO, Y. B. C. Bioavailability and bioequivalence. In:____ Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics, 3 ed., USA, Appleton & Lange, 1992, p.193 - 223,
- SILVA P., Adrenérgicos e Antiadrenérgicos. In: MIZIARA, J.L. -**Farmacologia** 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994, p.232 - 255.
- RANG H.P., RITTER, J.M.; DALE M.M. Pharmacology Churchill Livingstone, London 3 ed. 1995. 855p.
- ROWLAND, M. & TOZER, T.N. Variability. In: ____Clinical Pharmacokinetics: Conceptos and Applications, 1 ed, USA, Lea & Febiger, , 1989, p.197 - 276.

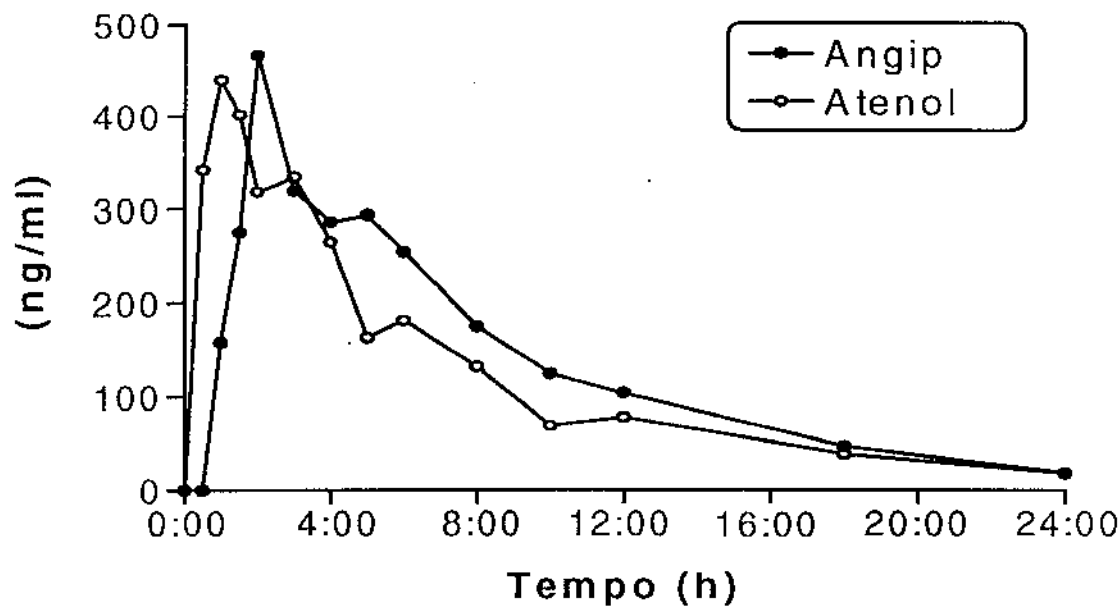
ANEXO I

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



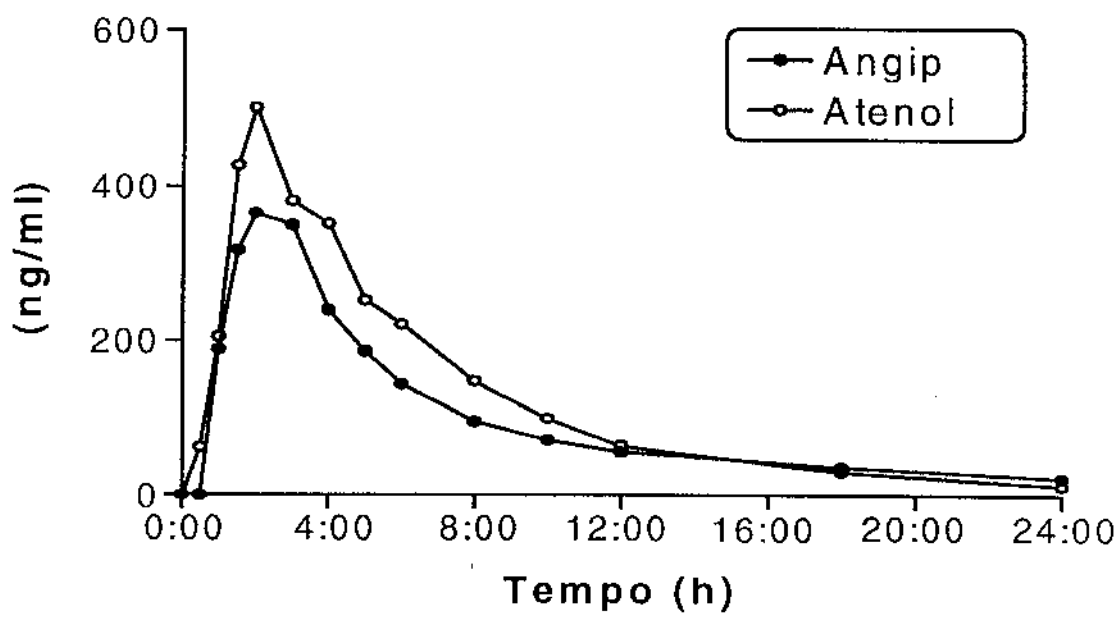
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]}$ (ng/ml h)	1128	2618
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng/ml h)	1197	2824
C_{max} (ng/ml)	160	331
t_{max} (h)	3	4
K_e	0,150	0,150
$t_{1/2}$	4,6	4,6
C_{max}/AUC (h)	0,1339	0,117

Vol II - AQC



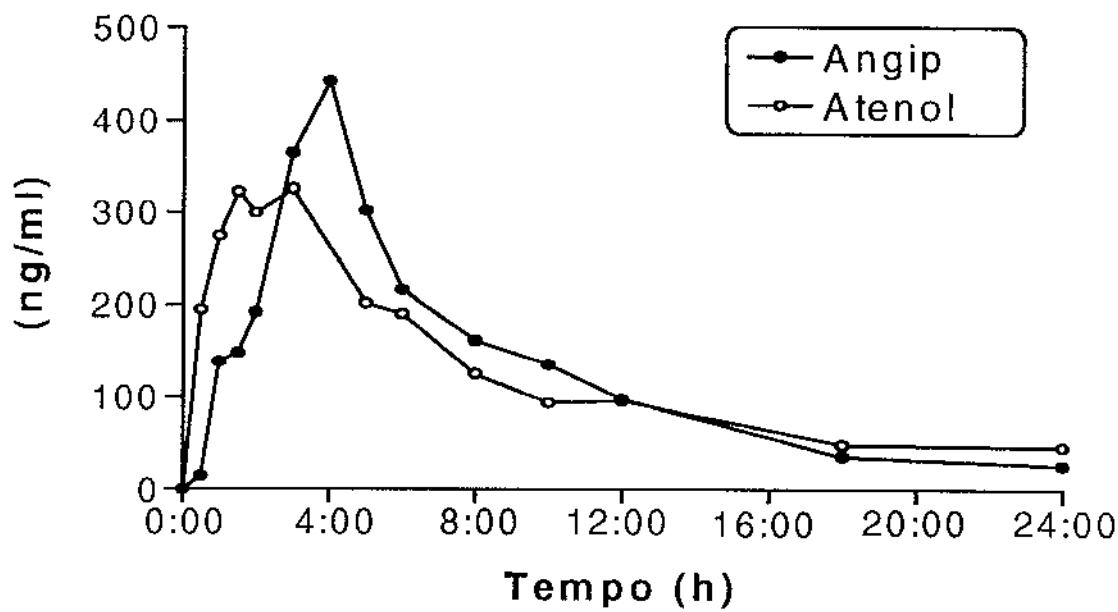
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]} \text{ (ng/ml h)}$	3206	2867
$AUC_{[0-\infty]} \text{ (ng/ml h)}$	3347	2824
$C_{max} \text{ (ng/ml)}$	467	440
$t_{max} \text{ (h)}$	2,0	1,0
K_e	0,135	0,141
$t_{1/2}$	5,1	4,9
$C_{max}/AUC \text{ (h)}$	0,1396	0,1468

Vol III - DRR



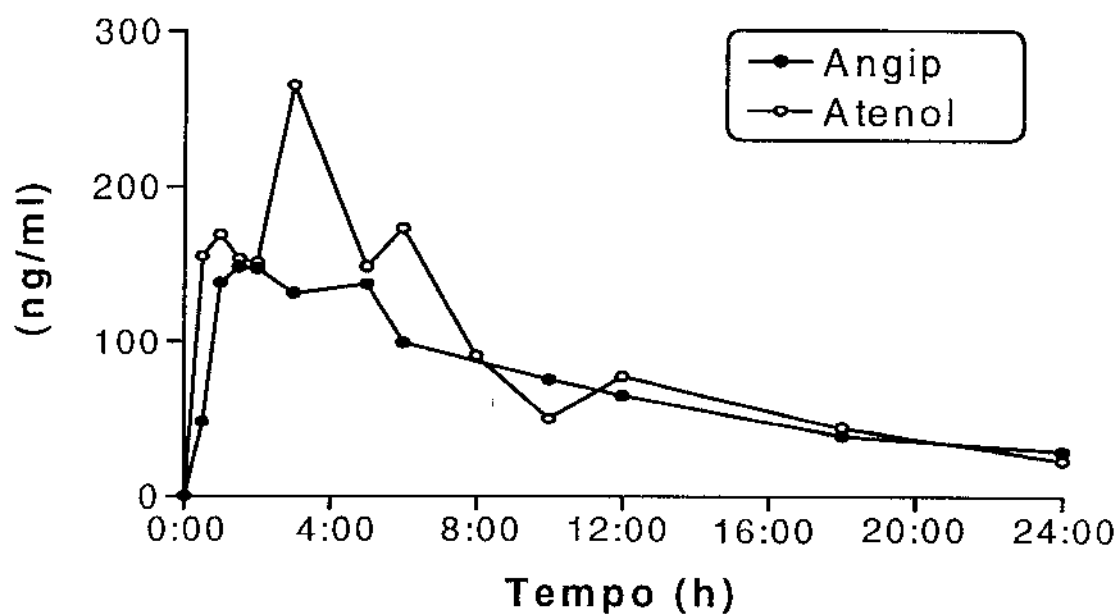
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]}$ (ng/ml h)	2347	2996
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng/ml h)	2485	3131
C_{max} (ng/ml)	364	501
t_{max} (h)	2,0	2,0
K_e	0,158	0,087
$t_{1/2}$	4,4	8,0
C_{max}/AUC (h)	0,1467	0,1600

Vol IV - JDM



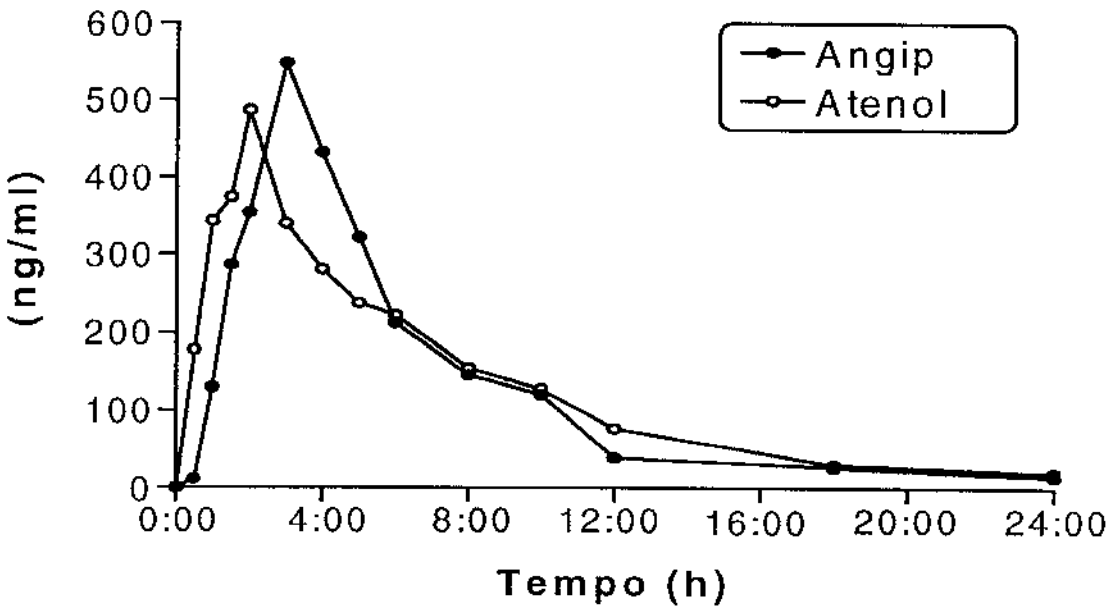
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]}$ (ng/ml h)	3009	2952
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng/ml h)	3180	3255
C_{max} (ng/ml)	442	325
t_{max} (h)	4,0	3,0
K_e	0,159	0,155
$t_{1/2}$	4,4	4,5
C_{min}/AUC (h)	0,1389	0,0999

Vol V - JMM



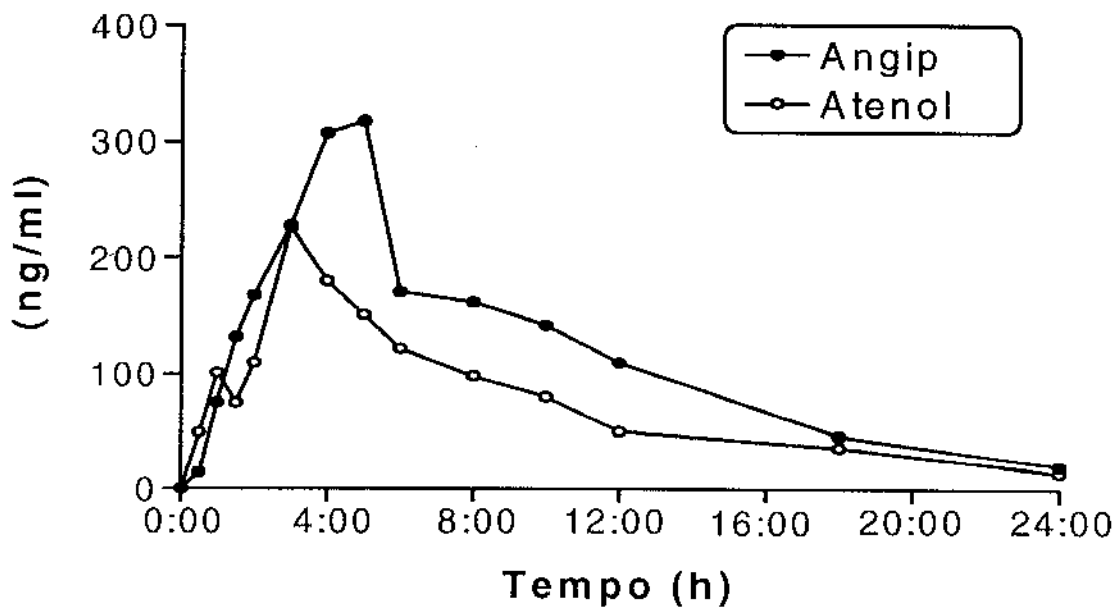
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]}$ (ng/ml h)	1731	2155
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng/ml h)	2025	2352
C_{max} (ng/ml)	148	440
t_{max} (h)	1,5	3,0
K_e	0,099	0,117
$t_{1/2}$	7,0	5,9
C_{max}/AUC (h)	0,0730	0,1127

Vol VI - MRD



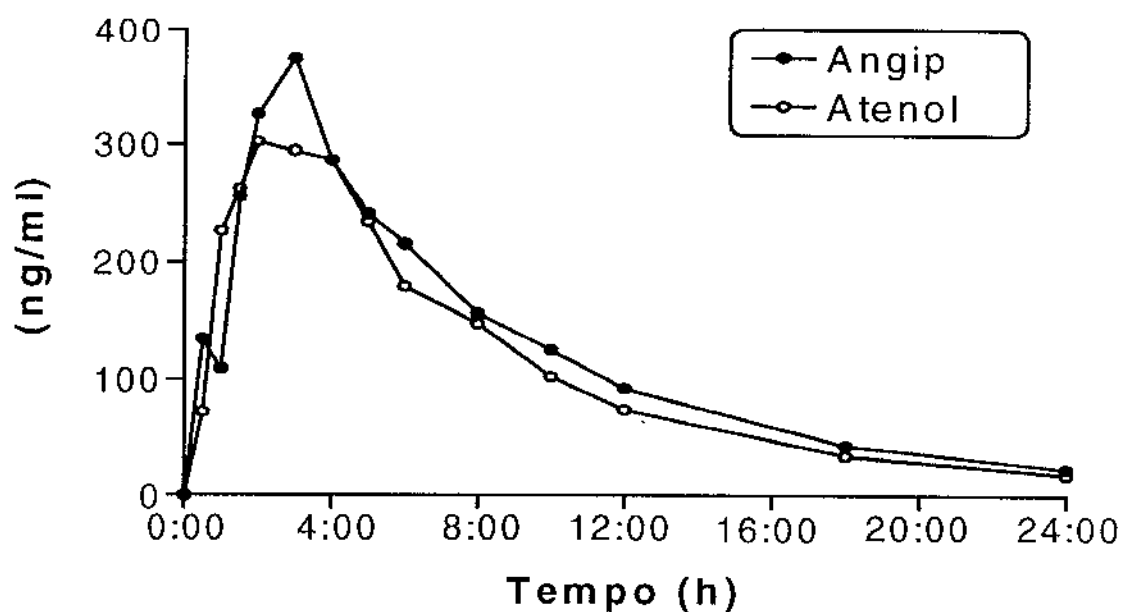
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]}$ (ng/ml h)	2990	3114
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng/ml h)	3083	3240
C_{max} (ng/ml)	547	486
t_{max} (h)	3,0	2,0
K_e	0,160	0,159
$t_{1/2}$	4,3	4,4
C_{max}/AUC (h)	0,1775	0,1502

Vol VII - NEP



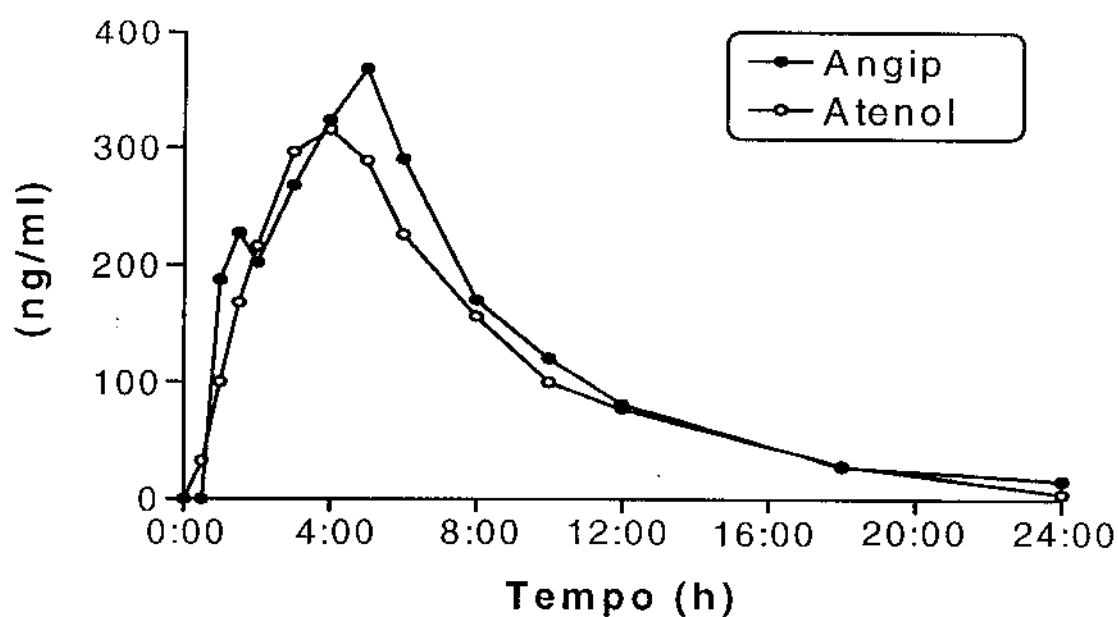
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]} \text{ (ng/ml h)}$	2729	1751
$AUC_{[0-\infty]} \text{ (ng/ml h)}$	2891	1854
$C_{max} \text{ (ng/ml)}$	317	226
$t_{max} \text{ (h)}$	5,0	3,0
K_e	0,209	0,139
$t_{1/2}$	5,5	5,0
$C_{max}/AUC \text{ (h)}$	0,1097	0,1219

Vol VIII - SRC



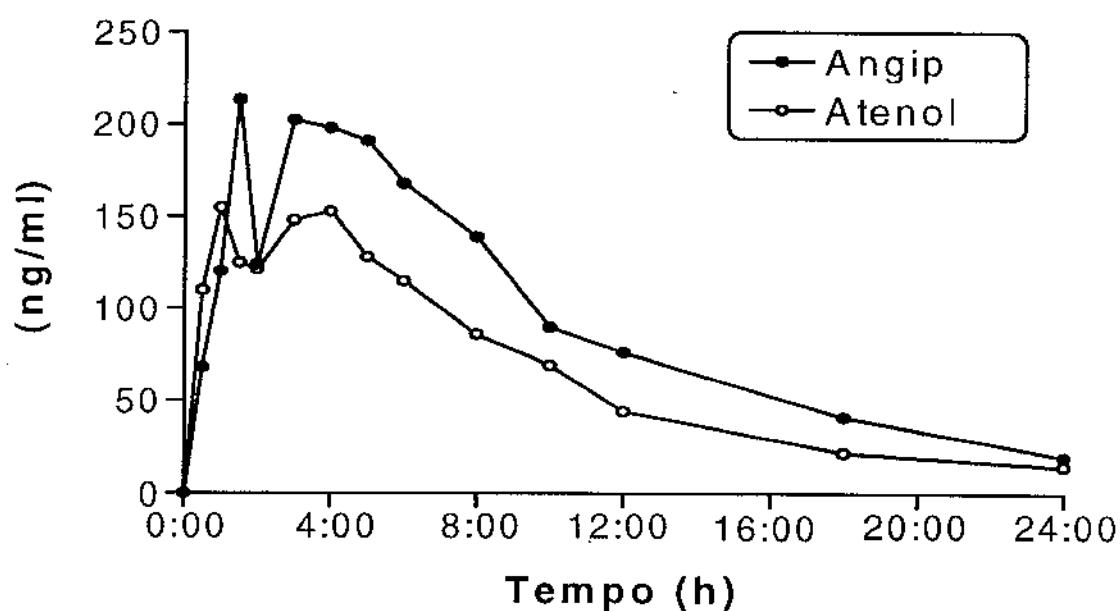
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]}$ (ng/ml h)	2974	2640
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng/ml h)	3149	2781
C_{max} (ng/ml)	374	302
t_{max} (h)	3,0	2,0
K_e	0,134	0,125
$t_{1/2}$	5,2	5,5
C_{max}/AUC (h)	0,1186	0,1086

Vol IX - LSC



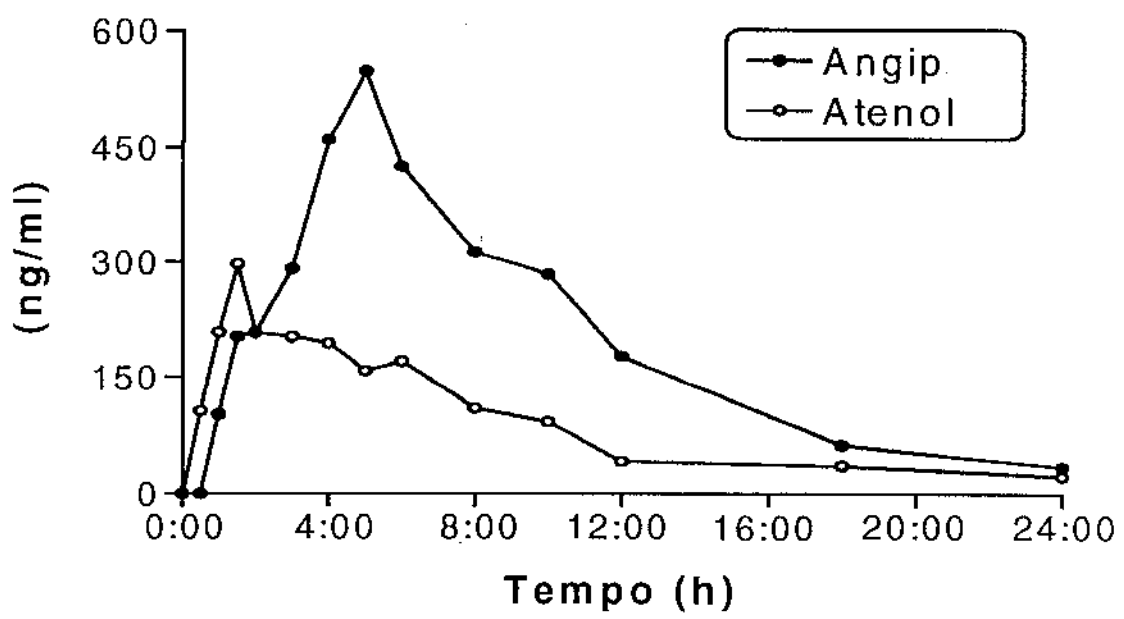
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]}$ (ng/ml h)	2866	2553
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng/ml h)	2944	2584
C_{max} (ng/ml)	367	315
t_{max} (h)	5,0	4,0
K_e	0,209	0,159
$t_{1/2}$	3,3	4,4
C_{max}/AUC (h)	0,1245	0,1218

Vol X - CAS



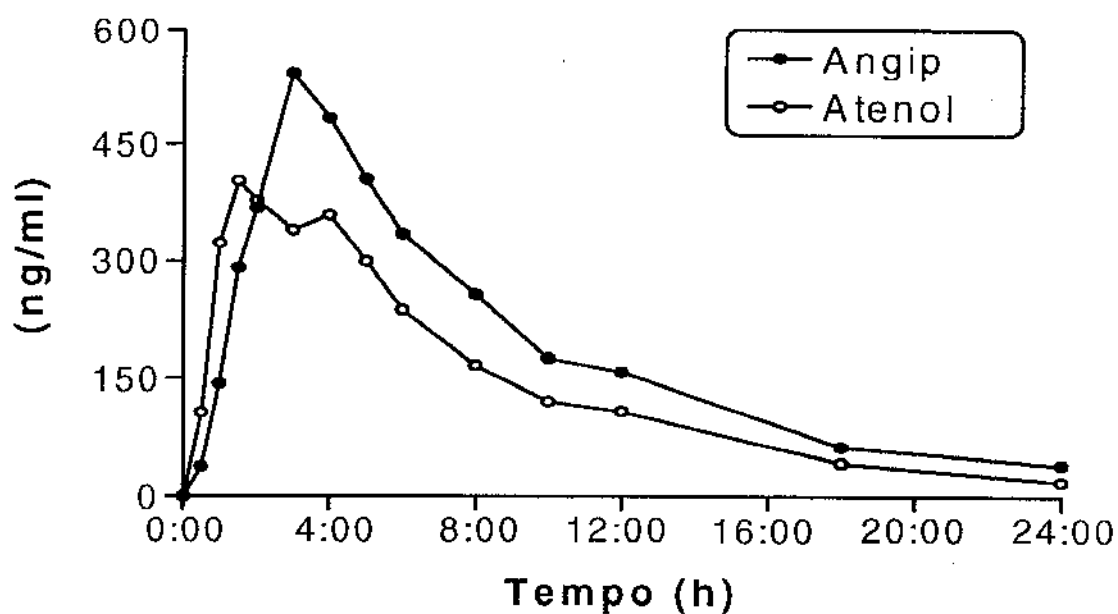
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]} \text{ (ng/ml h)}$	2209	1549
$AUC_{[0-\infty]} \text{ (ng/ml h)}$	2378	1668
$C_{max} \text{ (ng/ml)}$	213	155
$t_{max} \text{ (h)}$	1,5	1,0
K_e	0,120	0,128
$t_{1/2}$	5,8	5,4
$C_{max}/AUC \text{ (h)}$	0,0896	0,0929

Vol XI - DRC



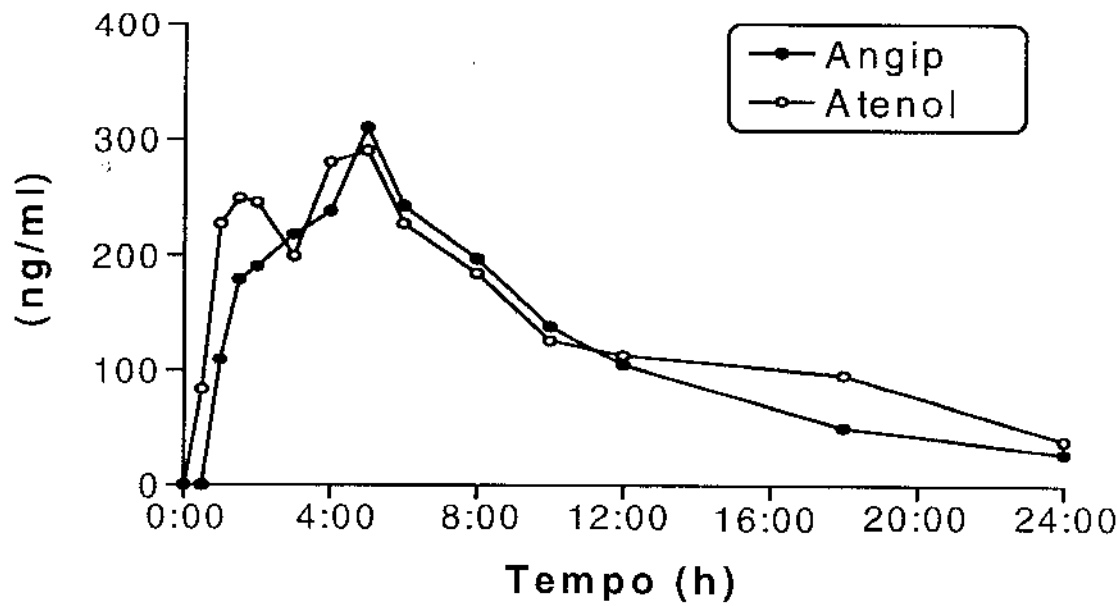
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]} \text{ (ng/ml h)}$	4608	2109
$AUC_{[0-\infty]} \text{ (ng/ml h)}$	4900	2259
$C_{\max} \text{ (ng/ml)}$	548	296
$t_{\max} \text{ (h)}$	5,0	1,5
K_e	0,116	0,149
$t_{1/2}$	6,0	4,7
$C_{\max}/AUC \text{ (h)}$	0,1119	0,1312

Vol XII - PBD



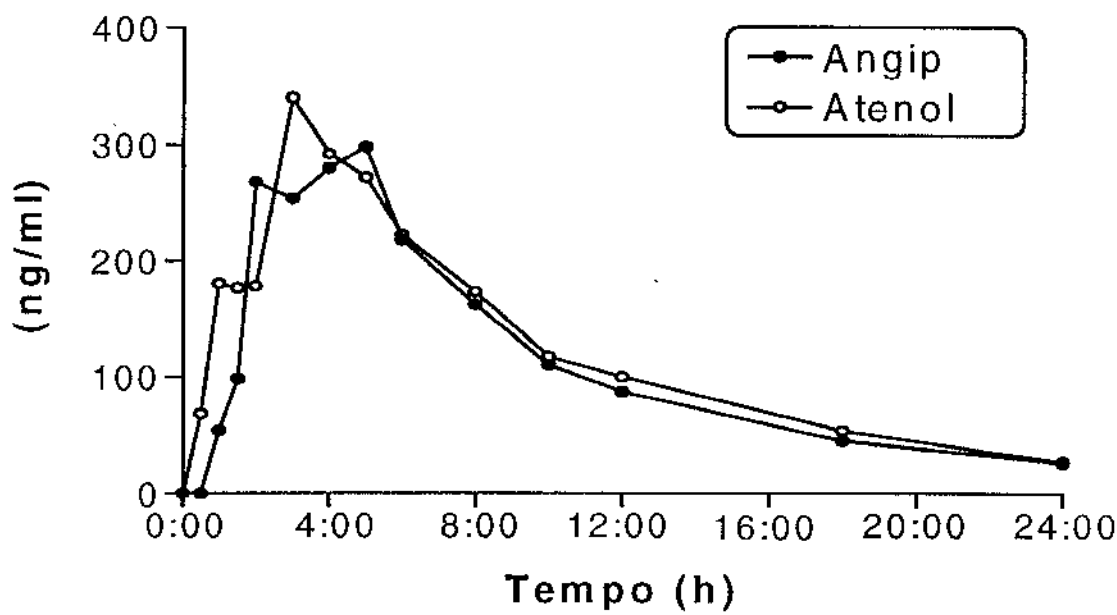
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]}$ (ng/ml h)	4439	3362
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng/ml h)	4716	3511
C_{max} (ng/ml)	542	402
t_{max} (h)	3,0	1,5
K_e	0,145	0,128
$t_{1/2}$	4,8	5,4
C_{max}/AUC (h)	0,1150	0,1145

Vol XIII - MCM



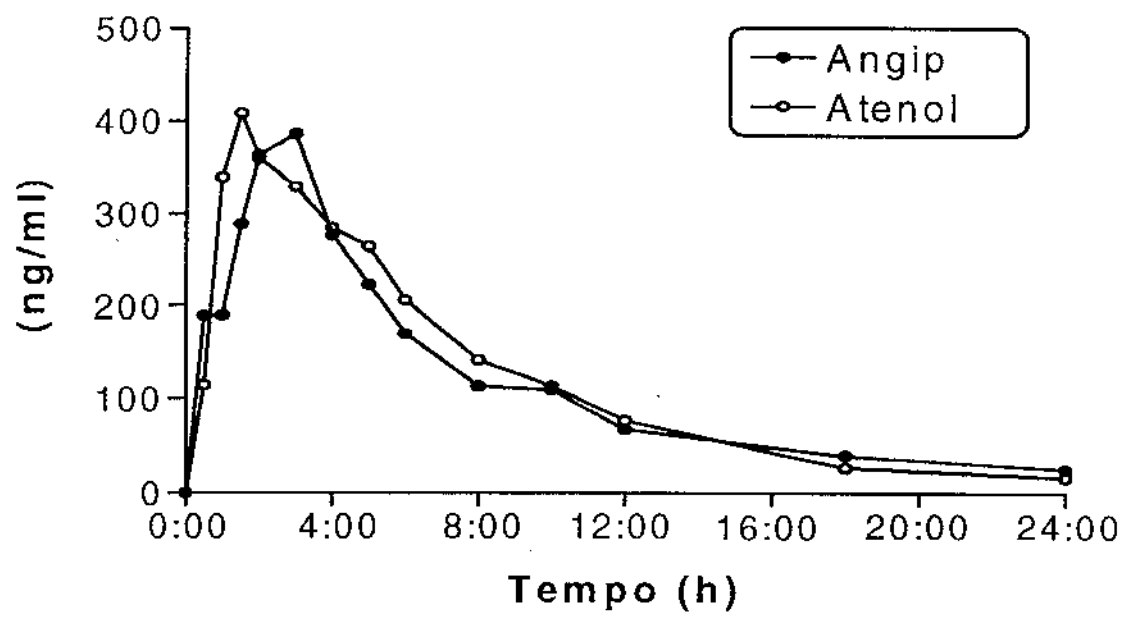
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]}$ (ng/ml h)	2889	338
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng/ml h)	3169	3613
C_{max} (ng/ml)	3110	290
t_{max} (h)	5,0	5,0
K_e	0,101	0,142
$t_{1/2}$	6,8	4,9
C_{max}/AUC (h)	0,0978	0,0803

Vol XIV - RLS



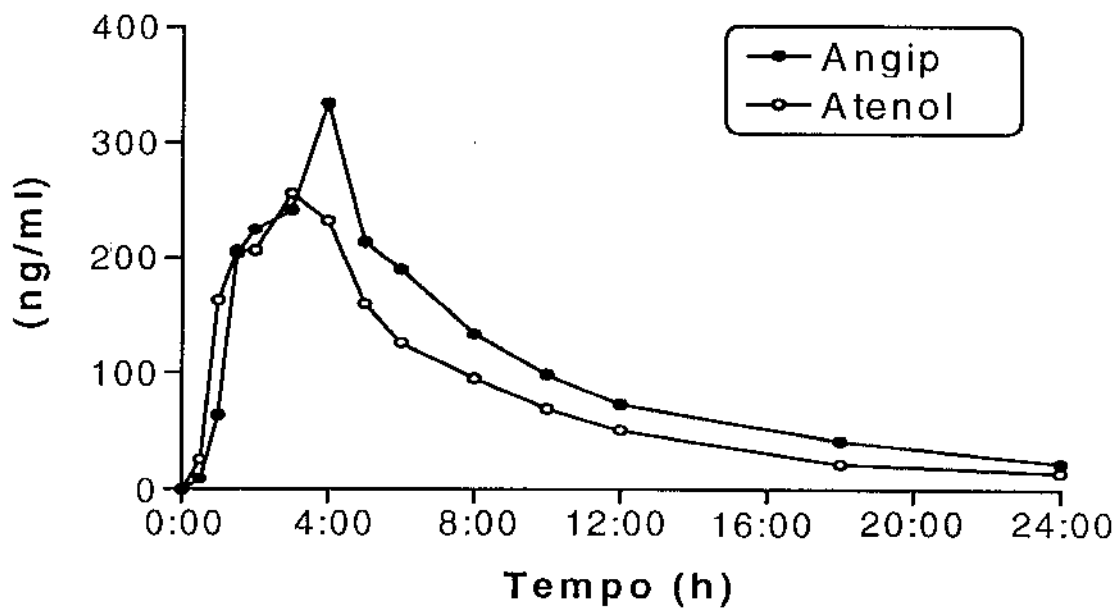
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]}$ (ng/ml h)	2679	2971
$AUC_{[0-\infty]}$ (ng/ml h)	2867	3206
C_{max} (ng/ml)	298	340
t_{max} (h)	5,0	3,0
K_e	0,140	0,117
$t_{1/2}$	5,0	5,9
C_{max}/AUC (h)	0,1040	0,1061

Vol XV - RACS



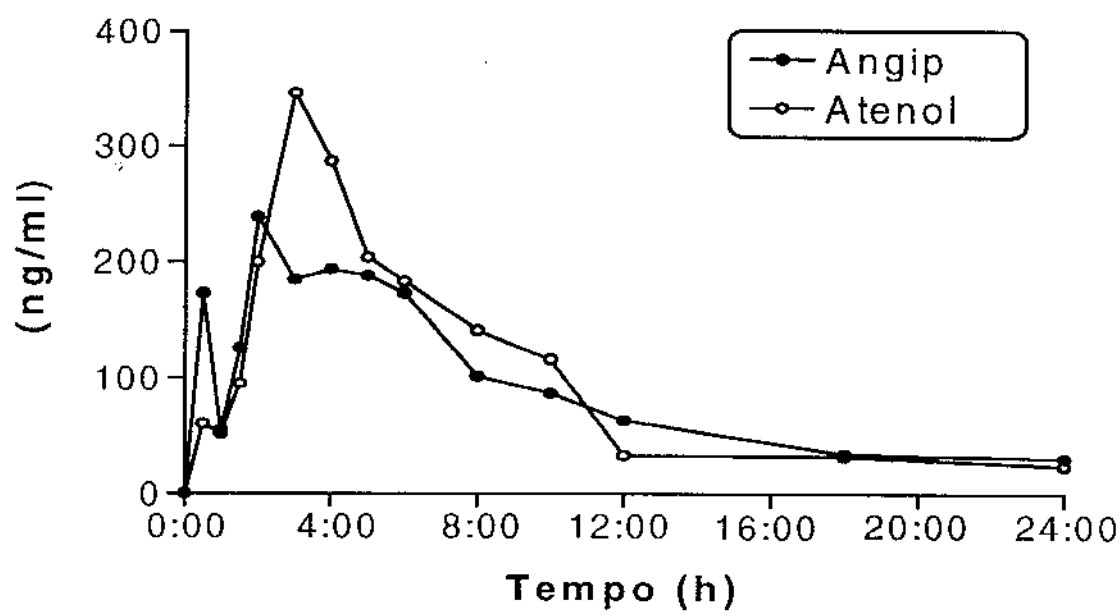
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]} \text{ (ng/ml h)}$	2776	2914
$AUC_{[0-\infty]} \text{ (ng/ml h)}$	2945	3057
$C_{max} \text{ (ng/ml)}$	386	408
$t_{max} \text{ (h)}$	3,0	1,5
K_e	0,150	0,119
$t_{1/2}$	4,6	5,8
$C_{max}/AUC \text{ (h)}$	0,1311	0,1334

Vol XVI - RRC



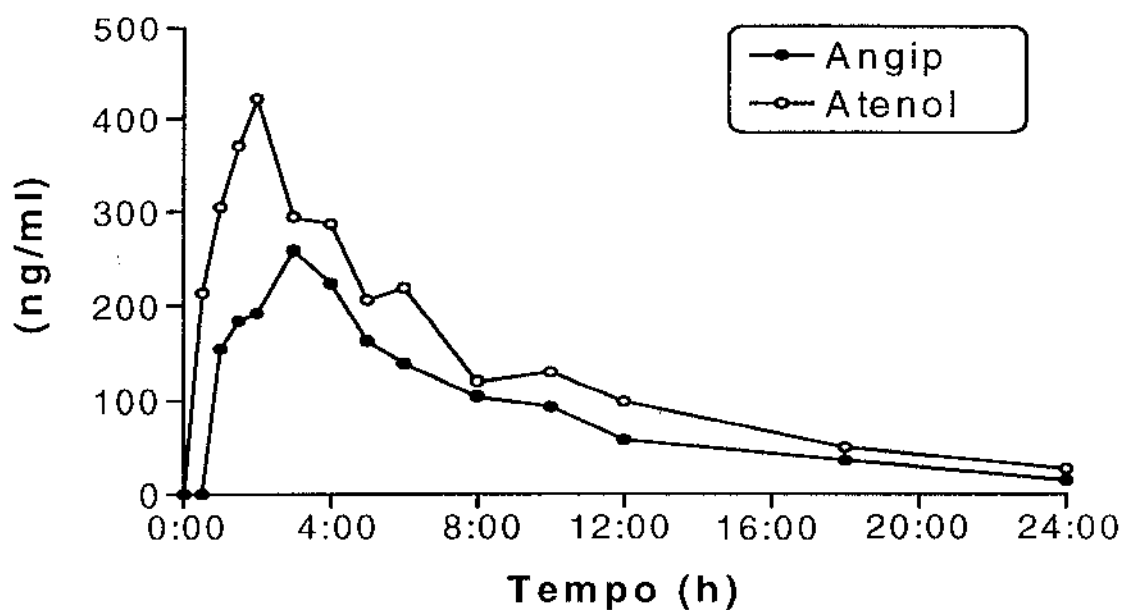
	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]} \text{ (ng/ml h)}$	2450	1891
$AUC_{[0-\infty]} \text{ (ng/ml h)}$	2605	1983
$C_{\text{max}} \text{ (ng/ml)}$	333	255
$t_{\text{max}} \text{ (h)}$	4,0	3,0
K_e	0,150	0,161
$t_{1/2}$	4,6	4,3
$C_{\text{max}}/AUC \text{ (h)}$	0,1278	0,1288

Vol XVII - WRC



	ANGIPRESS	ATENOL
$AUC_{[0-24]} \text{ (ng/ml h)}$	2099	2265
$AUC_{[0-\infty]} \text{ (ng/ml h)}$	2361	2447
$C_{max} \text{ (ng/ml)}$	238	345
$t_{max} \text{ (h)}$	2,0	3,0
K_e	0,117	0,133
$t_{1/2}$	5,9	5,2
$C_{max}/AUC \text{ (h)}$	0,1008	0,1410

Vol XVIII - ECN



	ANGIPRESS	ATENOL
AUC _[0-24] (ng/ml h)	2055	3149
AUC _[0-∞] (ng/ml h)	2177	3364
C _{max} (ng/ml)	258	421
t _{max} (h)	3,0	2,0
K _e	0,127	0,126
t _{1/2}	5,5	5,5
C _{max} /AUC (h)	0,1185	0,1250

ANEXO II

- *Manuscrito submetido para publicação.*
- *Modelo de Termo de Consentimento Esclarecido.*
- *Parecer do Comitê de Ética.*

To Prof Dr G. Hitzenberger
Editor-in-Chief
International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics
Gesellschaft für Klinische Pharmakologie
Kinderspitalgasse 10/16
A-1090 Vienna / Austria

Campinas, 10 April 1997

Dear Prof Hitzenberg,

Please find enclosed three copies of the manuscript entitled **“Comparative bioavailability of two atenolol tablet formulations in healthy male volunteers after a single dose administration”**, by Martins *et al.*, together with a copy of the manuscript on diskette (file: **atenol.doc**; Word for Windows version 6.0).

We would like to submit this manuscript for publication in the *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*.

It is worth mentioning that this manuscript has been written in accordance with the directions of the Editorial Board of the Journal for papers reporting bioequivalence studies, which have been recently stated in the article “To reject or not to reject - recent experience with bioequivalence papers”, by Hitzenberg and Steinijans.

I hope you find the manuscript suitable for publication.

I look forward to hear from you in due course.

Yours sincerely

Marcelo Nicolás Muscará, PhD.
Department of Clinical Medicine,
Faculty of Medical Sciences, University São Francisco,
Av. São Francisco de Assis, 218
Bragança Paulista, 12900-000, SP, Brazil.
fax: 55-19-2313947

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

M. L. Martins¹, M. A. Pierossi¹, L. A. Moraes¹, W. Ribeiro¹, E. Abbib Jr.¹, G. B. Mendes¹, A. Poli², G. de Nucci¹ & M. N. Muscará³.

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

Author for correspondence:

Gilberto de Nucci, MD, PhD.

Av. Jesuino M. Machado, 415

Campinas, 13092-320, SP, Brazil.

fax: 55-19-2521516

e-mail: denucci@.dglnet.com.br

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

Key Words: atenolol - bioavailability - human pharmacokinetics- high-performance liquid chromatography.

INTRODUCTION

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

It is commercially available as a racemic mixture [(R,S) or rac-atenolol], being the (-)S-form the active isomer, with no significant pharmacological activity reported for the (+)R-enantiomer [Egginger et al, 1993].

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

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

METHODS

Clinical protocol

Eighteen healthy male volunteers aged between 20 and 42 years (mean $\pm$ S.E.M.: 29 ± 1 yr), height between 162 and 189 cm (177 ± 2 cm), weighing between 55.6 and 99.0 kg (76 ± 3 kg) and within 15% of the ideal body weight, were selected for the study. All subjects gave written informed consent, and the clinical protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital.

The volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal, and haematological diseases, as assessed by physical and psychiatric examination, ECG, and the following laboratory tests: blood glucose, urea, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase, gamma GT, total bilirubin, sodium, potassium, uric acid, chloride, haemoglobin, hematocrit, total and differential white cell counts, erythrocyte sedimentation rate and routine urinalysis.

The study was conducted in an open randomized two period crossover fashion with a fourteen day washout period between doses. During each period, the volunteers were hospitalized at 11:00 p.m. having already had a normal evening meal, and after an overnight fast they received at 7:00 a.m. a single 50 mg atenolol dose of each of the formulations: Angipress tablets (lot N° 94102701, expiration date: 10/99; test formulation from Laboratórios Biosintética, Brazil) or Atenol tablets (lot N° 48894, expiration date: 08/98; reference formulation from Wellcome ICI Laboratory, Brazil) along with 200 ml of tap water. They were then fasted for 4 h following the drug administration, after which a standard lunch was consumed and an evening meal was provided 10 h after dosing. No other food was permitted during the "in-house" period. Liquid consumption was permitted *ad libitum* after lunch but xanthine containing drinks including tea, coffee and cola were avoided.

Drug Analysis

Blood samples (10 ml) from a suitable antecubital vein were collected into EDTA containing tubes before and 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, and 24 h after the administration of

each atenolol formulation. The blood samples were centrifuged at 2,000 g for 10 min at room temperature and the plasma decanted and stored at -20°C until assayed for their atenolol content. All samples from a single volunteer were analyzed on the same day in order to avoid inter-assay variations. Plasma atenolol concentrations were measured by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, using the method described below.

To 1 ml of plasma (calibration curve and volunteer samples), were successively added 100 µl of the internal standard (8 µg/ml metoprolol in 50:50 methanol:water solution) and 400 µl of 0.25 M sodium hydroxide solution. After a brief vortex mixing, 7 ml of a 50% (v/v) n-butanol / cyclohexane mixture were added and the extraction of the compounds of interest was performed by vortex mixing during 3 min. The tubes were then centrifuged at 2,000 g for 10 min, and the organic phase transferred to another set of clean tubes to be back-extracted with 500 µl of 0.1 M hydrochloric acid (vortex mixing during 2 min). The tubes were then centrifuged (2,000 g during 1 min), the organic layer was discarded and the aqueous phase was transferred to a clean tube to be evaporated to dryness in a water-bath at 37°C under a gentle stream of N₂. The residue was dissolved with 100 µl of mobile phase, and a 50 µl aliquot was injected into the liquid chromatograph.

Chromatographic Conditions

The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile / methanol / 0.02 M sodium phosphate buffer containing 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS): 35:15:50 (v/v), respectively. The mobile phase was pumped at 1 ml/min through a C₁₈ µ-Bondapak column (5 µ, 3.9 x 300 mm i.d.; Millipore-Waters, USA) at room temperature. Peaks were monitored by fluorescence with excitation and emission wavelengths set at 240 and 300 nm, respectively.

The chromatographic system consisted of a Waters 510 HPLC pump (Millipore-Waters, USA) with external pulse dampener (Supelco, USA) coupled to a Shimadzu RF 535 fluorescence monitor (Shimadzu, Japan), with the output signal recorded on a Bryans 28000 chart recorder (Bryan Southern Instruments, UK).

Pharmacokinetic and statistical analysis

The first-order terminal elimination rate constant (k_e) was estimated by linear regression from the points describing the elimination phase on a log-linear plot. Half-life ($t_{1/2}$) was derived from this rate constant ($t_{1/2} = \ln(2) / k_e$). The maximum observed plasma concentration (C_{max}) and the time taken to achieve this concentration (t_{max}) were obtained directly from the curves. The areas under the atenolol plasma concentration vs time curves from 0 to 24 h ($AUC_{[0-24]}$) were calculated by applying the linear trapezoidal rule. Extrapolation of these areas to infinity (AUC) was done by adding the value C_{24} / k_e to the calculated $AUC_{[0-24]}$ (where C_{24} = plasma concentration calculated from the log-linear regression equation obtained for the estimation of k_e 24 h after dose).

Bioequivalence between both formulations was assessed by calculating individual C_{max} , $AUC_{[0-24]}$, AUC, $t_{1/2}$, k_e and C_{max}/AUC ratios (test / reference) and t_{max} differences (test - reference) together with their mean and 90% confidence intervals (CI). The inclusion of the 90% CI for the ratios into the 80 - 125% range, and that of the zero value into the 90% CI for the differences were analyzed by using either parametric (ANOVA for untransformed and log-transformed data) and non parametric (Wilcoxon rank sum test, according to Hauschke *et al.*, [1990]) methods.

Materials

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

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

RESULTS

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

Figure 1 shows typical chromatograms obtained by the HPLC method described. Retention times were 5.5 and 8 min for atenolol and metoprolol, respectively. Under the described conditions, the lowest quantifiable atenolol plasma concentration was 20 ng/ml (taken as five times the signal / noise ratio value). The calibration curve was linear over the range 20 ng/ml to 1,000 ng/ml, with typical regression coefficients higher than or equal to 0.999, and intercept values not significantly different from zero. Inter-assay variation values (as %CV) were 21.3, 10.5, 9.0, 4.4, 7.6, and 2.2 % for plasma atenolol concentrations of 20, 50, 108, 200, 500 and 1000 ng/ml respectively (number of replicates between 14 and 17 for each concentration). Intra-assay variation was determined by assaying six replicates of atenolol plasma samples of concentration 55, 214, and 1081 ng/ml within the same run, and the coefficients of variation obtained were 6.3, 2.6, and 4.3% respectively.

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

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

Table 2 shows statistical analysis of the individual test / reference ratios of $AUC_{[0-24]}$, AUC, k_e , $t_{1/2}$, C_{max} and C_{max}/AUC , as well as the inclusion of the 90% CI's for the geometric means into the bioequivalence range 80 - 125%. Individual t_{max} differences were statistically

different from zero as showed by the fact that 90% CI for individual test - reference differences did not include the zero value.

DISCUSSION

The HPLC method here described is similar to other previously published methodologies [Yee, 1979, Teitelbaum, 1991] and proved to be simple, fast and reproducible. The retention time of internal standard and the absence of late appearing peaks allowed the analysis of all the samples from a single volunteer within a working-day period.

In our hands, the mixture cyclohexane / n-butanol (50/50; v/v) to extract atenolol and metoprolol from plasma gave the best results when compared with other solvents or mixtures, including heptane, methylene chloride, diethyl ether or methyl-1-butanol. However, due to the high extraction capacity of this solvent mixture, a re-extraction step was necessary. The use of 0.1 M hydrochloric acid proved to be the more appropriate acid to re-extract the compounds of the interest when compared with others (phosphoric, sulphuric or acetic acid). The detection of the peaks of interest by fluorescence after this back extraction step rendered a sufficiently sensitive method (20 ng/ml) to achieve the objectives of the study.

The addition of SDS (an anionic hydrophobic pairing ion) to the mobile phase, resulted in the satisfactory resolution of the atenolol and metoprolol peaks, despite their high similarity in structure and chromatographic behavior. We have already made use of this strategy for the proper separation of cetirizine from its epoxy-derivative P026 [Muscará *et al.*, 1995], and to our knowledge, the only reversed-phase ion-pair HPLC method for the separation of several β -blockers in plasma samples is that described by Shen *et al.*, [1992].

As mentioned above, commercial atenolol comprises the racemic mixture, being the (S)-isomer the pharmacologically active compound. Differently from other β -blockers (as propranolol), where one of the isomers interferes with the pharmacokinetics of the other isomer, this is not the case with atenolol. Egginger *et al.*, [1993] have demonstrated that the pharmacokinetic profile of the active (S)-enantiomer is not different when administered

either alone or as a racemic atenolol mixture. This finding, together with recently published atenolol bioequivalence studies [Irshaid *et al.*, 1996], support the evaluation of bioequivalence based on plasma racemic atenolol concentrations

As shown in Table 1, mean $AUC_{[0-24]}$, AUC, C_{max} , $t_{1/2}$, k_e , C_{max}/AUC and t_{max} values were similar for both formulations, and an important degree of overlapping was observed between their 90% CI for the geometric means. The observed $t_{1/2}$ and t_{max} AUC, C_{max} values are in accordance with those reported by others for this type of pharmaceutical formulation [Clementi *et al.*, 1994; Boyd *et al.*, 1989; Miller and Guertin, 1992; Stoschitzky *et al.*, 1993; Egginger *et al.*, 1993].

Mean $AUC_{[0-24]}$ was approximately 94% of mean AUC for both atenolol formulations, and no volunteer showed any value below the 85% of AUC. This allows the calculation of the relative extent of bioavailability from the $AUC_{[0-24]}$ values, in accordance to the European Union (EU) statements (minimum 80% of total AUC).

Table 2 shows that 90% CI of mean $AUC_{[0-24]}$, AUC, C_{max} , k_e , $t_{1/2}$ and C_{max}/AUC (after the log-transformation of individual ratios) were included into the bioequivalence range, i.e. 80 - 125%, when analyzed by either parametric or non-parametric analysis. Individual t_{max} differences were statistically different from zero as shown by the 90% CI obtained by parametric and non-parametric tests. These results mean that both formulations are clearly bioequivalent for the extent of absorption, as stated by the U.S. Food and Drug Administration authorities [1985, 1993]. However, the results obtained on individual t_{max} differences make that the conclusions on bioequivalence for the rate of absorption should be more thoroughly discussed. Despite C_{max} and t_{max} being considered as indexes of absorption rate, many authors have questioned the usefulness and the limitations of these parameters to decide on a bioequivalence problem, given the effects that the sampling schedule has on them. In this way, Endrenyi *et al.*, [1991] have demonstrated that C_{max} not only reflects the rate, but also the extent of absorption, as evidenced by the high correlation observed with the parameter AUC, and proposed that the ratio C_{max}/AUC should better reflect the absorption rate. In this study, geometric means and 90% CI for test/reference ratios for either C_{max}/AUC or C_{max} alone were entirely included into the 80 - 125% range. Based on these results, the conclusions on the presence of bioequivalence for the rate of absorption

are in opposition with the finding of significant differences observed in t_{max} between the formulations. The EU guidelines state that assessment of t_{max} , as an index of rate of absorption, “only makes sense if there is a clinical relevant claim for rapid release or action or signs for a relation to adverse effects” [Salmonson, 1996]. As shown in Table I, the median t_{max} values for two 50 mg atenolol tablet formulations are 2.5 and 3 h, with wide intervals (1 - 4 and 1.5 - 5 h for the reference and test formulations, respectively). As already mentioned, when the volunteer’s blood pressure or heart rate values were compared no significant differences were observed at any time point, despite having both formulations caused a decrease in blood pressure. Considering these observations, we can conclude that the difference in t_{max} between both formulations (mean 0.8 h) is not of clinical significance, even when chronically administered to cardiac patients. Based on these considerations and on the obtained results, we conclude that the test formulation Angipress is bioequivalent with the reference Atenol for the rate and extent of absorption.

REFERENCES

- Boyd RA, Chin KS, Pedro OD, Williams RL, Giacomini KM 1989. The pharmacokinetics of the enantiomers of atenolol. *Clin Pharmacol Ther* 45: 403-410.
- Clemeti WA, Garvey TQ, Clifton GD, McCoy RA, Brandt S, Schwartz 1994. Single dose Pharmacokinetics of (S)-Atenolol Administered Orally as a Single Enantiomer Formulation and as a Racemic Mixture (Tenormin). *Chirality* 6: 169-174.
- Edrenyi L, Fritsch S, Yan W 1991. Cmax/AUC is a clearer measure than Cmax for absorption rates in investigations of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther* 29: 394-399.
- Egginger G, Lindner W, Karh S, Stschitzky K 1993. Stereoselective HPLC bioanalysis of atenolol enantiomers in plasma: application to a comparative human pharmacokinetic study. *Chirality* 5: 506-512.
- Food and Drug Administration (4-1-1985 Edition), Federal Register, part 320: Bioavailability and Bioequivalence Requirements, pp 154-173.
- Food and Drug Administration 1993. *In vivo* bioequivalence guidances. *Pharmacopeial Forum* 19: 6501-6508.
- Frishman WH 1982. Atenolol and Timolol, two new systemic β -adrenoceptor antagonists. *N Engl J Med* 306:1424-1462.
- Hauschke D, Steinijans V.W., Diletti E 1990. A distribution- free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 28: 72-78.
- Heel RC, Brogden RN, Speight TM, Avery GS 1979. Atenolol: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in angina pectoris and hypertension. *Drugs* 17: 425-460.
- Irshaid YM, Rawashdeh NM, Awwadi FF, Kato MK 1996. Comparative pharmacokinetics of two brands of atenolol following a single oral administration. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 34: 457-461.
- Majid PA, van der Vijgh WJF., Feitjer PJ, Wadeh R, van der Wall EE, Roos JP 1979. Once daily atenolol (Tenormine) in the treatment of angina pectoris. Observations on clinical efficacy, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Europ J Cardiol* 9: 419-435.
- Miller RB and Guertin Y 1992. High Performance liquid Chromatography assay for the derivatized enantiomers of atenolol in whole blood. *J Liq Chromatogr* 15: 1289-1302.

Muscará MN, de Nucci G 1995. Comparative bioavailability of single doses of tablet formulations of cetirizine dihydrochloride in healthy male volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 33: 27-31.

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

Shen J, Wanwimolruk S, Hung CT, Zoest AR 1991. Quantitative analysis of β -blockers in human plasma by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography using a microbore column. *J Liq Chromatogr* 14: 77-793.

Stoschitzky K, Egginger G, Zernig G, Klein W. and Lindner W 1993. Stereoselective features of (R)-and (S)-atenolol: Clinical pharmacological, pharmacokinetic and radioligand binding studies. *Chirality* 5: 15-19.

Terry S, Teitelbaum Z 1991. A liquid chromatographic method for determination of atenolol in human plasma. *J Liq Chromatogr* 14: 3735-3744.

Yee YG, Ruben P, Blaschke TF 1979. Atenolol determination by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J Chromatogr* 171: 357-362.

Table 1

Parameter	ANGIPRESS	ATENOL
AUC₍₀₋₂₄₎ (ng h ml⁻¹)		
Geom. Mean	2610	2561
90% CI	2288 - 2977	2331 - 2814
AUC (ng h ml⁻¹)		
Geom. Mean	2789	2721
90% CI	2455 -3168	2479 - 2987
C_{max} (ng/ml)		
Geom. Mean	328	327
90% CI	280 - 385	290 - 368
k_e (h⁻¹)		
Geom. Mean	0.137	0.134
90% CI	0.127 -0.147	0.126 - 0.142
t_{1/2} (h)		
Geom. Mean	5.0	5.1
90 % CI	4.7 - 5.4	4.9 5.5
t_{max} (h)		
Median	3	2.5
Range	1.5 - 5	1 - 4
C_{max}/AUC (h⁻¹)		
Geom. Mean	0.118	0.120
90 % CI	0.108 - 0.128	0.112 - 0.129

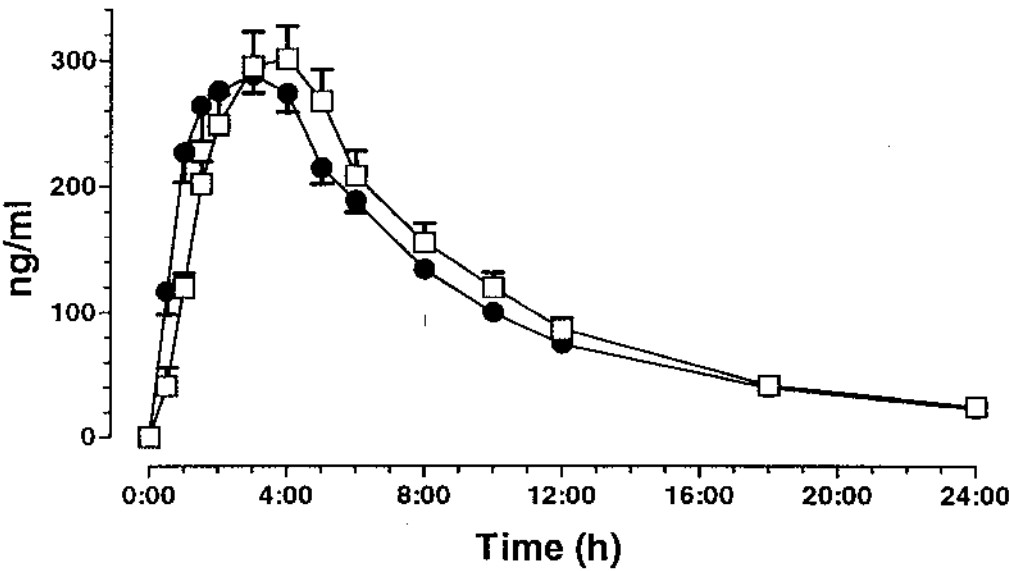
Table 2

ANG/ATE	Parametric		Non-parametric*	
	Geom. mean	90% CI	Point estimate	90% CI
AUC _(0 - 24)				
% ratio	99.6	88.1 - 112.6	100.5	89.4 - 112.6
AUC				
% ratio	99.7	88.1 - 112.9	99.8	88.3 - 109.7
C _{max}				
% ratio	98.0	86.5 - 111.0	99.2	84.5 - 114.0
k _e				
% ratio	97.2	89.2 - 105.8	98.6	90.2 - 106.2
t _{1/2}				
% ratio	102.8	94.4 - 111.9	101.1	93.9 - 111.6
t _{max} (h)				
difference(h)	0.8**	0.3 - 1.3#	1.0	0.25 - 1.25#
C _{max} / AUC _(0 - ∞)				
% ratio	97.8	90.6 - 105.5	98.1	91.9 - 106.0

Fig.1



Figure 2



Legends to tables:

Table I: Mean pharmacokinetic parameters obtained from 18 healthy male volunteers after the administration of each 50 mg atenolol tablet formulation.

Table II: Statistical analysis of individual $AUC_{(0-24)}$, AUC , C_{max} , k_e , $t_{1/2}$, and C_{max}/AUC ratios and t_{max} differences between both atenolol formulations. ANG = Angipress, ATE = Atenol.

*according to Hauschke *et al.*, [1990]; **arithmetic mean; # 90% CI for individual differences.

Legends to figures:

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

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

ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE 2 PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE ATENOLOL EM VOLUNTÁRIOS SADIOS

Responsáveis: Drs. Heitor Moreno Jr, Gun Birgitta Mendes e Gilberto de Nucci

O abaixo-assinado (Nome do voluntário, idade e nº HC), declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade dos médicos Heitor Moreno Jr, Gun Birgitta Mendes e Gilberto de Nucci, da Unidade de Farmacologia Clínica - HC UNICAMP. O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é verificar se o comprimido ATENOLOL elaborado pelo Laboratório BIOSINTÉTICA (atenolol 50 mg) atinge níveis plasmáticos equivalentes ao comprimido vendido comercialmente pelo Laboratório WELLCOME ICI (Atenol 50 mg)

ii - Durante o estudo, será internado duas vezes por 48 horas, com intervalo de 12 dias. Em ambas as ocasiões, será administrado 01 (um) comprimido de 50 mg de atenolol por via oral e coletadas 14 amostras de sangue de 10 ml cada através de butterfly heparinizado em cada internação.

iii - A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.

iv - A administração oral de atenolol pode causar efeitos colaterais como extremidades frias, fadiga, diarreia, constipação, impotência, parestesias, insônia, sonhos. Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações idiossincráticas imprevisíveis.

v - Será submetido antes da primeira internação e após a segunda internação aos seguintes exames laboratoriais: hemograma, transaminases, fosfatase alcalina, bilirrubina total, proteínas totais, uréia, creatinina, urina I, sódio, potássio, cloro e eletrocardiograma.

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

vii - Está livre para interromper a participação no ensaio clínico a qualquer momento, a não ser que esta interrupção seja contra-indicada por motivo médico.

viii - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unidade de Farmacologia Clínica.

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

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

xi - A Unidade de Farmacologia Clínica o manterá informado em relação ao progresso da pesquisa, caso julgue a informação relevante para o voluntário.

xii - Caso haja surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto-Socorro do Hospital de Clínicas da UNICAMP e solicitar que o mesmo contacte os médicos responsáveis pelo ensaio clínico.

xiii - Poderá contactar a Secretaria da Comissão de Ética (fone 8158) para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico..

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

Campinas,

Assinatura do voluntário

Dr Heitor Moreno Jr (Assin.)

Dra Gun Birgitta Mendes (Assin.)

Dr Gilberto de Nucci (Assin.)

PROTOCOLO CLÍNICO

Serão selecionados 18 voluntários do sexo masculino, com idade de 18 a 40 anos, os quais ficarão internados por um período total de 4 dias, divididos em 2 períodos de 48 horas, intercalados por 14 dias. Os voluntários não terão tomado nenhum outro medicamento por 4 semanas anteriores à data de internação. A seleção dos voluntários será realizada através de consulta médica, incluindo rigorosa anamnese e exame físico, no Ambulatório de Farmacologia Clínica, além de realização de eletrocardiograma e exames laboratoriais que corroborarão para a confirmação do estado de higidez:

- Hemograma completo e Velocidade de Hemossedimentação
- Uréia e creatinina séricas
- Transaminases, fosfatase alcalina, gamma-GT e bilirrubinas
- Glicemia de jejum
- Proteínas totais e Albumina
- Sódio, Cloro e Potássio
- Urina I
- Protoparasitológico

Uma vez avaliada a higidez, os voluntários serão submetidos a uma entrevista livre com duração de 30 minutos para a avaliação da saúde mental, bem como condições emocionais para participar da investigação. Após isso, os voluntários terão esclarecidas todas as dúvidas restantes, e caso concordem, assinarão o termo de consentimento (modelo anexo) para participação no estudo.

Os voluntários serão internados na véspera do início do estudo e terão, desde então, assistência e cuidados médicos e de enfermagem especializados. Receberão dieta geral até as 23 horas, quando começarão jejum visando o início do ensaio clínico previsto para as 7 horas do dia seguinte. Após as 8 horas de jejum, será feita coleta de sangue (10 ml) através de "butterfly" heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço do

voluntário, imediatamente antes da administração de 50 mg de uma das preparações de Atenolol, e outras, aos seguintes intervalos a partir da administração:

- 30 minutos
- 60 minutos
- 90 minutos
- 120 minutos
- 180 minutos
- 240 minutos
- 300 minutos
- 360 minutos
- 480 minutos
- 600 minutos
- 720 minutos
- 1080 minutos
- 1440 minutos

Os voluntários permanecerão em jejum para sólidos até 8 horas após a ingestão do Atenolol; a partir de então, receberão dieta geral.

No total serão coletadas 28 amostras de sangue (14 em cada etapa) para dosagem sérica de Atenolol.

Em cada fase, os voluntários receberão, por via oral, uma das seguintes preparações farmacêuticas de Atenolol:

Atenolol (Angipress) Laboratório Biosintética 50 mg

Atenolol (Atenol) Laboratório Wellcome ICI 50 mg

A concentração plasmática de Atenolol será dosado por HPLC. Parâmetros farmacocinéticos tais como concentração máxima atingida (C_{max}), tempo para atingir a concentração máxima (t_{max}) e área sob a curva durante 24 horas (AUC_{-24h}) serão

calculados e testes estatísticos paramétricos e não-paramétricos serão realizados para avaliação de possíveis diferenças significativas entre as duas preparações estudadas.

Três dias após o final do estudo, os voluntários serão reavaliados clinicamente e pelos mesmos exames subsidiários realizados na fase pré-estudo.

Os voluntários serão ressarcidos pelas suas despesas e prejuízos financeiros no valor de R\$ 90,00 (noventa) reais

Durante um período de 6 meses, a partir da data de início do estudo clínico, os voluntários estarão sob cobertura de um Seguro de Vida em Grupo da Companhia Vera Cruz, para casos de morte, invalidez permanente e acidentes.

Em caso de aparecimento de algum efeito colateral, os voluntários serão avaliados e medicados por um dos responsáveis pelo ensaio clínico.

Correção ortográfica e edição
Seção de Apoio Didático
Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP
1997

Cidade Universitária "Zeferino Vaz"
18 de janeiro de 1995

COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA DO HC/UNICAMP

CONSULTA No. 238/95-C.Ética

ASSUNTO: Projeto de Pesquisa - "Estudo de bioequivalência de duas (02) preparações comerciais de comprimidos de Atenolol".

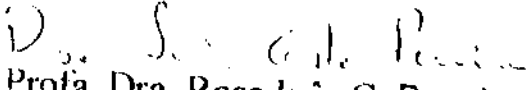
INTERESSADO: Prof. Dr. Gilberto de Nucci
Profa. Dra. Gun Birgitta
Dr. Heitor Moreno Junior
Disciplina de Farmacologia FCM - UNICAMP

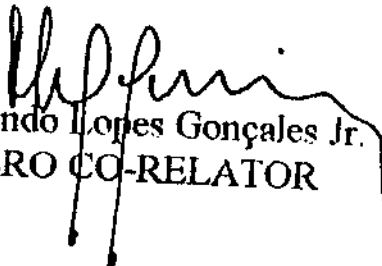
RELATOR: Profa. Dra. Maria Tereza M. Baptista

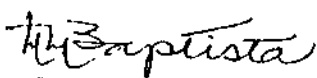
PARECER

Após apreciação do projeto de pesquisa "Estudo da bioequivalência de de duas preparações comerciais de comprimidos de Atenolol, juntamente com o protocolo clínico e termo de consentimento, a Comissão de Ética de HC-UNICAMP, reunida no dia de hoje, aprova o referido projeto, sugerindo apenas a substituição do termo "Remunerados" (pág.12) por "Ressarcidos em suas despesas", ou equivalente.

A comissão de ética médica é favorável á realização do projeto.


Prof. Dra. Rosa Inês C. Ferreira
MEMBRO CO-RELATOR


Prof. Dr. Fernando Lopes Gonçalves Jr.
MEMBRO CO-RELATOR


Prof. Dra. Maria Tereza M. Baptista
MEMBRO RELATOR COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA
HC/UNICAMP

Parecer aprovado por unanimidade na reunião do dia 05.01.95

Re: CPH M.L. Martins et al.

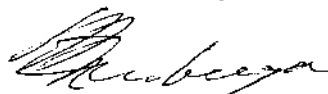
Vienna, 1997-05-12

Your manuscript entitled

"Comparative bioavailability of two atenolol tablet
formulations in healthy male volunteers after ..."

- ☐ has been received and is in the process of being reviewed.
☒ has been accepted for publication. In due course you will receive the galley proofs.

Yours sincerely,



G. Hitzenger
Editor-in-Chief



Int. Journal of *clinical
pharmacology
and therapeutics*

Prof. Dr. G. Hitzenger
Kinderspitalgasse 10/16
A-1090 Vienna
Austria

Marcelo Nicolás Muscará, PhD
Department of Clinical
Medicine, Faculty of Medical
Sciences
University Sao Francisco
Av. Sao Francisco de Assis, 218
Braganca Paulista, 12900-000, SP
B R A Z I L