

CARLOS EDUARDO SVERDLOFF

**ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA COMPARATIVA
DE UMA FORMULAÇÃO DE AMLODIPINA +
MALEATO DE ENALAPRIL *VERSUS* UMA
FORMULAÇÃO DE AMLODIPINA E *VERSUS* UMA
FORMULAÇÃO DE MALEATO DE ENALAPRIL EM
VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS**

**CAMPINAS
2009**

CARLOS EDUARDO SVERDLOFF

**ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA COMPARATIVA
DE UMA FORMULAÇÃO DE AMLODIPINA +
MALEATO DE ENALAPRIL *VERSUS* UMA
FORMULAÇÃO DE AMLODIPINA E *VERSUS* UMA
FORMULAÇÃO DE MALEATO DE ENALAPRIL EM
VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia clínica da Universidade Estadual de Campinas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

**CAMPINAS
2009**

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

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

Sv26e	Sverdloff, Carlos Eduardo Estudo de farmacocinética comparativa de uma formulação de amlodipina + maleato de enalapril <i>versus</i> uma formulação de amlodipina e <i>versus</i> uma formulação de maleato de enalapril em voluntários sadios de ambos os sexos / Carlos Eduardo Sverdloff. Campinas, SP : [s.n.], 2009. Orientador : Gilberto de Nucci Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Farmacocinética. 2. Bioequivalência. 3. Amlodipina. 4. Enalapril. 5. Espectrometria de massas. I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Título em inglês : Comparative pharmacokinetics study of a formulation of amlodipine + enalapril versus an enalapril maleate formulation in healthy volunteers of both genders

Keywords: • Pharmacokinetics
• Bioequivalence
• Amlodipine
• Enalapril
• Mass spectrometry

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Gilberto de Nucci
Prof. Dr. Ney Carter do Carmo Borges
Prof. Dr. Wellington Ribeiro**

Data da defesa: 15-11-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Carlos Eduardo Sverdloff

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Gilberto de Nucci

Membros:

Professor(a) Doutor(a) Gilberto de Nucci

Professor(a) Doutor(a) Ney Carter do Carmo Borges

Professor(a) Doutor(a) Wellington Ribeiro

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

Data: 25/11/2009

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Gilberto De Nucci, por esta oportunidade, e creditado sua confiança no meu trabalho, o qual trocamos várias vezes idéias e dessas surgiu esta dissertação.

Agradeço aos meus colegas Rafael Barrientos, Diogo de Oliveira Silva, Gustavo Mendes, José Luiz Donato, Paulo Galvinas, Vinicius Rezende, Jaime Ilha, Ronílson Moreno e Ney Carter Borges pela amizade, confiança e pela paciência de ter compartilhado comigo os momentos de diálogos deste trabalho, onde conseguimos trocar idéias e colocá-las expostas no papel.

Aos professores Edson Antunes e Stephen Hyslop pelas ajudas de todo tipo.

À Yara, por ter agüentado longos períodos de concentração.

Enfim, agradeço aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram e ajudaram-me com suas dicas.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”.

(Isaac Newton, 1725)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxv
RESUMO	xxvii
ABSTRACT	xxix
1. INTRODUÇÃO	xxxi
1.1 Hipertensão	33
1.2 Medicamentos antihipertensivos.....	35
1.3 Associações de anti-hipertensivos.....	36
1.4 Fármacos de Interesse no presente trabalho.	40
1.4.1 Besilato de Amlodipina.....	40
1.4.1.1 Sumário dos achados em estudos clínicos e não clínicos.....	41
1.4.2 Enalapril / Enalaprilato	46
1.4.2.1 Sumário dos achados em estudos clínicos e não clínicos.....	47
1.5 Método analítico e validação	52
2. OBJETIVOS.....	57
1.1 Objetivo primário.....	59
1.2 Objetivos específicos	59
3. MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1 Descrição do desenho do estudo	63
3.2 Etapa clínica	64
3.2.1 Recrutamento e seleção	64
3.2.2 Critérios de inclusão do voluntário	66
3.2.3 Critérios de exclusão do voluntário	66
3.2.4 Critérios de retirada do voluntário	68
3.2.5 Coleta de amostras	70
3.2.6 Desistências (<i>drop-outs</i>)	70

3.3	Etapa analítica	71
3.3.1	Materiais e métodos amlodipina.....	72
3.3.2	Componentes do HPLC:	73
3.3.3	Padrões utilizados:.....	73
3.3.4	Condições cromatográficas.....	74
3.3.5	Extração de amlodipina:.....	75
3.3.6	Condições do espectrômetro de massas para amlodipina:.....	76
3.3.7	Determinação do Limite inferior de quantificação (LIQ)	76
3.3.8	Controles de qualidade	77
3.3.9	Materiais e métodos enalapril	77
3.3.10	Componentes do HPLC:	78
3.3.11	Padrões utilizados:.....	79
3.3.12	Condições cromatográficas.....	79
3.3.13	Extração de enalapril e enalaprilato	80
3.3.14	Condições do espectrômetro de massas para enalapril e enalaprilato	81
3.3.14.1	QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	81
3.4	Etapa estatística	82
3.4.1	DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS ESTATÍSTICOS	82
4.	RESULTADOS.....	85
4.1	Amlodipina	87
4.1.1	Validação amlodipina:	87
4.1.1.1	Especificidade.....	89
4.1.1.2	Curva de calibração	91
4.1.1.3	Precisão e exatidão	93
4.1.1.4	Determinação do Limite inferior de quantificação do método para amlodipina	94
4.1.1.5	Considerações de estabilidade para amlodipina.....	95
4.1.2	Quantificação amlodipina:	96
4.2	Enalapril / enalaprilato	98
4.2.1	Validação enalapril e enalaprilato	98
4.2.1.1	Especificidade.....	99
4.2.1.2	Curva de calibração	102
4.2.1.3	Precisão e exatidão	105
4.2.1.4	Determinação do Limite inferior de quantificação do método para enalapril	108
4.2.1.5	Considerações de estabilidade para enalapril e enalaprilato	109
4.2.2	Quantificação enalapril.....	110
4.2.3	Quantificação enalaprilato.....	112
4.3	ACHADOS FARMACODINÂMICOS	115

5. DISCUSSÃO	117
6. CONCLUSÃO	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXOS	141

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da Variância
ASC_{0-<i>t</i>last}	Área sob a curva de <i>concentração vs. tempo</i> , do tempo 0 (zero) ao tempo da última concentração
ASC_{0-∞}	Área sob a curva de concentração da droga <i>versus</i> tempo do tempo 0 (zero) extrapolada ao infinito
BPC	Boas práticas clínicas
BPF	Boas práticas de fabricação
BPL	Boas práticas de laboratório
CV	Coeficiente de variação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
C	Concentração
C_{max}	Concentração Máxima
QC	Controle de Qualidade
DP	Desvio padrão
ECA	Enzima de Conversão de angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
EA	Evento adverso
EAS	Evento adverso sério
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
CRF	Formulário de relatório de caso - <i>Case Report Form</i>
FC	Frequência cardíaca
IMC	Índice Massa corporal
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>

LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
max	Máximo
min	Mínimo
n. d.	Não detectável
p.a.	Pós-administração
PA	Pressão arterial
Tmax	Tempo no qual ocorre a maior concentração alcançada
LC-MS/MS	Tandem de espectrometria líquida com espectrometria de massas
UGQ	Unidade da Garantia da Qualidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório	34
Tabela 2: Combinações de Tratamento da hipertensão arterial.....	40
Tabela 3: definição de sequências de tratamento	63
Tabela 4: Exames Laboratoriais vinculados ao processo de seleção dos voluntários	64
Tabela 5: Itens da História Clínica e Exame físico explicitamente referenciados no CRF	65
Tabela 6: :Coletas de sangue para dosagem de Enalapril	70
Tabela 7: coletas de sangue para dosagem de amlodipina	70
Tabela 8: Aparelhos utilizados na validação de amlodipina	73
Tabela 9: Componentes do sistema de HPLC	73
Tabela 10: Padrões utilizados para a validação e quantificação de amlodipina	74
Tabela 11: Condições cromatográficas para amlodipina.....	74
Tabela 12: Tempos de retenção para amlodipina e nifedipina	75
Tabela 13: Condições do espectrômetro de massas para amlodipina	76
Tabela 14: Componentes do sistema de HPLC para enalapril.....	78
Tabela 15: Componentes do sistema de HPLC para quantificação de enalapril.....	78

Tabela 16: Padrões utilizados para a validação e quantificação de enalapril	79
Tabela 17: Condições cromatográficas para validação e quantificação de enalapril.....	79
Tabela 18: Tempos de retenção para enalapril e enalaprilato	80
Tabela 19: Condições do espectrômetro de massas para enalapril.....	81
Tabela 20: íons precursores e produto para amlodipina	87
Tabela 21: Curvas de calibração de amlodipina.....	92
Tabela 22: listas de validação para amlodipina.....	94
Tabela 23: Validação de LIQ para amlodipina.....	95
Tabela 24: Sequência de voluntários quantificados por lista para amlodipina	96
Tabela 25: parâmetros obtidos para amlodipina	97
Tabela 26: íons precursores e produto para enalapril e enalaprilato.....	98
Tabela 27: Curvas de calibração de amlodipina.....	103
Tabela 28: listas de validação de enalapril.....	106
Tabela 29: listas de validação de enalaprilato.....	107
Tabela 30: Validação de LIQ para enalapril	108
Tabela 31: Validação de LIQ para enalaprilato	109
Tabela 32: Sequência de voluntários quantificados por lista para enalapril	110
Tabela 33: Sequência de voluntários quantificados por lista para enalaprilato ...	110
Tabela 34: parâmetros obtidos para enalapril	111
Tabela 35: parâmetros obtidos para enalaprilato	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da amlodipina	40
Figura 2: estrutura molecular do enalapril	46
Figura 3: esquema de funcionamento do espectrômetro de massas	72
Figura 4: mecanismo de fragmenação da amlodipina.....	87
Figura 5Figura 5: rota de fragmentação da amlodipina.....	88
Figura 6: Rota de fragmentação do padrão interno nifedipina.....	88
Figura 7: Picos representativos para amostras zero, LIQ, QCA, QCB e QCC (analito e padrão interno).	91
Figura 8: curva de calibração representativa para amlodipina.	93
Figura 9: curva cinética média para amlodipina	96
Figura 10Figura 10: rota de fragmentação do enalapril.....	99
Figura 11: rota de fragmentação do enalaprilato.....	99
Figura 12: Picos representativos para as amostras de zero, LIQ, QCA, QCB, QCC e QCD (Analito e padrão interno).....	102
Figura 13: Curva de calibração representativa para enalapril.	104
Figura 14: Curva de calibração representativa para enalaprilato	105
Figura 15: Curva cinética média de enalapril	111
Figura 16: Curva cinética média para enalaprilato	112
Figura 17: Pressão arterial em função do tempo durante a internação.....	115

Introdução: Com base em evidências de estudos mostrando que em cerca de 2/3 dos casos de hipertensão a monoterapia não é suficiente para atingir as reduções pressóricas previstas, e diante da necessidade de controle mais rigoroso dos níveis pressóricos, há clara tendência atual para a introdução precoce de terapêutica combinada de anti-hipertensivos como primeira medida farmacológica. Tais associações de anti-hipertensivos podem ser feitas por meio de fármacos em separado ou por associações em doses fixas. Entre as associações eficazes conhecidas tem-se o caso de inibidores de enzima conversora de angiotensina e bloqueadores dos canais de cálcio; um exemplo desta associação é a de amlodipina e enalapril. **Objetivo:** O presente estudo analisa a farmacocinética comparativa de um produto contendo Amlodipina e outro contendo enalapril com um produto contendo a combinação dos dois princípios ativos. O produto testado foi Sinergen® (5mg/20mg) dos Laboratórios Biosintética Ltda. O produto referência para o Amlodipina foi o Norvasc®, comprimido de 5 mg, produzido pelo Laboratório Pfizer Ltda e o produto referência para o Enalapril foi o Renitec®, comprimido de 20 mg, produzido pela Merck Sharp Dohme. **Materiais e métodos:** 36 voluntários saudáveis de ambos os sexos foram internados em três oportunidades, nas quais receberam a associação de amlodipina e enalapril, amlodipina individualmente e enalapril individualmente. Coletas a intervalos regulares foram durante 144 horas para amlodipina e durante 24 horas para enalapril. As concentrações de Amlodipina, Enalapril e Enalaprilato foram medidas através de método analítico apropriado e validado por espectrofotometria de massas (LC-MS MS). A análise estatística dos resultados foi realizada mediante ANOVA. **Resultados:** As razões teste/referência das formulações para os parâmetros C_{max} e ASC em estudo estiveram dentro do intervalo de 80-125%. **Conclusão:** Após análise estatística correspondente por ANOVA, chegou-se à conclusão que a formulação teste Sinergen é bioequivalente no que diz respeito às formulações referência Renitec (Enalapril) e Novarsec (amlodipina), já que todas as relações T/R para C_{max}, AUC 0-inf e AUC 0-last das formulações estavam compreendidas no intervalo 80%-125%, determinado por ANVISA como condição de bioequivalência.

Palavras Chave: Farmacocinética, Bioequivalência, Amlodipina, Enalapril.

Introduction: Based on evidence of studies showing that in 2/3 of the cases of hypertension monotherapy is not enough to reach pressure reduction and facing the necessity of a more rigorous control, there is a clear current trend to the early introduction of a combined therapy of anti-hypertensive drugs as first pharmacological measure. These associations of anti-hypertensives can be made through separate products or through associations in fixed doses. Among the known efficient associations there is the case of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and calcium channels blockers; an example of these associations is the one of amlodipine and enalapril. **Objective:** This study analyses the comparative pharmacokinetics of a product containing amlodipine, a second one containing enalapril against a product containing the two active principles. The product test, Sinergen® (5mg/20mg) was manufactured by Laboratórios Biosintética Ltda. The reference product for Amlodipina was Norvasc®, 5 mg tablet, manufactured by Laboratório Pfizer Ltda and the reference product for Enalapril was Renitec®, 20 mg tablet, manufactured by Merck Sharp Dohme. **Materials and methods:** 36 healthy volunteers of both genders were confined in three periods during which they received the association of amlodipina and enalapril, amlodipine individually and enalapril individually. Collects at regular intervals during 144 hours for amlodipine and 24 hours for enalapril were measured through a proper validated analytical method. The plasmatic concentrations of Amlodipine, Enalapril and enalaprilate were measured by a proper validated analytical method of mass spectrometry (LC-MS-MS). The statistical analysis was performed by ANOVA. **Results:** The relation of test and reference of the formulations for the parameters C_{max} and AUC were within 80-125%. **Conclusion:** After statistical analysis by ANOVA, we reached the conclusion that the test formulation, Sinergen, is bioequivalent to the reference formulations Renitec (Enalapril) and Novarsec (amlodipina), since all the T/R relations for C_{max}, AUC_{0-inf} and AUC_{0-last} of the formulations were within 80%-125% interval determined by ANVISA as condition of bioequivalence.

Keywords: Pharmacokinetics, Bioequivalence, Amlodipine, Enalapril, Mass spectrometry

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão

A primeira mensuração da pressão arterial data da metade do século XVIII feita por Stephen Halles, na Inglaterra, que usou uma coluna de vidro conectada a uma artéria de um cavalo, sendo observada a elevação da coluna de sangue no tubo e a oscilação do pulso. A invenção do esfigmomanômetro de coluna de mercúrio data de 1896, pelo italiano Scipione RivaRocci, em Turim. Em seu trabalho foi descrita a pressão arterial sistólica, definida pelo desaparecimento da oscilação de pulso à insuflação de um manguito(1). Até a década de 40 a importância clínica da pressão arterial elevada era controvertida e muitos duvidavam inclusive da necessidade do tratamento.

Em relação ao uso de fármacos anti-hipertensivos, existiu uma defasagem entre a descoberta das primeiras drogas com ação anti-hipertensiva, seu uso eficaz e o estudo científico de seus efeitos. A falta de critérios rígidos em pesquisas naquela época, associado ao fato da hipertensão não ter sua importância valorizada foram contribuintes importantes para esse fenômeno(2)(3).

Em 1964 foi publicado o primeiro estudo com o propranolol e a classe se desenvolveu rapidamente na década de 70. Nesta mesma década foram descobertas as propriedades de inibição da enzima conversora da angiotensina, a partir de peptídeos do veneno da jararaca. Essa pesquisa brasileira resultou no desenvolvimento de uma nova classe de drogas com a síntese do captopril. Já a ação hipotensora dos bloqueadores dos canais de cálcio já era conhecida desde a década de 60, mas apenas na década de 80 foi comercializada e utilizada como droga de primeira linha para a hipertensão. Os bloqueadores AT1 surgiram na década de 90. Desde então várias pesquisas com novas classes de drogas tem tentado evoluir o tratamento da hipertensão, mas até o momento nenhuma nova

droga surgiu com a capacidade de ocupar um lugar junto com as drogas estabelecidas como de primeira linha naquela época.(3)

A elevação da pressão arterial representa um fator de risco independente, linear e contínuo para doença cardiovascular (4)(5). No Brasil, em 2003, 27,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares, atingindo 37% quando são excluídos os óbitos por causas mal definidas e a violência. A principal causa de morte em todas as regiões do Brasil é o acidente vascular cerebral, acometendo as mulheres em maior proporção (6).

Os valores que permitem classificar os indivíduos adultos acima de 18 anos, de acordo com os níveis de pressão arterial estão na seguinte tabela:

Tabela 1: Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	<120	<80
Normal	<130	<85
Limítrofe	130-139	85-90
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	>180	>110
Hipertensão sistólica isolada	>140	<90

Fonte: V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão arterial.

O aumento da pressão arterial se dá basicamente por três mecanismos: aumento da resistência vascular periférica, aumento da contratilidade cardíaca e aumento do volume plasmático. As estratégias para o tratamento da hipertensão incluem tratamento não farmacológico (dieta, exercício, abstinência de álcool e nicotina, dentre outros) e tratamento farmacológico.

1.2 Medicamentos antihipertensivos

Os atuais medicamentos para tratamento da hipertensão arterial são os diuréticos tiazídicos, os bloqueadores de canais de cálcio, os betabloqueadores, os inibidores da enzima conversora da angiotensina e os bloqueadores AT1 (7).

O tratamento através de monoterapia, aumentando as doses até níveis máximos antes de substituir ou associar outras medicações foi o preconizado até pouco tempo atrás. O intuito era obter um regime terapêutico simples que possibilite uma melhor aderência do paciente ao tratamento farmacológico. No entanto, a maioria dos pacientes, principalmente os portadores de hipertensão de grau 2 não conseguem uma estabilização da PA com apenas uma formulação. Assim, atualmente recomenda-se o uso da terapia combinada de fármacos de forma precoce nessa população, de 2 ou até 3 substâncias. Associações reconhecidamente eficazes são(7):

Diuréticos tiazídicos associados a betabloqueadores, bloqueadores adrenérgicos centrais, IECA ou antagonistas ATII. Bloqueadores de cálcio associados a betabloqueadores ou IECA.

O uso criterioso de formulações existentes no mercado com essas combinações pode facilitar o esquema posológico e a aderência do paciente ao tratamento. Também há evidências atuais que o uso de ácido acetilsalicílico, em baixas doses nos pacientes com HAS controlada, diminui a ocorrência de complicações cardiovasculares na ausência de contra-indicações a esta substância (6). Adesão ao tratamento

A adesão ao tratamento é definida como o grau de obediência do paciente à prescrição e às instruções médicas, ou seja, como o paciente cumpre as recomendações médicas, toma as medicações prescritas, realiza mudanças no

estilo de vida, etc. (7). Outro aspecto da adesão é a persistência com foco o tratamento continuado e de longo prazo (8).

A falta de adesão ao tratamento anti hipertensivo é uma das principais causas para a falta de controle da pressão arterial (9). Estudos realizados indicam (9) que o maior problema não é o número de medicamento que o paciente deve tomar, mas sim a quantidade de vezes que ele deve lembrar de tomar seu medicamento.

Vários aspectos podem exercer influência na adesão do paciente ao tratamento, como por exemplo: sexo, idade, escolaridade do paciente, cronicidade da doença, ausência ou presença dos sintomas, hábitos de vida, custo do tratamento, efeitos colaterais, esquemas terapêuticos complexos, entre outros(10).

1.3 Associações de anti-hipertensivos

Em metanálise conduzida por Law et al. (10), conclui-se que a associação de baixas doses pode concorrer para o dobro da ação anti-hipertensiva das medicações empregadas isoladamente. Assim, em decorrência dessa avaliação pode-se chegar aos resultados abaixo apresentados com relação ao uso isolado de monoterapia e da associação fixa de substâncias.

Com monoterapia, há uma redução de 4% a 8% no valor da pressão:

PA de 160 x 95 mmHg

PAS = - 7 a 13 mmHg

PAD = - 4 a 8 mmHg

Com associação: 8% a 15% de redução no valor da pressão

PA de 160 x 95 mmHg

PAS = - 12 a 22 mmHg

PAD = - 7 a 14 mmHg

Esses dados são apontados em diretrizes que orientam no sentido de utilizar-se as associações até mesmo como terapia inicial, sobretudo nos pacientes classificados com estágio II e III.

Por um longo período de tempo, cientistas tentaram esclarecer o motivo responsável pela hipertensão arterial, assim como, farmacologistas da indústria farmacêutica tentaram descobrir o medicamento ideal para o paciente hipertenso.

Com o conhecimento acumulado desde a década de 1950, quando o aparecimento dos diuréticos tornou possível o tratamento generalizado da hipertensão arterial, ficou evidente que não há “o mecanismo” responsável pela hipertensão arterial, bem como, não há “o medicamento” totalmente eficaz para o controle do paciente hipertenso.

A hipertensão arterial essencial é uma condição onde há desbalanço entre mecanismos vasodilatadores e vasoconstritores, havendo o predomínio destes últimos. Tratar pacientes hipertensos significa restaurar o equilíbrio entre vasodilatação e vasoconstrição ou pelo menos diminuir o predomínio deste último. O grande número de agentes anti-hipertensivos, atualmente disponíveis, é um reflexo do esforço de se promover mais vasodilatação.

Apesar do grande progresso na terapêutica anti-hipertensiva, que tornou possível a quase erradicação da hipertensão maligna, por exemplo, os resultados em termos de percentual de pacientes hipertensos controlados na população não são tão favoráveis como seria de se esperar. Para alguns, esta constatação

decorreria da necessidade de medicamentos ainda mais eficazes, enquanto que para outros, fatores relacionados à informação dos pacientes a uma melhor motivação dos médicos estaria limitando nossa eficácia terapêutica. Paralelamente a esta situação, está ficando cada vez mais evidente que, ao tratar pacientes, devem-se procurar níveis mais baixos de pressão arterial, especialmente nos pacientes com maior risco. Assim, na prática, não só tem-se que melhorar o percentual de pacientes controlados, como também deve-se ser mais rigoroso, estabelecendo metas com menores níveis tensionais do que as tradicionais. Como podem-se cumprir estes objetivos? A associação fixa de medicamentos pode ser uma boa resposta. Ao analisar-se os grandes estudos prospectivos, fica evidente que praticamente todos tiveram que recorrer à associação de medicamentos para o controle da pressão arterial. Esta constatação reflete o caráter multifatorial da hipertensão arterial e confirma que a monoterapia, com qualquer classe de medicamentos anti-hipertensivos, só diminui as pressões sistólicas e diastólicas em 4% a 8% dos respectivos valores iniciais. Assim, um paciente que apresentasse 160 x 95 mmHg apresentaria, sob tratamento em monoterapia, redução de 7 a 13 mmHg na pressão sistólica e de 4 a 8 mmHg na pressão diastólica. Este mesmo paciente, se tratado com combinação ou associação de dois anti-hipertensivos, apresentaria redução de 8% a 15% nos níveis pressóricos. Assim, teria-se redução de 12 a 22 mmHg na pressão sistólica e 7 a 14 mmHg na diastólica e o paciente atingiria a meta de normalização da pressão arterial.

Vantagens na associação de anti-hipertensivos:

MAXIMIZAÇÃO DA EFICÁCIA

Ao combinar mecanismos anti-hipertensivos diferentes procura-se aumentar a probabilidade de obter um controle pressórico mais rapidamente e sair da faixa de 30% a 40% de normalização com monoterapia para 70% a 80%. Na

associação, deve-se escolher o medicamento que complementa a ação anti-hipertensiva ao outro medicamento. Exemplo clássico está na combinação de um diurético, que tem sua ação anti-hipertensiva limitada pela ativação do sistema renina-angiotensina, com um inibidor da enzima conversora da angiotensina (I-ECA) ou um bloqueador dos receptores da angiotensina II (BRA).

MINIMIZAÇÃO OU ANULAÇÃO DE EFEITOS COLATERAIS

Ao utilizar associações pode-se obter melhor controle pressórico com doses menores, provocando menos efeitos colaterais. Além disso, um dos componentes pode minimizar os efeitos colaterais do outro: por exemplo, um betabloqueador pode diminuir a taquicardia de um antagonista de cálcio.

FACILITAÇÃO À ADESÃO AO TRATAMENTO

Com dois fármacos em um único comprimido, facilitamos a adesão ao tratamento. Conforme se sabe, o número de tomadas é um grande limitante da adesão ao tratamento. Quais as combinações sinérgicas no tratamento antihipertensivo?

Tendo em vista os mecanismos de ação sinérgicos e os resultados favoráveis obtidos de vários estudos, as associações eficazes que trazem benefício aos pacientes hipertensos estão listadas na tabela 1.

Observa-se que para melhor controle pressórico não se recomenda a associação diurético com antagonistas de cálcio e um I-ECA ou BRA com betabloqueadores. Evidentemente, a associação de betabloqueador com I-ECA ou BRA é extremamente útil no tratamento da insuficiência cardíaca.

Tabela 2: Combinações de Tratamento da hipertensão arterial.

Combinações fixas e eficazes de anti-hipertensivos

Diurético e betabloqueador

Diurético e I-ECA

Diurético e bloqueador do receptor da All

Antagonista de cálcio e betabloqueador

Antagonista de cálcio e I-ECA

Antagonista de cálcio e bloqueador do receptor da All

1.4 Fármacos de Interesse no presente trabalho.

1.4.1 Besilato de Amlodipina

A amlodipina é um antagonista de canal de cálcio, de ação prolongada, usado no tratamento de hipertensão arterial e angina pectoris.

A amlodipina é um derivado 1,4 di-hidropiridínico, estruturalmente relacionado com a nifedipina, que tem uma substituição do grupo amino básico, que lhe confere propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas específicas.

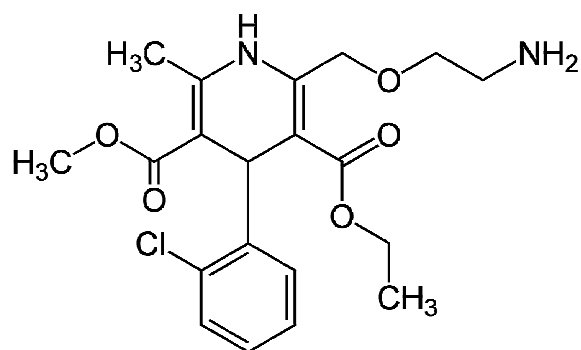


Figura 1: Estrutura molecular da amlodipina

É um pó branco, sem cheiro. A mistura racêmica está sendo desenvolvida para uso clínico. O L-isômero possui efeitos farmacológicos mais potentes, sendo que a L-amlodipina possui um IC50 in vitro (para bloqueio de cálcio em aorta de rato despolarizada pelo potássio) de 2nM quando comparado a 1uM para o D-isômero.

1.4.1.1 Sumário dos achados em estudos clínicos e não clínicos

MECANISMO DE AÇÃO - FARMACOLOGIA CLÍNICA

A amlodipina ocupa o receptor di-hidropiridínico da membrana celular e causa um bloqueio competitivo do canal de cálcio. Quando comparado a outras di-hidropiridinas, a amlodipina tem um início de efeito demorado e um relaxamento máximo da musculatura lisa mais prolongado. A aparente potência da amlodipina como deslocador da ligação de [3H] (+) PN 200-110 aumentou com o tempo de Ki de 3,1 nM a 60 minutos para um Ki de 1,3 nM após 180 minutos de incubação. O deslocamento foi estereoseletivo, com o d-isômero da amlodipina sendo 1000 vezes mais potente do que o isômero S(+). A amlodipina desloca também a ligação de diltiazem, e neste aspecto difere de outras di-hidropiridinas as quais mostram somente deslocamento parcial (11).

Injeções endovenosas em bolus, em cães, promoveram uma vasodilatação sistêmica e coronariana acompanhada de estimulação reflexa da frequência cardíaca e do débito cardíaco. Amlodipina tem efeitos mínimos na eletrofisiologia cardíaca ou na função do nodo sinoatrial e atrioventricular. Em coração isolado de gato perfundido, submetido à isquemia por 60 minutos e então perfundido novamente, a amlodipina produziu um decréscimo significativo do consumo de oxigênio pelo miocárdio e da resistência vascular coronariana. O

retorno da função contrátil foi mais rápida nos corações tratados com amlodipina do que nos corações controle. Amlodipina reduz a área de infarto em cães, provavelmente por reduzir a demanda de oxigênio pelo miocárdio.

FARMACOLOGIA CLÍNICA

No homem, os efeitos dominantes da amlodipina são decorrentes da vasodilatação sistêmica. Nos estudos de farmacocinética em voluntários normotensos, com doses de até 10 mg somente pequenas mudanças hemodinâmicas foram evidenciadas. Em hipertensos, doses diárias entre 2,5 a 10 mg produzem decréscimos dose-dependente na pressão arterial. A amlodipina diminui a resistência vascular periférica sem causar taquicardia reflexa além de ser efetiva em dose única no controle da hipertensão com queda da pressão sistólica e diastólica. Na terapia com amlodipina ocorre uma vasodilatação renal, e consequente discreto aumento na filtração glomerular. A amlodipina causa também um aumento, dose-dependente, da duração do exercício antes do início da angina pectoris em pacientes com doença arterial coronariana. Parte desta melhora é devida a uma redução das necessidades de oxigênio pelo miocárdio e parte devido a uma vasodilatação das artérias e arteríolas coronarianas. Não foi notado efeito da amlodipina no sistema renina-angiotensina ou no sistema nervoso simpático, ou alterações nas concentrações de fator natriurético no homem.

FARMACOCINÉTICA

A amlodipina é absorvida de forma incompleta e lentamente, com 60-80% da dose oral alcançando a circulação sistêmica. Os picos de concentração plasmática são vistos em torno de 6-12 horas (média 7,6h) após a sua administração. Isto evita alterações plasmáticas rápidas presentes com outros antagonistas do cálcio e conduz a uma baixa incidência de efeitos colaterais (12, 13, 33).

A amlodipina é distribuída extensivamente por todo o corpo, tendo um volume de distribuição de 15 - 25 l/kg indicando distribuição extensiva da droga nos tecidos periféricos. Experimentos in vivo indicam alta concentração na membrana plasmática celular. É extensivamente ligada as proteínas plasmáticas (92-98%), mas até o momento não foi determinado em qual das proteínas (albumina, glicoproteína ácida, lipoproteínas) ocorre a ligação predominante.

A meia vida plasmática varia de 30-60 h (média 35,7h) e isto é o resultado de um clearance metabólico baixo e uma extensiva distribuição nos tecidos periféricos. Não existe informações a respeito da distribuição da droga em outros fluidos como o leite materno, fluido cerebrospinal, saliva e semen (11-14). A amlodipina atinge o estado de equilíbrio plasmático após 7-9 dias de dose única diária. Os níveis plasmáticos no estado de equilíbrio mostraram ser 3,2 vezes maiores seguindo-se uma única dose.

A amlodipina é extensivamente metabolizada no fígado e cerca de 5% é excretada de forma inalterada na urina. Nenhum dos 16 metabólitos identificados tem atividade farmacológica apreciável. A excreção dos metabólitos ocorre principalmente na urina (62%) com o restante sendo eliminado nas fezes.

O efeito de doenças hepáticas agudas na disposição de amlodipina ainda não está bem estudado, entretanto sabe-se que na cirrose hepática pode ocorrer diminuição do clearance total da droga (15). Não ocorre mudanças na disposição de amlodipina em pacientes com doença renal (16), mas o clearance total da droga está diminuído em pacientes idosos hipertensos (14) e indivíduos idosos sadios (17). O significado clínico destas mudanças na farmacocinética relacionadas com a idade, ainda não é conhecido, sugerindo-se que doses menores sejam usadas nestes pacientes.

RELAÇÃO DOSE-EFEITO

A relação dose-efeito sugere claramente a eficácia relacionada com a dose diária de 2,5 mg de amlodipina similar ou levemente melhor do que o placebo; 5 mg diário consistentemente mais eficaz do que placebo; e 10 mg diário mais eficaz do que 5 mg, com um efeito máximo de 50% de aumento no tempo de exercício para o início da angina (18) e 67% de diminuição nos ataques de angina por semana concomitante com 50% de decréscimo no consumo de nitroglicerina (19). No tratamento da hipertensão uma relação clara entre a concentração de amlodipina e efeito anti-hipertensivo foi demonstrado após administração endovenosa (concentrações de 1-10 ug/l, variação em média da pressão sanguínea 6-35 mm Hg) em pacientes idosos hipertensos (14).

Durante o uso crônico de amlodipina por via oral há uma clara relação entre efeito/concentração em pacientes hipertensos (14).

INDICAÇÕES E USOS

Amlodipina foi avaliada em ensaios clínicos mostrando ser eficaz como monoterapia no tratamento da hipertensão (14,20, 21). O mecanismo de ação é predominantemente devido ao relaxamento da musculatura lisa vascular devido ao antagonismo dos canais de cálcio (22). Quando combinada com diuréticos tiazídicos e inibidores da enzima conversora da angiotensina apresenta efeitos anti-hipertensivos aditivos. Tanto a pressão sistólica como a diastólica diminuem sem alterações da frequência cardíaca ou ativação da aldosterona no sistema renina-angiotensina. Decréscimos na pressão sistólica na ordem de 15 a 30 mmHg e na pressão diastólica de 10 a 20 mmHg ocorrem com o uso de amlodipina na dose única de 10mg diária. A dose apropriada para o início da terapia é de 5mg uma vez ao dia, aumentando-se até 10mg uma vez ao dia. O decréscimo da pressão arterial é gradual com efeitos anti-hipertensivos ocorrendo 6 a 12 horas após o início da primeira dose. Isto corre em parte devido ao índice

baixo de associação da amlodipina aos receptores dihidropiridínicos no canal de cálcio (23-24).

A amlodipina foi avaliada em ensaios clínicos para o tratamento da angina pectoris crônica e estável e é eficaz como monoterapia (25-26). Combinada com beta bloqueadores e nitratos de ação longa apresenta efeitos anti-anginosos aditivos sem efeitos adversos, embora avaliações mais controladas sejam necessárias para a detecção de pacientes que se beneficiarão com o tratamento combinado. A eficácia foi demonstrada em estudos duplo cego com placebo pelo decréscimo da frequência da dor na angina, diminuição do consumo de nitroglicerina, e aumento do tempo para o início da dor em pacientes submetidos a teste de esforço quando em tratamento com amlodipina. A dose inicial para a angina é de 5 mg ao dia aumentando-se até 10 mg ao dia dependendo da resposta terapêutica. A droga deve ser mantida pelo menos por duas semanas para se determinar o efeito terapêutico, devido ao tempo necessário para alcançar o estado de equilíbrio (7 a 10 dias). O mecanismo de ação anti-anginoso é devido em parte a redução secundária da resistência vascular periférica e em parte a vasodilatação coronariana (26).

Em um estudo controlado duplo-cego com placebo foi relatado a eficácia da amlodipina no tratamento da angina vasoespástica (27). Este efeito foi visto na dose de 10 mg por dia e outro dado positivo foi uma diminuição do índice de ataques de angina monitorizados pelo paciente. Não houve modificações no consumo de nitroglicerina. O mecanismo desses efeitos presume-se serem devidos a vasodilatação das artérias coronarianas, e por bloqueio dos espasmos arteriais coronarianos como resultado do bloqueio dos canais de cálcio na musculatura lisa vascular (26).

1.4.2 Enalapril / Enalaprilato

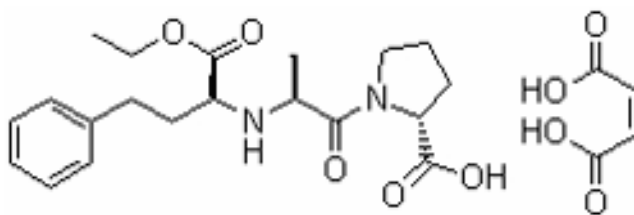


Figura 2: estrutura molecular do enalapril

Atualmente, os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) têm sido largamente utilizados em terapêutica cardiovascular. Estes agentes inibem a produção de angiotensina II, permitindo, cronicamente, o bloqueio do sistema renina-angiotensina (RAS). O primeiro inibidor da ECA a ser usado em humanos foi o teprotide, isolado do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca*. Este composto é um nonapeptídeo que apresenta atividade apenas por via parenteral, em virtude de sua meia-vida curta. Subsequentemente, desenvolveram-se numerosos outros inibidores da ECA de administração oral, sendo o primeiro, o Captopril (1976), inicialmente utilizado de forma restrita a portadores de hipertensão arterial renovascular ou resistente a outras terapêuticas. Em 1985, o Enalapril, um segundo inibidor da ECA de uso oral, passou a ser utilizado em humanos, e, conjuntamente com o Captopril, com indicações mais amplas nos distúrbios cardiocirculatórios. Mais recentemente, outros inibidores da ECA têm sido desenvolvidos, embora o Captopril e o Enalapril sejam os dois produtos mais comercializados em um grande número de países.

O Enalapril é uma pró-droga e possui pequena atividade farmacológica até ser hidrolizado no fígado em Enalaprilato (28,29) que é substancialmente mais potente que a pró-droga. É comercializado sob a forma de maleato de Enalapril, o que possibilita uma maior absorção gastro-intestinal da droga se comparada com o Enalaprilato (28,29). O Enalapril é estruturalmente e farmacologicamente similar

ao Captopril (30,31), mas possui um átomo de Nitrogênio substituindo radical sulfidril na posição 3 da 2-metil-1oxipropil-L-prolina (32), o que parece explicar uma menor incidência de efeitos adversos, como reações cutâneas, distúrbios do paladar e proteinúria (33).

1.4.2.1 Sumário dos achados em estudos clínicos e não clínicos

MECANISMO DE AÇÃO - FARMACOLOGIA CLÍNICA

A droga compete com o substrato fisiológico (Angiotensina I) pelo sítio ativo da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (34, 35), sendo a afinidade do Enalaprilato aproximadamente 200.000 vezes maior que a da Angiotensina I (36). In vitro, em base molar, a afinidade do Enalaprilato pela ECA é 300 a 1000 vezes maior que a do Enalapril (37,38), e 2 vezes maior que a do Captopril (39,40). A inibição da ECA inicialmente resulta em queda da concentração plasmática de Angiotensina II e, conseqüentemente, diminuição da pressão arterial, em parte por redução de vasoconstrição (34,35,40). Observa-se aumento da Atividade da Renina Plasmática (ARP) (34,35,36,41,42), possivelmente como resultado da perda do mecanismo de retro-alimentação (feed-back) negativa, mediada por Angiotensina II, na liberação de Renina pelos rins (34,38,42) e/ou estimulação reflexa de baroreceptores, resultante da diminuição da pressão arterial (43,44,45). Estes efeitos da droga sobre a ARP e a concentração plasmática de Angiotensina II são potencializados pela restrição de ingesta de sódio (46,47,48). Os efeitos hipotensores iniciais do Enalapril são proporcionais e, provavelmente conseqüentes à inibição da ECA no sangue (49,50,51), porém a manutenção dos mesmos após a redução da concentração de Angiotensina II, parecem ser resultantes de efeito local, na parede vascular (44,45). Esta diminuição da produção local de Angiotensina II promovida pelos inibidores da ECA reduz o tônus vascular. Durante o uso prolongado de Enalapril, a concentração de

Angiotensina II pode retornar a níveis plasmáticos pré-tratamento (37,46) e a inibição do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) nos diversos tecidos, como rins e paredes arteriais, passa a ser mais importante para a manutenção dos efeitos hipotensivos que no sangue (35,47,48).

O Enalapril parece ser mais eficaz na redução de pressão arterial de indivíduos hipertensos com Renina alta ou normal (49,50), mas a droga também reduz os níveis pressóricos em hipertensos com Renina baixa (51,52). Assim, não se verifica correlação consistente entre níveis de APR pré-tratamento e grau de redução da pressão arterial (53). A diminuição no plasma da concentração de angiotensina II induzida pela droga leva a uma menor secreção de Aldosterona pela córtex adrenal, com queda nos níveis sanguíneos e na excreção urinária de Aldosterona (34,35,45,53,54). Assim, o Enalapril tende a equilibrar a perda de potássio causada pelo uso de diuréticos e a aumentar a excreção de sódio, por menor secreção de Aldosterona (55). A concentração de catecolaminas circulantes geralmente não é afetada pelo Enalapril (46,54).

Pelo fato de que a ECA degrada também a Bradicinina, sugeriu-se inicialmente, que a inibição da ECA pudesse causar acúmulo de Bradicinina no plasma ou nos tecidos com resultante vasodilatação (34,35,36,39,44,55). Entretanto, as concentrações plasmáticas ou urinárias de bradicinina ou seus metabólitos não se mostram alteradas nos pacientes responsivos ao Enalapril (37,42).

Também tem sido sugerido que as prostaglandinas pudessem mediar os efeitos do Enalapril por algumas evidências de a droga possa aumentar a produção ou liberação de prostaglandinas (56). No entanto, o assunto mostra-se controverso e necessita maiores investigações para a determinação do real papel das prostaglandinas na mediação desses efeitos (46,57,58). As concentrações urinárias de Tromboxane e Prostaciclina encontram-se inalteradas durante a terapia com Enalapril.

EFEITOS CARDIOVASCULARES

Em pacientes hipertensos, Enalapril reduz a pressão arterial por diminuir a resistência vascular periférica total, sem modificar ou promovendo discreto aumento na frequência cardíaca, no volume sistólico e no débito cardíaco (34,35,45,58). A droga causa dilatação arterial e, provavelmente, venosa (45,59). não se observam alterações no volume plasmático (60,61). Não se verifica alteração direta na sensibilidade de baroreceptores em indivíduos normotensos (62,63) ou hipertensos (64,65) submetidos a dieta normosódica. Em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, Enalapril, usualmente em associação com glicosídeos cardíacos e diuréticos, reduzem a resistência periférica total, a pressão capilar pulmonar, a pressão arterial média, a pressão atrial direita e a área cardíaca (66,67).

EFEITOS RENAIIS E ELETROLÍTICOS

O fluxo renal sanguíneo pode aumentar, mas a filtração glomerular permanece inalterada durante a terapia com Enalapril (35,54,68). A creatinina sérica e o BUN ocasionalmente elevam-se durante a terapia crônica com Enalapril (35,58,69), sendo mais frequente em pacientes com disfunção renal prévia, ou recebendo concomitantemente diuréticos (36,57,69) ou com insuficiência cardíaca congestiva (60,67,69). Aumento na concentração sérica de potássio podem ocorrer secundariamente a uma diminuição na secreção de Aldosterona induzida pelo Enalapril (36,57,66,69), especialmente em pacientes com disfunção renal prévia. A excreção urinária de sódio pode estar aumentada durante os 2-3 primeiros dias de tratamento provavelmente por uma redução na reabsorção tubular de sal (33,63).

FARMACOCINÉTICA

ABSORÇÃO

A alimentação não parece afetar substancialmente a absorção do maleato de Enalapril (36,70). Após a administração, o maleato de Enalapril em uma primeira passagem pelo fígado, é hidrolizado em Enalaprilato (36,37,49,50). A concentração máxima sérica de Enalapril é de 40-80 ng/ml (37,38,44) e ocorre cerca de 30-90 minutos após a administração oral de uma dose única de 10 mg de maleato de Enalapril em voluntários sadios ou pacientes hipertensos (34,35,36,37,39). Concentrações séricas estáveis de Enalaprilat são alcançadas entre 30-60 horas em pacientes com função renal normal recebendo 10 mg de Maleato de Enalapril ao dia, por 8 dias (70). Após a interrupção da droga, a pressão arterial gradualmente retorna a níveis pré-tratamento (38,71). O aparecimento e a duração dos efeitos hemodinâmicos do Maleato de Enalapril parecem ser mais lentos que para o Captopril (67,72). Nos pacientes com insuficiência cardíaca, os efeitos hemodinâmicos da droga são observados a partir de 2-4 horas (54,68) e persistem por 24 horas (54,60,73) após uma dose oral.

DISTRIBUIÇÃO

Dois sítios de ligação do Enalaprilato foram identificados, um de baixa afinidade e alta capacidade, e outro de alta afinidade e baixa capacidade (36,50). A droga ligada a este último sítio pode representar o Enalaprilato, ligado a ECA circulante no plasma, o que seria responsável pela liberação tardia da droga (36,39,50). O Enalapril cruza em mínimas quantidades a barreira hematoencefálica, enquanto o Enalaprilato não se distribui no sistema nervoso central (36,38). A droga não se acumula em qualquer tecido após múltiplas doses administradas a animais(36).

ELIMINAÇÃO

Em indivíduos sadios, cerca de 60-78% da dose oral de 10 mg de Maleato de Enalapril são excretados na urina (37,44,74), e aproximadamente 33% nas fezes (35,26,37), dentro de 24-48 horas após a administração. Em pacientes com clearance de creatinina menor que 30 ml/min, a meia-vida da droga está aumentada (36,74), enquanto que em pacientes com função renal moderadamente diminuída (clearance de creatinina entre 30-60 ml/min) não se observa prolongamento da meia-vida significativa (36,75,76). Em situações de redução da excreção renal de enalapril, pode ocorrer aumento na hidrólise de Enalapril a Enalaprilato ou aumento extra-renal da eliminação da droga, por exemplo, pela vias biliares (77,78). Em pacientes hipertensos ou idosos (79), a eliminação renal de enalaprilato pode estar reduzida.

INDICAÇÕES E USOS

Na hipertensão arterial, o enalapril é usado no controle de pacientes hipertensos de graus leve a severo (36,37), como monoterapia ou combinada a outras classes de agentes anti-hipertensivos (36,37,38,39). O efeito hipotensor da droga em hipertensos é semelhante ao do Captopril (79) ou dos beta-bloqueadores adrenérgicos (80). a associação de Enalapril a um diurético tiazídico, frequentemente controla níveis de pressão arterial anteriormente não controláveis com o uso isolado de inibidor da ECA (36,37,38,39,67). Em geral, hipertensos da raça negra respondem melhor a diuréticos e antagonistas de canais de Cálcio que ao Enalapril (37), provavelmente pela baixa ARP nesses indivíduos. A taquifilaxia não é frequente com o uso de Enalapril (36,69), principalmente se associado a diuréticos (81). O uso de Enalapril não interfere no controle glicêmico de diabéticos hipertensos, ou causa efeitos adversos nos mesmos (82), exceto por ocasionais episódios de hipoglicemia em pacientes em

uso de hipoglicemiantes orais ou insulina (83). Além do efeito hipotensor do Enalapril, a droga estabiliza e até aumenta o fluxo renal plasmático e a taxa de filtração glomerular, reduz a proteinúria em portadores de disfunção renal moderada (69) ou nefropatia diabética (60). No entanto, deve ser utilizado com cuidados em indivíduos com disfunção renal severa, especialmente em portadores de estenose de artéria renal bilateral ou estenose de artéria renal em rim solitário (34,56,69).

Na insuficiência cardíaca congestiva (ICC), o Enalapril pode ser utilizado com melhora dos índices de função cardíaca, dos sintomas (dispnéia, fadiga, etc) e da tolerância a exercícios físicos (36,60,68). Estes efeitos mantem-se por mais de 4 meses (36,67), chegando em alguns pacientes a durar até 21 meses (36,84). Em um estudo multicêntrico, a associação de Enalapril à terapêutica convencional para ICC, reduziu em 40% a mortalidade geral em 6 meses e em 31% em 12 meses, quando comparada com a terapêutica convencional isolada (85). Além disso, observou-se melhora da classe funcional (NYHA) nos pacientes que receberam também Enalapril (85). Outros estudos mais recentes vem sendo conduzidos, para avaliar o benefício potencial do Enalapril em pacientes cardiopatas com disfunção ventricular esquerda, sem ICC. O efeito hipotensor mais prolongado do Enalapril quando comparado com o do Captopril, pode afetar mais adversamente a função renal, já que a ativação do SRA na ICC contribui para a preservação da filtração glomerular que se encontra severamente diminuída (70).

1.5 Método analítico e validação

O objetivo de uma validação é demonstrar e documentar que o método é apropriado para a finalidade pretendida.

As concentrações plasmáticas de Amlodipina, Enalapril e Enalaprilato foram dosadas por método analítico específico e validado, baseado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massa. O relatório de validação do método, bem como sua descrição foram fornecidos por ocasião da conclusão do estudo.

Ambos métodos foram devidamente validados no que diz respeito a:

- A. Sensibilidade
- B. Especificidade e seletividade
- C. Linearidade
- D- Precisão
- E. Exatidão
- F. Reprodutibilidade
- E. Verificações complementares

A- Sensibilidade: faculdade intrínseca do sistema de identificar minimamente o analito em questão.

B- Especificidade e seletividade: busca individualizada do sinal de uma espécie única do analito e a capacidade do método analítico de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros compostos na amostra (interferentes).

São testadas amostras de matriz (plasma, sangue, soro, urina, etc) de pelo menos 6 fontes diferentes (4 normais, 1 limpêmica e 1 hemolisada em condições controladas). No caso de outros tipos de matriz, deve-se avaliar as possibilidades de variação do estado da matriz para antecipar as situações reais do estudo a ser aplicado o método.

Os resultados destas amostras devem ser comparados aos obtidos de amostras padrão em solução e na matriz, na concentração do LIQ para o analito e na concentração final estimada do PI. As amostras de matriz não devem apresentar interferências significativas nos tempos de retenção do analito (menor que 20% da resposta para o LIQ em solução e/ou matriz extraída) e do PI (menor que 5% da resposta na concentração usada nos estudos).

C-Linearidade: é a relação entre resposta do instrumento e concentrações conhecidas do analito, estabelecido mediante uma curva de equação $y=a+bx$

D- Precisão: proximidade entre as diferentes medidas individuais nas mesmas condições de preparação.

Para a avaliação da precisão, a repetibilidade do método é verificada com amostras do LIQ e 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto) de CQs. Devem ser realizadas pelo menos 5 determinações para cada concentração. Quando o teste utilizar mais de 5 réplicas de cada concentração, pelo menos 67% das determinações devem apresentar exatidão individual com desvio entre $\pm 15\%$.

A precisão intra-lote, valor que expressa repetibilidade, é determinada pelo cálculo do Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação em porcentagem (CV%). Ambos são calculados pela razão entre o desvio padrão (DP) e a concentração média (CM), conforme abaixo:

$$CV\% \text{ (ou DPR)} = (DP / CM) * 100$$

A CM e o DP devem ser calculados obedecendo os critérios de aceitação individual (pelo menos 5 determinações para cada concentração; para mais de 5

réplicas de cada concentração, pelo menos 67% das determinações com exatidão individual com desvio entre $\pm 15\%$).

Critérios de aceitação para precisão intra-lote (repetibilidade):

- $CV\% \leq \pm 20\%$ para o LIQ
- $CV\% \leq \pm 15\%$ para os CQs baixo, médio e alto

E- Exatidão: grau de concordância entre os resultados experimentais e os valores de referência..

O cálculo da exatidão se dá pela razão das CMs do LIQ e dos CQs com seus respectivos valores de referência (valores nominais de concentração = concentração teórica – CT) conforme abaixo:

$$E = (CM / CT) * 100$$

Critérios de aceitação para exatidão:

- E entre 80 - 120% (inclusive) para as médias do LIQ

E entre 85 - 115% (inclusive) para as médias dos CQs baixo, médio e alto

F- Reprodutibilidade: grau de precisão entre resultados obtidos nas mesmas condições analíticas e operacionais e em distintos momentos de processamento e análise.

A reprodutibilidade do método é expressa pelo valor da precisão inter-lote. A precisão inter-lote é determinada pelo cálculo do CV% (ou DPR) entre as CMs do LIQ e dos CQs obtidas em 3 diferentes sequências analíticas de precisão intra-lote.

CrITÉRIOS de aceitação para precisão inter-lote (reprodutibilidade):

- $CV\% \leq \pm 20\%$ para as médias do LIQ
- $CV\% \leq \pm 15\%$ para as médias dos CQs baixo, médio e alto

E- Verificações complementares: Detecção cruzada ou cross talk, carry over e supressão iônica.

Estudos de estabilidade: adicionalmente aos ensaios de validação, foram conduzidos ensaios de estabilidade para: estabilidade pós-processamento, congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, de longa duração, de estabilidade da solução master e das soluções de trabalho.

2. OBJETIVOS

1.1 Objetivo primário

Este estudo teve por objetivo avaliar comparativamente a farmacocinética de um produto contendo Amlodipina e outro contendo Enalapril com uma produto contendo a combinação dos dois princípios ativos numa formulação galénica única. O produto testado foi a Amlodipina + Enalapril (Sinergen®; 5mg/20mg) dos Laboratórios Biosintética Ltda. O produto referência para a Amlodipina foi Norvasc®, comprimido de 5 mg, produzido pelo Laboratório Pfizer Ltda. e o produto referência para o Enalapril foi o Renitec® comprimido de 20 mg, produzido pela Merck Sharp Dohme.

A biodisponibilidade comparativa das formulações após a administração oral foi avaliada com base em comparações estatísticas de parâmetros farmacocinéticos relevantes, a partir de dados de concentração sanguínea para a droga, obtidos das amostras de sangue a serem coletadas. As concentrações de Amlodipina, Enalapril e Enalaprilato foram medidas através de método analítico apropriado e validado

1.2 Objetivos específicos

- Elaborar e submeter ao Comité de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) o protocolo de estudo de Biodisponibilidade comparativa/Bioequivalência;
- Planejar, elaborar e conduzir o desenho do estudo;
- Desenvolver e validar os métodos de extração e quantificação das amostras biológicas, utilizando HPLC acoplada a Espectrometria de massas;

- Avaliar a estabilidade dos fármacos em plasma humano;
- Determinar os parâmetros farmacocinéticos;
- Analisar estatisticamente através de programas específicos os dados das concentrações obtidas nos pontos de coleta definidos no protocolo de estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição do desenho do estudo

Este foi um estudo aberto, randomizado, cruzado, com três tratamentos, três períodos (seis seqüências), nos quais os voluntários recebem, em um período uma das formulações referências, em um segundo período a outra formulação referência e em um terceiro período a formulação teste.

As formulações foram administradas em dose única por via oral seguidos de coletas de sangue de pelo menos 3 meias-vidas. Os períodos de tratamento obedeceram um intervalo mínimo de 7 meias-vidas entre eles (tempo de “wash-out”). Considerando-se que a maior meia-vida plasmática dos princípios ativos em estudo (amlodipina) é de aproximadamente 38 horas, planejou-se um intervalo mínimo de 21 dias entre as internações.

Os voluntários foram aleatoriamente designados a uma das seguintes seqüências de tratamento. Foi considerado previamente o balanceamento dos voluntários em função do sexo:

Tabela 3: definição de seqüências de tratamento

Seqüência	Período de Tratamento I	Período de Tratamento II	Período de Tratamento III
	Código do Tratamento	Código do Tratamento	Código do Tratamento
1	Referência 1	Teste	Referência 2
2	Referência 1	Referência 2	Teste
3	Teste	Referência 1	Referência 2
4	Teste	Referência 2	Referência 1
5	Referência 2	Referência 1	Teste
6	Referência 2	Teste	Referência 1

3.2 Etapa clínica

3.2.1 Recrutamento e seleção

A seleção de voluntários foi realizada através da unidade responsável pela Etapa Clínica. Um mínimo de 36 voluntários sadios foram selecionados diretamente da população da região, sendo 18 mulheres e 18 homens.

Os voluntários foram aceitos no estudo somente se considerados saudáveis, a juízo médico, com base na história clínica, exame físico e os exames laboratoriais que antecedem a admissão no estudo.

Para fins de avaliação das condições de saúde, durante o processo de seleção os voluntários realizaram os testes apresentados na tabela seguinte:

Tabela 4: Exames Laboratoriais vinculados ao processo de seleção dos voluntários

Categoria	Exames
ECG	ECG padrão com 12 derivações
Análise hematológica	Hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas
Análise Bioquímica	Uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicerídeos, ácido úrico, γ GT.
Urina	Sumário de Urina (urina I)
Fezes	Proto-parasitológico
Sorologia	Análise sorológica para: hepatite B, hepatite C e HIV (I e II) □-HCG para mulheres

Os resultados dos exames de laboratório foram considerados “normais” quando dentro da faixa de normalidade declarada pelo laboratório. Alterações dos kits de teste utilizados, após a aprovação deste Protocolo, resultando em novas faixas de normalidade, foram referenciadas nos CRFs ou no Relatório Clínico.

Os resultados anormais que, a juízo do pesquisador, foram considerados não clinicamente significativos foram identificados com a sigla “n.s.” no respectivo Formulário de Relato de Caso (CRF) do voluntário.

No que se refere ao eletrocardiograma, o médico especialista informou se os achados específicos são julgados como normais, anormais não clinicamente significativos (“n.s.”) ou anormais. O especialista também informou se o voluntário é considerado como apto para participar do estudo. O relatório do ECG foi mantido como parte da documentação do estudo.

Antes da admissão no estudo, os voluntários submeteram-se a um exame clínico, o qual foi explicitamente documentado no Formulário de Relato do Caso (CRFs), englobando a revisão dos seguintes itens:

Tabela 5: Itens da História Clínica e Exame físico explicitamente referenciados no CRF

Categoria	Exames
<u>História Médica</u>	Alergias; olhos, nariz e garganta; sistemas respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinário, nervoso central, hematopoiético-linfático, endócrino; dermatológico, musculoesquelético; estabilidade emocional, história familiar, cirúrgica.
<u>Exame Físico</u>	Olhos, orelhas, nariz, garganta, pescoço (incluindo tireóide), coração, pulmões, abdome (incluindo fígado e baço), pele, linfonodos, urogenital, sistema nervoso, esqueleto e músculos
<u>Dados antropométricos e Sinais Vitais</u>	Pressão arterial (medida 5 minutos após descanso, na posição sentada), pulso, altura, peso (roupas leves), índice de massa corpórea, temperatura em °C

3.2.2 Critérios de inclusão do voluntário

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

Homem ou mulher com idade entre 18-50 anos. As mulheres não poderão estar grávidas e nem em regime de amamentação;

Voluntário tem seu índice de massa corpórea maior ou igual a 19 e menor ou igual a 28;

Boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo médico, de acordo com as regras definidas no Protocolo, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico e psicológico, ECG, e exames laboratoriais complementares;

Capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos e com intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”;

3.2.3 Critérios de exclusão do voluntário

A resposta positiva a qualquer um dos seguintes critérios excluirá o voluntário do estudo:

Problemas relacionados com a droga:

O voluntário tem, sabidamente, uma hipersensibilidade a umas das droga em estudado, Amlodipina ou Enalapril, ou a outros compostos, quimicamente

relacionados; história de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer droga;

História ou presença de doenças hepáticas ou gastrointestinais ou outra condição que interfere com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo da droga;

Uso de terapia de manutenção com qualquer droga excetuando-se anticoncepcionais por via oral;

Doenças ou problemas de saúde

Voluntários com história de doença hepática, renal, pulmonar, gastrointestinal, epiléptica, hematológica ou psiquiátrica; tem hipo- ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; tem história ou teve infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca; achados eletrocardiográficos não recomendados a critério do investigador para participação no estudo; os resultados dos exames laboratoriais complementares deveram estar dentro dos valores considerados normais de acordo com as normas do protocolo do estudo, a menos que sejam considerados não clinicamente significativos pelo investigador;

Hábitos e Dependências:

Voluntário fumante; voluntários que ingerem mais do que 5 xícaras de café ou chá por dia; tem história de abuso de álcool ou drogas ou qualquer outra condição encontrada nos dias/meses que antecedem o estudo.

Fez uso de medicação regular dentro das 2 semanas que antecederam o início do tratamento e a data de avaliação, ou fez uso de qualquer medicação dentro de uma semana, excetuando-se anticoncepcionais por via oral ou os casos

em que, com base na meia-vida do fármaco e/ou metabólitos ativos, possa ser assumida a completa eliminação;

Foi internado por qualquer motivo entre 8 semanas do início do primeiro período de tratamento deste estudo e a data da avaliação;

Tratamento, dentro dos 3 meses prévios ao início do tratamento do estudo e a data da avaliação, com qualquer droga que se conheça ter um potencial tóxico bem definido nos grandes órgãos;

O voluntário participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer droga experimental dentro dos 3 meses que antecedem o início do tratamento e a data da avaliação;

O voluntário doou ou perdeu 450 mL ou mais de sangue dentre dos três meses que antecederam ao estudo ou que doou mais de 1500 mL dentro dos 12 meses entre o início do tratamento do estudo e a data de avaliação;

Outras condições

Teste positivo de gravidez para as voluntárias mulheres.

O voluntário teve qualquer outra condição que o impediu de participar do estudo, à juízo do investigador.

3.2.4 Critérios de retirada do voluntário

Solicitação por parte do voluntário para se retirar do estudo a qualquer momento:

Voluntário não desejou continuar no estudo por razões pessoais (ou mesmo sem relatar a razão);

Voluntário não desejou continuar no estudo devido os eventos adversos da droga do estudo (efeitos não desejáveis possivelmente relacionados a droga em estudo);

Voluntário não deseja continuar por razões outras que não efeitos adversos, por exemplo, indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo.

O investigador pode retirar o voluntário do estudo por uma das seguintes razões:

Resposta positiva à reavaliação de qualquer um dos critérios de exclusão, no momento da admissão ao primeiro período de tratamento ou em ocasião subsequente;

Não adesão às exigências do protocolo, sobretudo as mencionadas na seção 6.2;

Eventos adversos ou sintomas ou sinais de possível toxicidade;

Doença intercorrente requerendo medicação;

Qualquer outra condição que, a juízo do investigador, seja do interesse para manutenção da saúde do voluntário.

Todos os detalhes e razões da retirada do voluntário do estudo foram anotados na parte do CRF destinada para este fim (Seção de Término do Estudo) e relatada aos monitores.

3.2.5 Coleta de amostras

Após pelo menos 8 horas de jejum, o ensaio teve início com uma coleta de 10 mL de sangue para controle individual e padronização da metodologia (somente no primeiro período de confinamento).

Cinquenta e quatro amostras de sangue de 4 mL foram coletadas de acordo com a programação que se segue, para uso na dosagem de Amlodipina e Enalapril.

Tabela 6: :Coletas de sangue para dosagem de Enalapril

Amostra pré administração	Imediatamente antes (dentro de 1 hora) da administração da medicação
Amostras pós administração	0.5 h, 1 hora, 1.5 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 24 horas após a administração da droga.

Tabela 7: coletas de sangue para dosagem de amlodipina

Amostra pré administração	Imediatamente antes (dentro de 1 hora) da administração da medicação
Amostras pós administração	1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 24 horas, 48 horas, 96 horas, 120 horas e 144 horas após a administração da droga.

3.2.6 Desistências (*drop-outs*)

As desistências (*drop-outs*) se deveram a eventos adversos (3 deles: reação vaso-vagal, febre e cefaléia), motivos pessoais (2) e teste positivo de gravidez (1).

O voluntário 5 saiu antes do primeiro período, o 6 após a alta do segundo período, o 7 após a alta do segundo período, o 23 e o 24 após a alta do primeiro período e o 35 após a alta do primeiro período.

Portanto, foram incluídos 31 voluntários na avaliação estatística para enalapril e 30 para amlodipina.

3.3 Etapa analítica

Ambos compostos foram quantificados por HPLC MS-MS, sendo usado um Quattro Ultima para a amlodipina e um Quattro Micro para Enalapril e Enalaprilato.

O espectrômetro de massas é um equipamento capaz de determinar a massa molecular de compostos químicos através da separação pela razão massa/carga (m/z) das moléculas. As moléculas, após vaporização, são carregadas pela ação de um feixe de elétrons de energia elevada, o que gera íons (moléculas carregadas), tendo como resultado um espectro de massas (intensidade dos íons gerados vs. relação m/z).

Os compostos são ionizados, acelerados e selecionados num campo magnético ou pelo “tempo de voo” sob vácuo. Os íons são detectados pela sua relação massa/carga

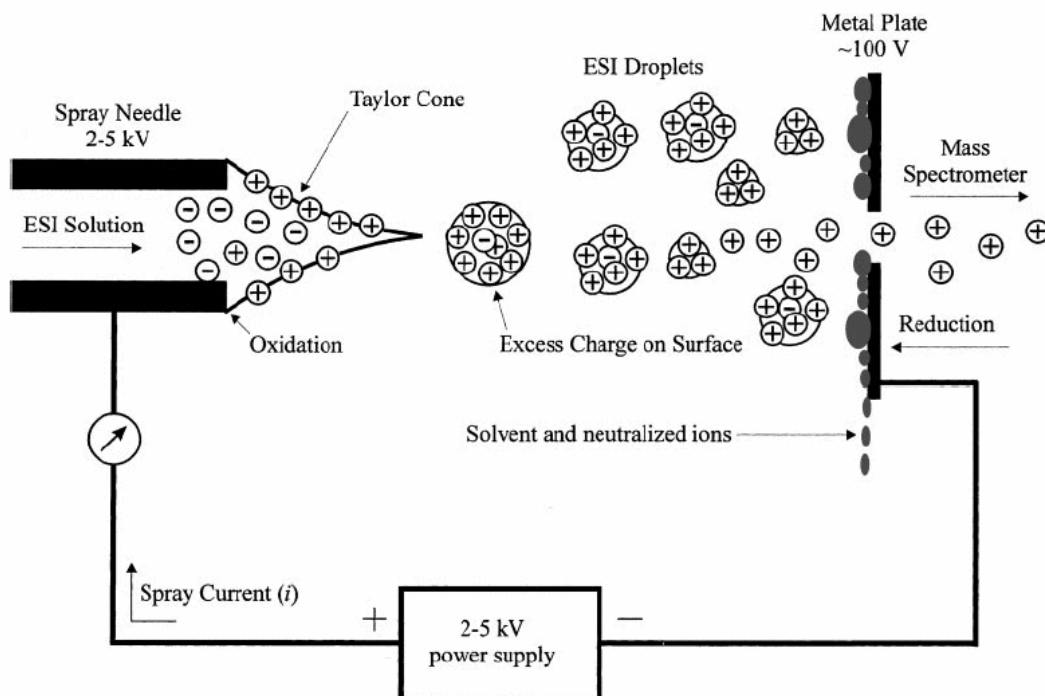


Figura 3: esquema de funcionamento do espectrômetro de massas

As concentrações plasmáticas de Amlodipina, Enalapril e Enalaprilato foram dosadas por método analítico específico e validado, baseado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massa. O relatório de validação do método, bem como sua descrição foram fornecidos por ocasião da conclusão do estudo.

3.3.1 Materiais e métodos amlodipina

Os aparelhos utilizados na validação de amlodipina estão relacionados na seguinte tabela:

Tabela 8: Aparelhos utilizados na validação de amlodipina

Aparatos	Fabricante, país
Pipetas automáticas (P200, P1000 and P10000)	Gilson, França
Ponteiras de pipetas automáticas - amarelas (faixa 5 - 200 µL) & azuis (faixa 200 - 1000 µL)	Gilson, France
Tubos de ensaio descartáveis 120 x 12 mm	Laborglass, Brasil
Pipeta de repetição Eppendorf	Eppendorf, USA
Plastic tubes 50 and 15 mL capacity	Costar, Brazil
Vials de vidro e caps do autoamostrar	OCP Diagnostics, Brazil
Misturador Vortex	Fischer, USA
Balança analítica	Ohaus, Alemanha

3.3.2 Componentes do HPLC:

Tabela 9: Componentes do sistema de HPLC

Componente	Fabricante, país	Modelo
Cromatógrafo líquido	Shimadzu, Japão	LC-10AD
Auto-amostrador	CTC Analytics, Suíça	HTS Pal
Espectrômetro de massas	Micromass, UK	Quattro Ultima
Fonte	Micromass, UK	Electrospray
Sistema de dados	Micromass, UK	Masslynx v3.5 running in Windows NT v 4.0 on a Pentium III PC

3.3.3 Padrões utilizados:

Para realizar os ensaios, padrões de referência de autenticidade comprovada foram utilizados. O lote e a identificação de ditos padrões é listada a continuação:

Tabela 10: Padrões utilizados para a validação e quantificação de amlodipina

Padrão	Uso	Fabricante	Fornecedor	Lote
Besilato de amlodipina	Analite	Dr. Reddy's	Medley	AB020E01
Nifedipina	Padrão interno	Prosintex Ind. Chimiche Italiane SRL	Biosintética	104604
Maleato de enalapril	Contaminante	Impex Química S.A.	EMS	511102089B
Enalaprilato di-hidratado	Contaminante	USP	USP	I

3.3.4 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas usadas durante o ensaio estão listadas na tabela a continuação:

Tabela 11: Condições cromatográficas para amlodipina

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	Acetonitrila/água (60/40; v/v) + 5 mM ácido trifluoro-acético + 5 mM acetato de amônia
Coluna analítica	Jones Chromatography, Genesis, C ₁₈ 4 um (100 x 2.1 mm i.d.)
Temperatura do auto-injetor	13 °C
Fluxo	0.2 mL/min.
Pressão	35 - 40 bar
Temperatura da coluna	ambiente
Volume de injeção	10 uL
Tempo total da corrida	4.2 min.

Os tempos de retenção para o analito e o padrão interno foram os seguintes:

Tabela 12: Tempos de retenção para amlodipina e nifedipina

Tempos de retenção padrão		Tempo de retenção (min)
Amlodipina	409.28 > 238.03	1.7 ± 0.3
Nifedipina	347.18 > 315.18	3.0 ± 0.3

3.3.5 Extração de amlodipina:

Os procedimentos descritos a seguir foram aplicados não somente as amostras de quantificação senão também na extração das curvas de calibração e nos controles de qualidade.

Para praticar a extração de amostras, o seguinte protocolo experimental foi seguido:

1. colocar um número adequado de tubos de vidro em um rack;
2. dispensar os brancos, zeros, padrões, QCA, QCB e QCC (amostras de plasma humano) nos tubos;
3. Dispensar o padrão interno (50 µL da solução de 20 ng/mL de nifedipina) usando uma pipeta de repetição e misturar em vortex por aproximadamente 5 segundos;
4. Adicionar 200 µL de uma solução de buffer carbonato usando pipeta de repetição e misturar em vortex por 5 segundos;
5. Adicionar 4 mL de dietil-eter/hexanos (80/20; v/v) usando pipeta de repetição e misturar em vortex por 40 segundos;
6. Centrifugar as amostras a 2000 g por um minuto;
7. Congelar a fase aquosa a -70°C por um minuto;

8. Remover a camada orgânica e transferi-la a um tubo limpo;
9. Evaporar o solvente usando fluxo de nitrogênio a 50°C;
10. Dissolver o resíduo com 100 µL de uma solução de acetonitrila/água (50/50; v/v) e misturar em vortex por 10 segundos para reconstituir os resíduos e transferir as soluções a vials usando pipetas automáticas com ponteiros descartáveis.;
11. Tampar os vials e colocá-los no auto-injetor.

3.3.6 Condições do espectrômetro de massas para amlodipina:

O Quattro Ultima opera em modo de ionização de eletrospray positiva (ES+). Na seguinte tabela mostram-se as condições do espectrômetro e os íons monitorados:

Tabela 13: Condições do espectrômetro de massas para amlodipina

	Íon precursor	Íon produto	Dwell time (s)	Voltagem cone (V)	Energia de colisão (eV)
1	409.28	238.03	0.3	20	15
2	347.18	315.18	0.3	20	10

3.3.7 Determinação do Limite inferior de quantificação (LIQ)

O menor ponto da curva de calibração foi aceito como LIQ se as seguintes condições foram atingidas:

- Não houve interferência nos brancos no tempo de retenção dos analitos ou a resposta deste ponto de padrão menor foi 5 vezes maior a qualquer interferência nos brancos nos tempos de retenção;
- Pico de analito indentificável, discreto e com uma exatidão de entre 80%-120% em relação à concentração nominal do ponto padrão;
- Caso pontos padrão estivessem disponíveis em duplicata e aprovados, o cálculo de precisão deve estar dentro de 20%.

3.3.8 Controles de qualidade

Cada controle de qualidade (QC) foi checado e descartado se houve um desvio superior a 15% da concentração nominal devido a um erro claro e identificável durante o processo de preparação

Uma corrida analítica foi rejeitada se mais de 33 % do total de QCs foi rejeitado e não mais de 50% deles era da mesma concentração.

3.3.9 Materiais e métodos enalapril

Os aparelhos utilizados na validação de enalapril e enalaprilato estão relacionados na seguinte tabela:

Tabela 14: Componentes do sistema de HPLC para enalapril

Aparatos	Fabricante, país
Pipetas automáticas (P200, P1000 and P10000)	Gilson, França
Ponteiras de pipetas automáticas - amarelas (faixa 5 - 200 µL) & azuis (faixa 200 - 1000 µL)	Gilson, France
Tubos de ensaio descartáveis 120 x 12 mm	Laborglass, Brasil
Pipeta de repetição Eppendorf	Eppendorf, USA
Plastic tubes 50 and 15 mL capacity	Costar, Braxil
Vials de vidro e caps do autoamostrar	OCP Diagnostics, Braxil
Misturador Vortex	Fischer, USA
Balança analítica	Ohaus, Alemanha
Placas de 96 poças de 200 uL de capacidade	Axygen, USA
HLB Oasis SPE cartridges (30 mg, 1cc)	Waters, USA

3.3.10 Componentes do HPLC:

Tabela 15: Componentes do sistema de HPLC para quantificação de enalapril

Componente	Fabricante, país	Modelo
Cromatógrafo líquido	Shimadzu, Japão	LC-10AVP
Degasificador	Agilent, USA	G1322-A
Auto amostrador	CTC Analytics, Suíça	HTS Pal
Espectrômetro de massas	Micromass, UK	Quattro Micro
Fonte	Micromass, UK	Electrospray
Sistema de dados	Micromass, UK	Masslynx v3.5 runing in Windows NT Server 4.0 on a IBM PC

3.3.11 Padrões utilizados:

Para realizar os ensaios, padrões de referência de autenticidade comprovada foram utilizados. O lote e a identificação de ditos padrões é listada a continuação:

Tabela 16: Padrões utilizados para a validação e quantificação de enalapril

Padrão	Uso	Fabricante	Fornecedor	Lote
Maleato de Enalapril	Analito	Impex Química S.A.	EMS	511102089B
Enalaprilato di-hidratado	Analito	USP	USP	I
Maleato de Enalapril D ₅	Padrão interno	CDN Isotopes	CDN Isotopes	L484P18
Enalaprilato-D ₅	Padrão interno	CDN Isotopes	CDN Isotopes	L485P24
Besilato de amlodipina	Contaminante	Dr. Reddy's	Medley	AB020E01

3.3.12 Condições cromatográficas

Tabela 17: Condições cromatográficas para validação e quantificação de enalapril

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	Metanol/água (55/45; v/v) + 5 mM acetate de amônia + 13 mM ácido trifluoroacético
Coluna analítica	Jones Chromatography C ₈ 4µm (100 x 2.1 mm i.d.)
Temperatura auto-injetor	13 °C
Fluxo	0.2 mL/min
Pressão	50 - 60 bar
Temperatura da coluna	ambiente
Volume de injeção	10 µL
Tempo total de corrida	4.0 min

Os tempos de retenção para o analito e o padrão interno foram os seguintes:

Tabela 18: Tempos de retenção para enalapril e enalaprilato

Tempos de retenção padrão		Tempo de retenção (min)
Enalapril	377 > 303	2.6 ± 0.3
Enalaprilato	349 > 206	2.1 ± 0.3
Enalapril-fenil-D ₅	382 > 239	2.8 ± 0.3
Enalaprilato-fenil-D ₅	354 > 211	2.1 ± 0.3

3.3.13 Extração de enalapril e enalaprilato

Os procedimentos descritos a seguir foram aplicados não somente as amostras de quantificação senão também na extração das curvas de calibração e nos controles de qualidade.

1. colocar um número adequado de tubos de vidro em um rack;
2. dispensar os brancos, zeros, padrões, QCA, QCB e QCC (amostras de 500 mL de plasma humano) nos tubos;
3. Dispensar o padrão interno (50 µL da solução de 0,2 µg/mL de enalapril-fenil D5 e enalaprilato fenil D5) usando uma pipeta de repetição e misturar em vortex por aproximadamente 10 segundos;
4. Adicionar 400 µL de uma solução de ácido clorídrico usando pipeta de repetição e misturar em vortex por 10 segundos;
(cartuchos Oasis SPE em quantidade suficiente para o ensaio devem estar pré-acondicionados mediante lavagem com 1mL de metanol e 1 mL de solução de lavagem);

5. Colocar cartuchos Oasis em tubos de ensáio e eluir com 0,5 de metanol
6. Evaporar o solvente usando fluxo de nitrogênio a 40°C;
7. Dissolver o residuo com 0,2 mL água deionizada e misturar em vortex por 15 segundos para reconstituir os resíduos e transferir as soluções a placa de 96 poças usando pipetas automáticas com ponteiros descartáveis.;
8. Tampar os vials e colocá-los no auto-injetor.

3.3.14 Condições do espectrômetro de massas para enalapril e enalaprilato

O Quattro Micro opera em modo de eletrospray positivo de (ES+). Os seguintes íons foram monitorados (Multiple Reaction Monitoring; MRM):

Tabela 19: Condições do espectrômetro de massas para enalapril

	Íon precursor	Íon produto	Dwel time (s)	Voltagem Cone (V)	Energia de colisão (eV)
1	377	234	0.12	30	20
2	349	206	0.12	25	20
3	382	239	0.12	30	20
4	354	211	0.12	25	20

3.3.14.1 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após a validação de cada um dos métodos, os extratos de amostras foram quantificados seguindo uma seqüência de organização por voluntário.

3.4 Etapa estatística

3.4.1 DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS ESTATÍSTICOS

As análises estatísticas foram conduzidas após transformação logarítmica baseada em modelo aditivo para todos os valores de ASC e Cmax,.

Tmax, T½, Ke e Cl não foram avaliados estatisticamente.

Foi empregada análise de variância apropriada para o modelo de 2 períodos cruzados, sob os dados de ASC e Cmax transformados logaritmicamente, a qual levará em conta em seu modelo os efeitos de seqüência, voluntário dentro da seqüência, tratamento e período.

A verificação de existência de efeito residual foi realizada com base nos testes de seqüenciada ANOVA, utilizando-se como parâmetro o P_value obtido com base na F_stat do efeito de seqüência (Sequence Hypothesis of model effects).

Foram calculados os pontos paramétricos e estimativas dos intervalos da razão T/R (formulação "teste" / formulação "referência") ASC e Cmax. A biodisponibilidade relativa da formulação Teste versus Referência foi avaliada pelas razões das médias geométricas (pontos estimados). O intervalo de confiança de 90% serviu como estimativa de intervalo e será determinado por análises paramétricas (dois testes t unicaudais – p=0.05).

As formulações em estudo foram consideradas com biodisponibilidade equivalente quando o intervalo de confiança (IC) de 90% da média geométrica da ASC (no que diz respeito à extensão da absorção), Cmax (no que diz respeito à velocidade de absorção), se estivessem dentro do intervalo de 80-125% da média

geométrica da formulação referência (regras do FDA para estudos de bioequivalência e da Resolução 391/99 e Resolução 84/02 da ANVISA - MS).

No que se refere aos diferentes parâmetros de ASC, para efeito de decisão de bioequivalência, no relatório final, a análise considerou como variável alvo a ASC[0-last], desde que a parte avaliada seja superior a 80% da ASC(0-∞) em pelo menos 90% dos voluntários. Caso contrário, foi dada preferência à ASC(0-∞) para todos os voluntários, desde que a parte extrapolada da área total possa ser estimada com suficiente acurácia. O uso de um dos outros parâmetros de ASC, poderá ser empregado desde que devidamente justificado. A escolha de ASC(0-∞) também deverá ser justificada.

A entrada de dados e seu processamento inicial se dará através de arquivos MS Excel, com base nos dados derivados dos equipamentos de análise. Os dados brutos bem como os resultados das avaliações farmacocinéticas e estatísticas ficarão disponíveis em papel e em meio eletrônico.

4. RESULTADOS

4.1 Amlodipina

4.1.1 Validação amlodipina:

No caso da Amlodipina, os íons precursor e produto para o analito e o padrão interno foram os seguintes:

Tabela 20: íones precursores e produto para amlodipina

Precursor íon		Production
Amlodipina	409.28	238.03
Nifedipina	347.18	315.8

Com a seguinte fragmentação:

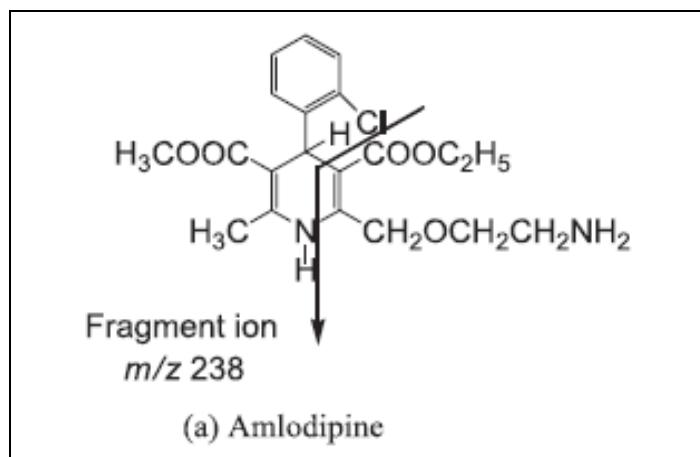


Figura 4: mecanismo de fragmenação da amlodipina

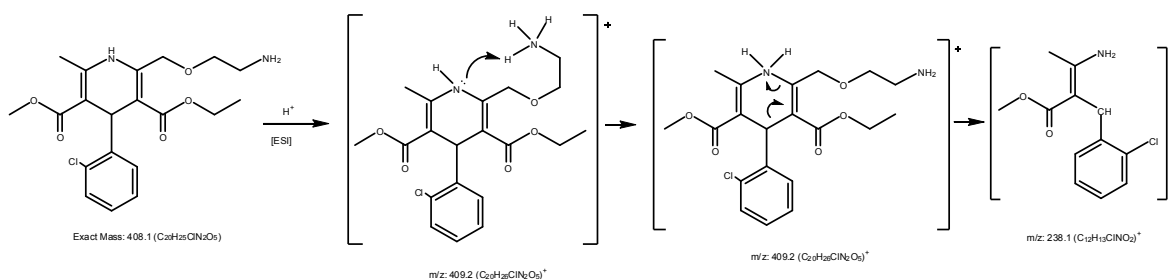


Figura 5: rota de fragmentação da amlodipina

No caso do padrão interno, nifedipina, a rota de fragmentação foi a seguinte:

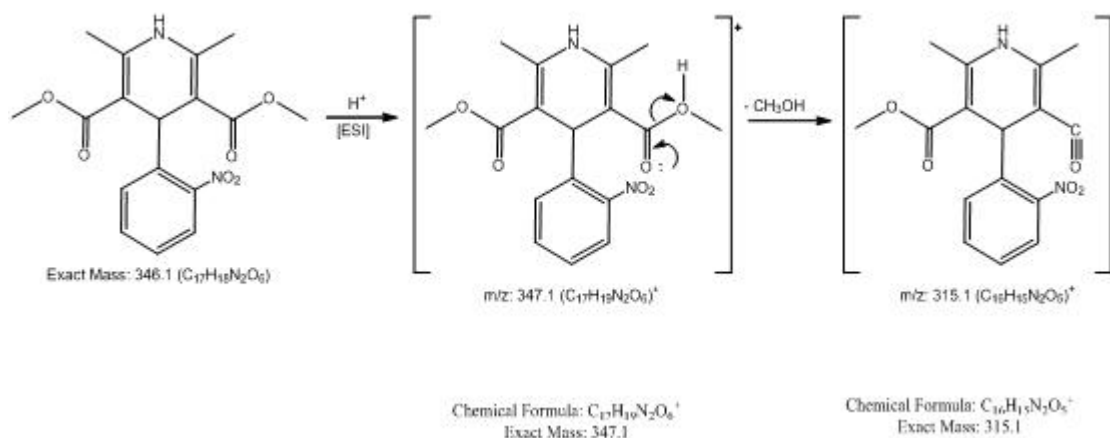


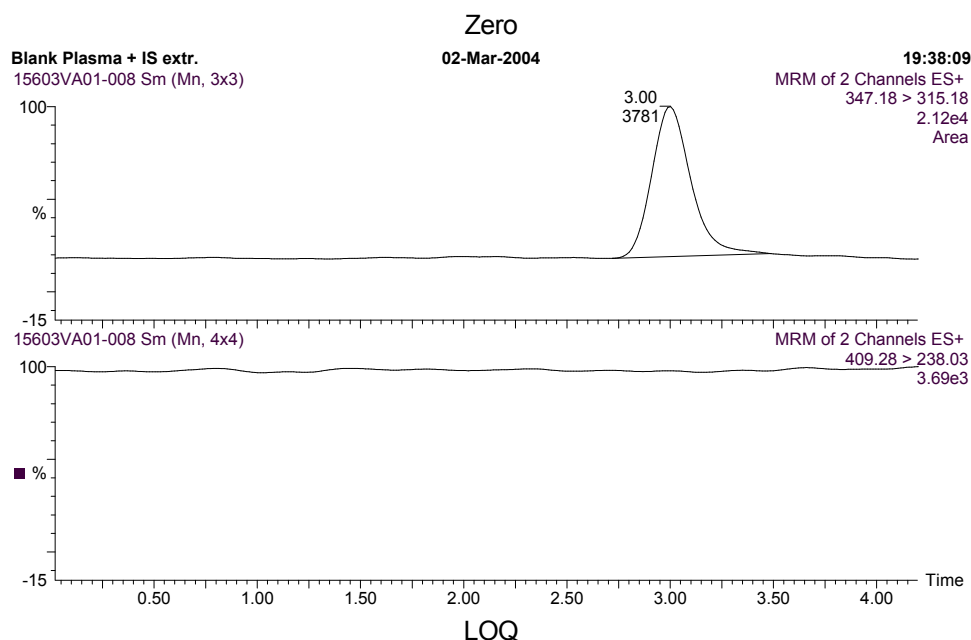
Figura 6: Rota de fragmentação do padrão interno nifedipina.

Após a validação do método, os extratos de amostras (extração fase líquida dietil-eter/hexanos (80/20; v/v); remoção e secagem da fase orgânica; reconstituição com um volume fixo de acetonitrila/água (50/50; v/v) + ácido fórmico (5 mM)) as amostras foram quantificadas seguindo uma sequência de organização por voluntário

O método teve um LIQ (limite inferior de quantificação) de 100 ng/mL e se comportou de forma linear ($y=a+bx$, com peso $1/x^2$) entre 0,1 ng/mL e 20 ng/mL.

4.1.1.1 Especificidade

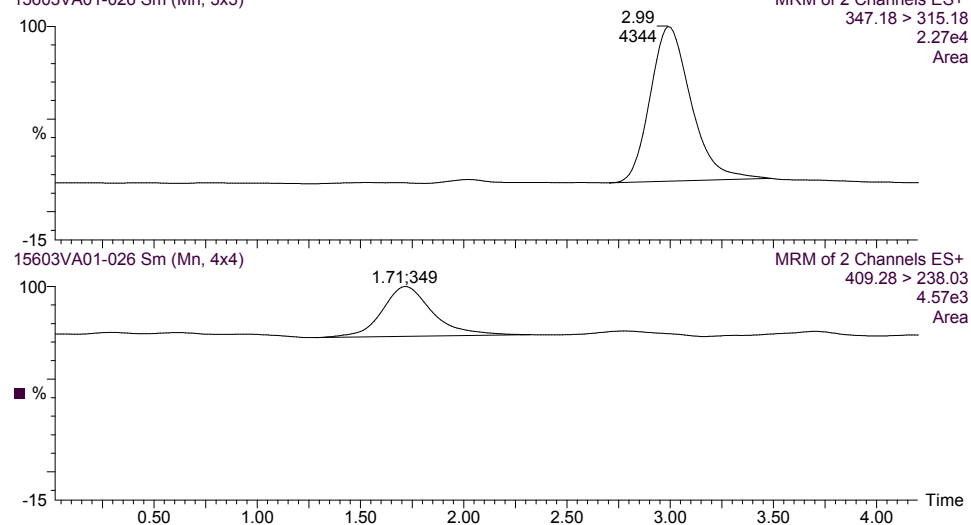
Cada amostra de branco foi testada para interferência usando o procedimento de extração descrito anteriormente e comparando os resultados obtidos com uma solução aquosa do analito numa concentração próxima ao limite de quantificação. Não foi detectada interferência significativa nos tempos de retenção do analito, metabólitos ou padrão interno, como mostram os cromatogramas a seguir para amostras zero, LIQ, QCA, QCB e QCC:



QL - Amlodipine 0.1ng/mL + IS in plasma extr.
15603VA01-026 Sm (Mn, 3x3)

02-Mar-2004

20:57:42

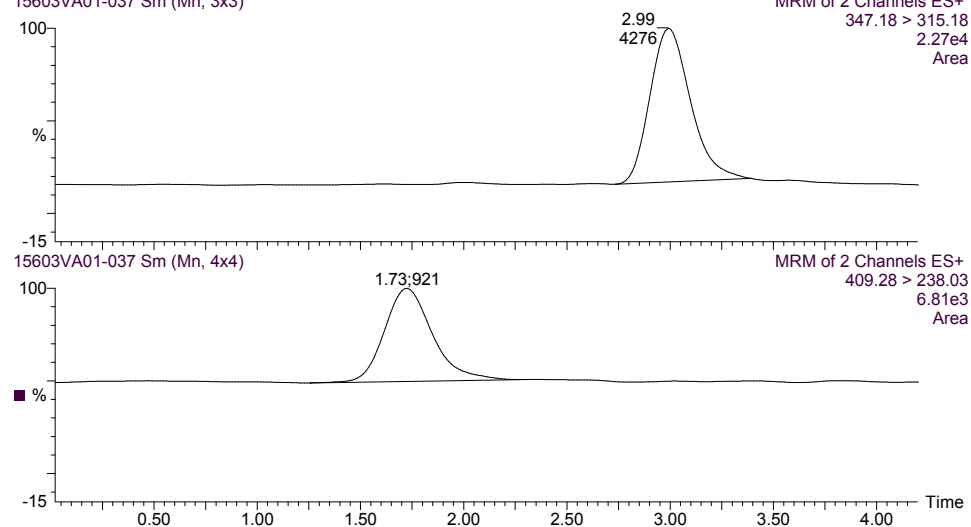


QCA

QCA - Amlodipine 0.3ng/mL + IS in plasma extr.
15603VA01-037 Sm (Mn, 3x3)

02-Mar-2004

21:46:18



QCB

Resultados

- 90 -

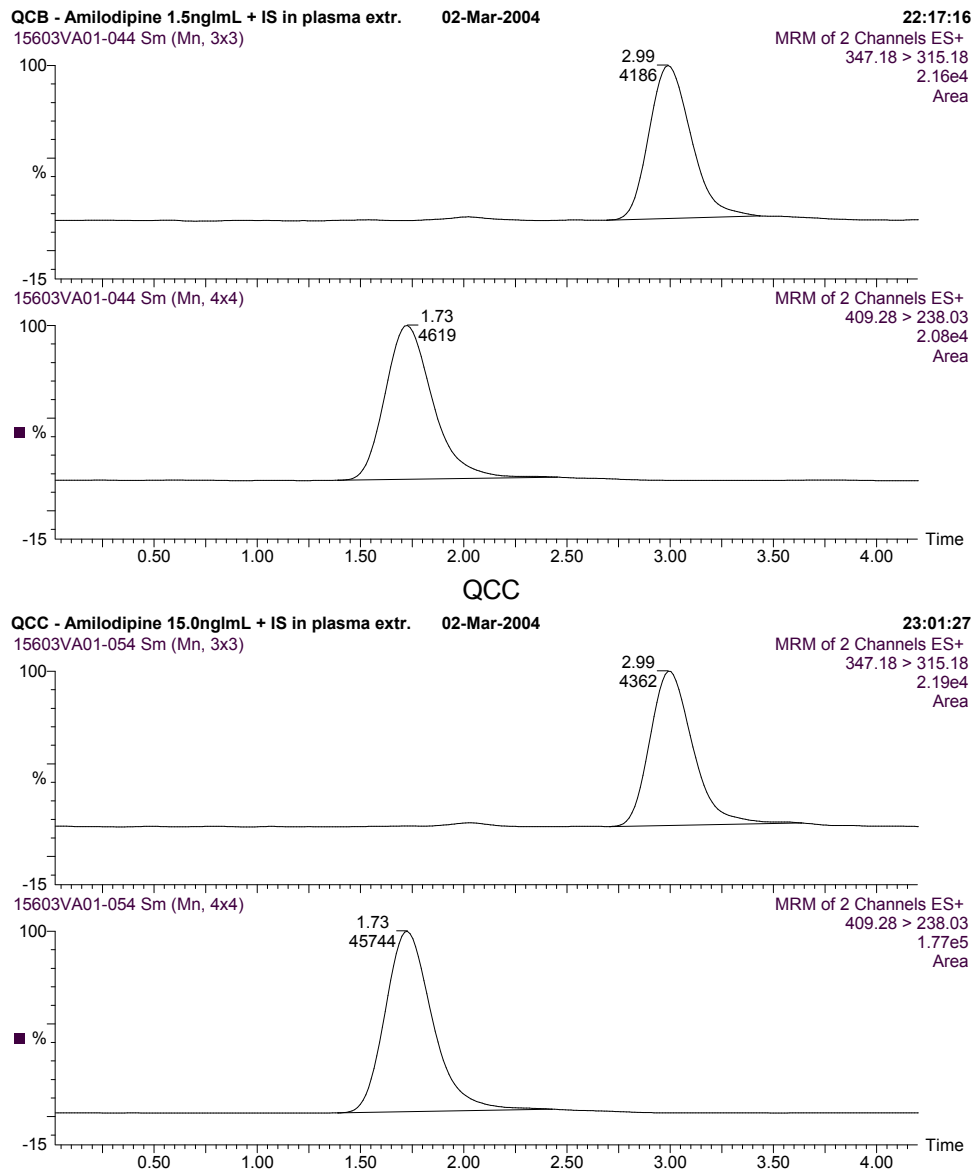


Figura 7: Picos representativos para amostras zero, LIQ, QCA, QCB e QCC (analito e padrão interno).

4.1.1.2 Curva de calibração

Para definir a relação entre concentração e resposta, curvas de calibração contendo 8 pontos diferentes de zero foram preparadas.

A linearidade da curva de calibração foi desenvolvida para atingir os seguintes critérios:

Desvio <20% a partir da concentração nominal do LIQ para ao menos uma das duplicatas

Desvio <15% dos pontos dos padrões a partir das concentrações nominais, excetuando o LIQ

Ao menos 75% dos pontos dos padrões de cada concentração nominal devem atingir os critérios mencionados anteriormente

Coeficiente de co-relação igual ou superior a 0,98.

Dados específicos de três curvas de calibração são apresentados na seguinte tabela:

Tabela 21: Curvas de calibração de amlodipina

Conc. Nominal (in ng/mL)	Conc. obtida (in ng/mL)			Média (em ng/mL)	Exatidão (%)	CV (%)	Condição de aprovação
	Nome da lista						
	15603VA01	15603VA02	15603VA04				
Modelo de regressão			y = a + bx (1/x^2)				
0.100	0.0821	0.0951	0.101	0.0927	92.7	10.4	Sim
	0.114	0.101	0.0978	0.104	104.3	8.2	
0.200	0.196	0.218	0.220	0.211	105.7	6.3	Sim
	0.206	0.206	0.197	0.203	101.5	2.6	
0.500	0.562	0.520	0.496	0.526	105.2	6.4	Sim
	0.571	0.672*	0.493	0.532	106.4	10.4	
1.00	0.900	0.882	0.927	0.903	90.3	2.5	Sim
	0.926	0.902	0.894	0.907	90.7	1.8	
2.00	1.79	1.99	1.82	1.87	93.3	5.8	Sim
	1.90	1.83	1.79	1.84	92.0	3.0	
5.00	4.66	4.72	4.57	4.65	93.0	1.6	Sim
	5.09	5.46	5.68	5.41	108.2	5.5	
10.0	9.7	10.5	10.7	10.3	103.1	4.9	Sim
	10.3	10.5	10.7	10.5	105.0	1.9	
20.0	21.0	21.0	21.6	21.2	106.0	1.6	Sim
	21.7	28.6*	21.0	21.4	106.8	2.3	
Corr.	0.9992	0.9997	0.9993	-			-

Compound 1 name: Amlodipine Method File: 15603VA01
Coefficient of Determination: 0.994645
Calibration curve: $0.767889 \times x + -2.19794e-5$
Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None

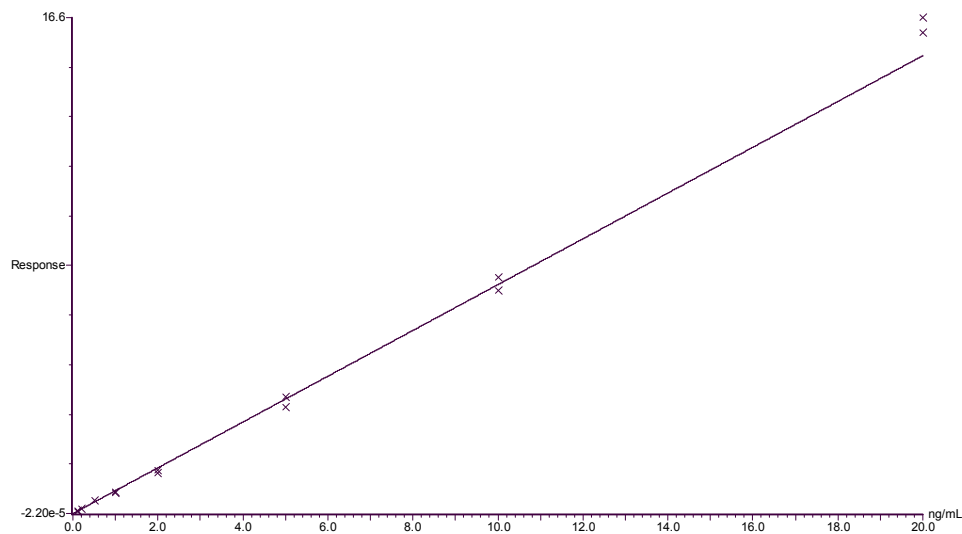


Figura 8: curva de calibração representativa para amlodipina.

4.1.1.3 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão do método analítico, três concentrações diferentes na faixa de concentrações esperadas foram avaliadas, usando oito determinações por concentração.

VALIDAÇÃO AMLODIPINA – LISTAS DE VALIDAÇÃO

Tabela 22: listas de validação para amlodipina

Amostra	QCA			QCB			QCC		
Lista	15603V A01	15603V A02	15603V A04	15603V A01	15603V A02	15603V A04	15603V A01	15603V A02	15603V A04
Concentração medida (ng/mL)	0.298	0.309	0.289	1.32	1.45	1.71	12.9	13.8	15.6
	0.319	0.396	0.286	1.34	1.48	1.65	13.3	14.5	14.0
	0.254	0.266	0.267	1.44	1.74	1.64	13.8	14.5	14.0
	0.280	0.264	0.296	1.48	2.15	1.79	13.7	15.3	14.0
	0.247	0.263	0.287	1.30	1.30	1.63	13.7	15.7	13.8
	0.271	0.259	0.285	1.36	1.39	1.65	14.7	19.8	14.4
	0.275	0.272	0.291	1.30	1.40	1.57	14.4	13.9	13.6
	0.262	0.274	0.371	1.31	1.34	1.53	13.5	14.1	13.4
Média intra-lista (ng/mL)	0.276	0.288	0.296	1.36	1.53	1.65	13.8	15.2	14.1
Precisão intra-lista (CV %)	8.6	16.1	10.5	5.0	18.5	4.8	4.2	13.0	4.8
Exatidão intra-lista (%)	91.9	96.0	98.8	90.4	102.1	109.8	91.7	101.3	94.0
Média inter-lista (ng/mL)	0.287			1.51			14.4		
Precisão inter-lista (CV%)	12.1			13.7			9.4		
Exatidão inter-lista (%)	95.6			100.8			95.7		

4.1.1.4 Determinação do Limite inferior de quantificação do método para amlodipina

O limite inferior de quantificação foi definido considerando a sensibilidade, precisão e exatidão do método. Para avaliar precisão e exatidão, controles de qualidade específicos foram incluídos no processo de validação. Embora a

sensibilidade foi suficientemente boa para quantificar valores ainda menores, as medidas foram tomadas para garantir um LIQ próximo a 1-3% do Cmax previsto.

Nesta condição, o LIQ validado para o método de quantificação de amlodipina foi de 0,1 ng/mL. Dados específicos na tabela a continuação:

Tabela 23: Validação de LIQ para amlodipina

Valor esperado	0.100 ng/mL		
Nome da lista	15603VA01	15603VA02	15603VA04
Concentração medida (em ng/mL)	0.105	0.070	0.088
	0.096	0.074	0.115
	0.097	0.082	0.119
	0.086	0.079	0.131
	0.098	0.084	0.094
	0.111	0.082	0.104
	0.100	0.102	0.105
	0.102	0.098	0.102
Média (em ng/mL)	0.099	0.084	0.107
Precisão (CV%)	7.4	13.3	13.0
Exatidão (%)	99.3	83.9	107.2
Média inter-lista (in ng/mL)	0.0968		
CV inter-lista (%)	15.0		
Exatidão inter-lista (%)	96.8		

4.1.1.5 Considerações de estabilidade para amlodipina

Os testes de estabilidade provaram que o método foi estável para ao menos 48 (pós-processamento), 3 ciclos de congelamento e descongelamento, 7 horas (curta duração), 80 dias (longa duração) e a solução mãe não sofreu degradação significativa pelo menos durante 23 dias.

4.1.2 Quantificação amlodipina:

As concentrações plasmáticas de amlodipina foram determinadas por um método validado de HPLC-MS-MS.

Tabela 24: Sequência de voluntários quantificados por lista para amlodipina

Código de lista das amostras	Voluntários quantificados na lista	Tamanho da lista	Status
14803ALAD01	Vols. 01-02-03-04	148	Aprovado
14803ALAD02	Vols. 06-07-08-09-10	151	Aprovado
14803ALAD03	Vols. 11-12-13-14	148	Aprovado
14803ALAD04	Vols. 15-16-17-18	152	Aprovado
14803ALAD05	Vols. 19-20-21-22	153	Aprovado
14803ALAD06	Vols. 23-24-25-26	129	Rejeitado
14803ALAD07	Vols. 27-28-29-30	153	Aprovado
14803ALAD08	Vols. 31-32-33-34-36	168	Aprovado
14803ALRE01	Vols. 23-24-25-26	129	Aprovado

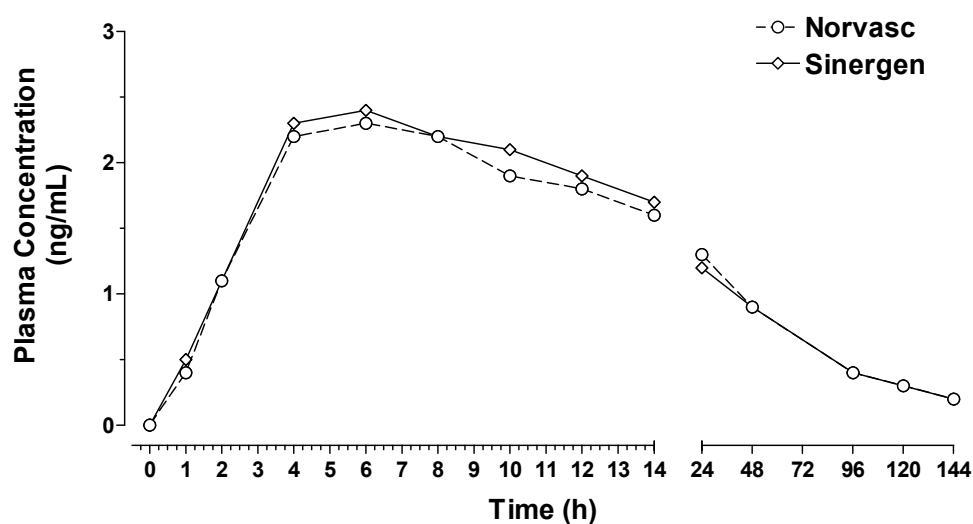


Figura 9: curva cinética média para amlodipina

Tabela 25: parâmetros obtidos para amlodipina

AUC0-inf	Referencia 1				Teste 2			
	Média	DP	Min	Max	Média	DP	Min	Max
	120	46	56	241	120	47	67	300
AUC 0-Tlast	104	35	46	192	105	37	60	254
AUC 0-all	107	34	48	192	108	37	62	254
Cmax	2.51	0.59	1.58	4.13	2.64	0.86	1.75	6.10
Clast	0.23	0.12	0.11	0.63	0.23	0.12	0.10	0.56
Tlast (h)	144.00	18.96	96.00	145.90	144.00	19.23	96.00	145.75
Tmax (h)	6.00	1.89	4.00	12.00	6.00	3.00	4.00	14.00
T/2 (h)	43.49	16.43	26.11	96.32	41.44	10.21	28.13	66.22
Ke(1/h)	0.018	0.005	0.007	0.027	0.018	0.004	0.011	0.025

Trinta voluntários foram incluídos na avaliação de bioequivalência.

A relação da média geométrica do Cmax de amlodipina em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) foi 106.57% (90% CI= 100.29 - 113.25) referente a Amlodipina em Norvasc® (5 mg - Amlodipina comprimido).

A relação da média geométrica para AUClast de Amlodipina em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) foi 102.68% (90% CI= 96.77 - 108.95) referente a Amlodipina em Norvasc® (5 mg - Amlodipina comprimido).

A relação da média geométrica para AUC0-144h do Amlodipina em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) foi 102.01% (90% CI= 96.19 - 108.17) referente a Amlodipina em Norvasc® (5 mg - Amlodipina comprimido).

A relação da média geométrica para AUCinf de Amlodipina em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) foi 101.79% (90% CI= 96.56 - 107.31) referente a Amlodipina em Norvasc® (5 mg - Amlodipina comprimido).

4.2 Enalapril / enalaprilato

4.2.1 Validação enalapril e enalaprilato

No caso dos analitos enalapril e enalaprilato, os íons precursor e produto para o analito e o padrão interno foram os seguintes:

Tabela 26: íones precursores e produto para enalapril e enalaprilato

	Ion Precursor	Ion Produto
Enalapril	377	234
Enalaprilato	349	206
Fenil D5 Enalapril	382	239
Fenil D5 Enalaprilato	354	211

ENALAPRIL – MECANISMOS DE FRAGMENTAÇÃO

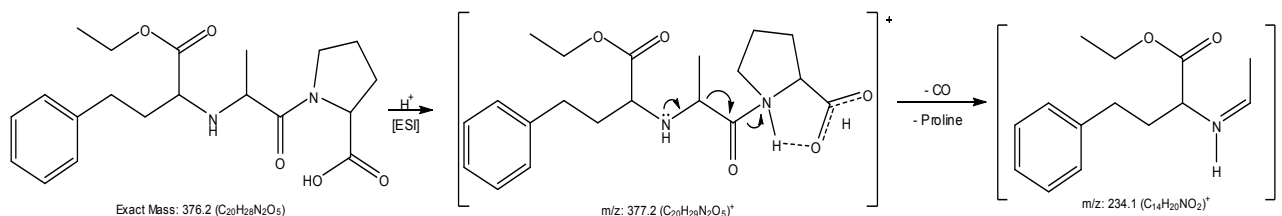


Figura 10: rota de fragmentação do enalapril

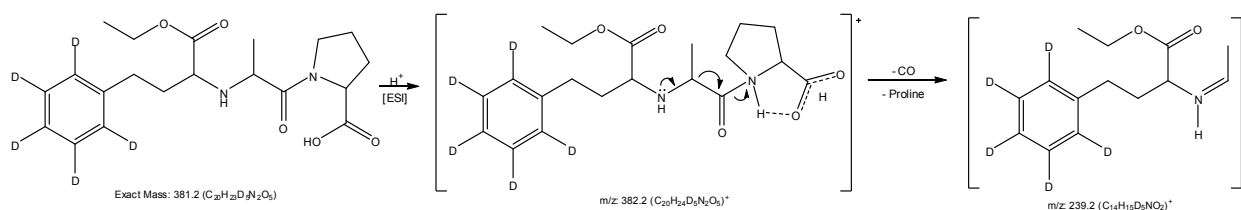


Figura 11: rota de fragmentação do enalaprilato

4.2.1.1 Especificidade

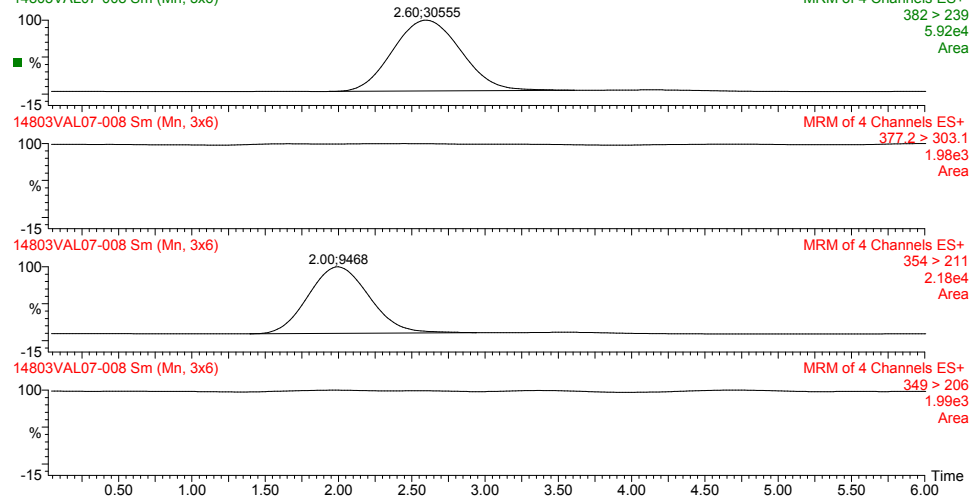
Cada amostra de branco foi testada para interferência usando o procedimento de extração descrito anteriormente e comparando os resultados obtidos com uma solução aquosa do analito numa concentração próxima ao limite de quantificação. Não foi detectada interferência significativa nos tempos de retenção do analito, metabólitos ou padrão interno, como mostram os cromatogramas a seguir para amostras zero, LIQ, QCA, QCB e QCC:

Zero

Blank Plasma + IS extr.
14803VAL07-008 Sm (Mn, 3x6)

23-Apr-2004

23:35:49

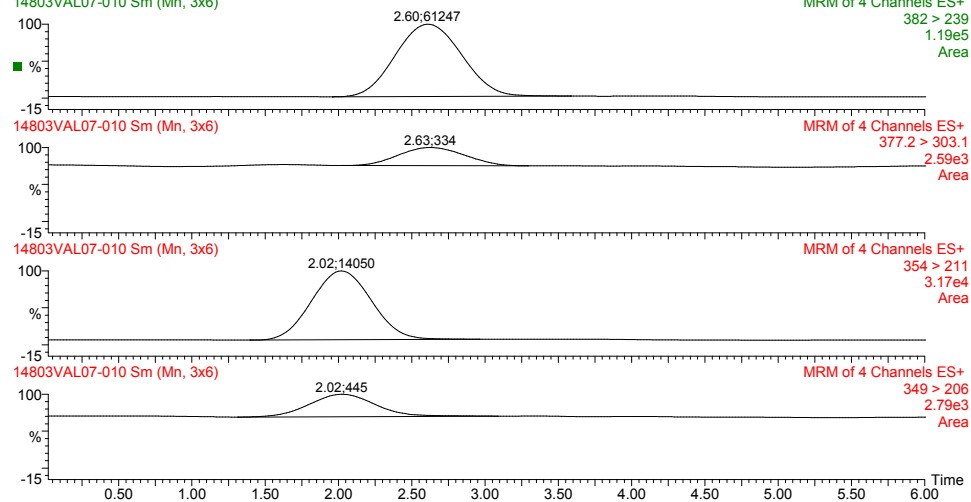


LOQ

Mix - Enalapril/Enalaprilat 0.5ng/mL + IS in Plasma extr.

14803VAL07-010 Sm (Mn, 3x6)

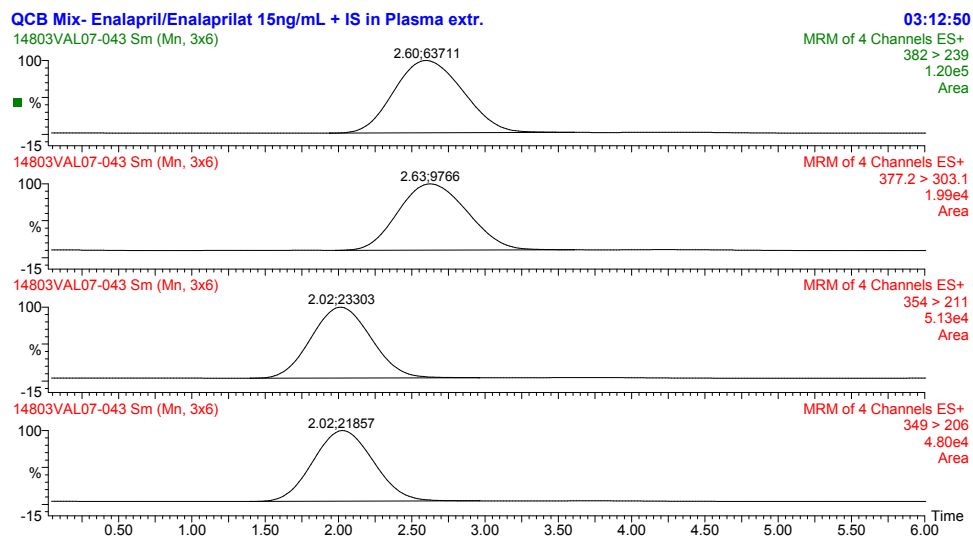
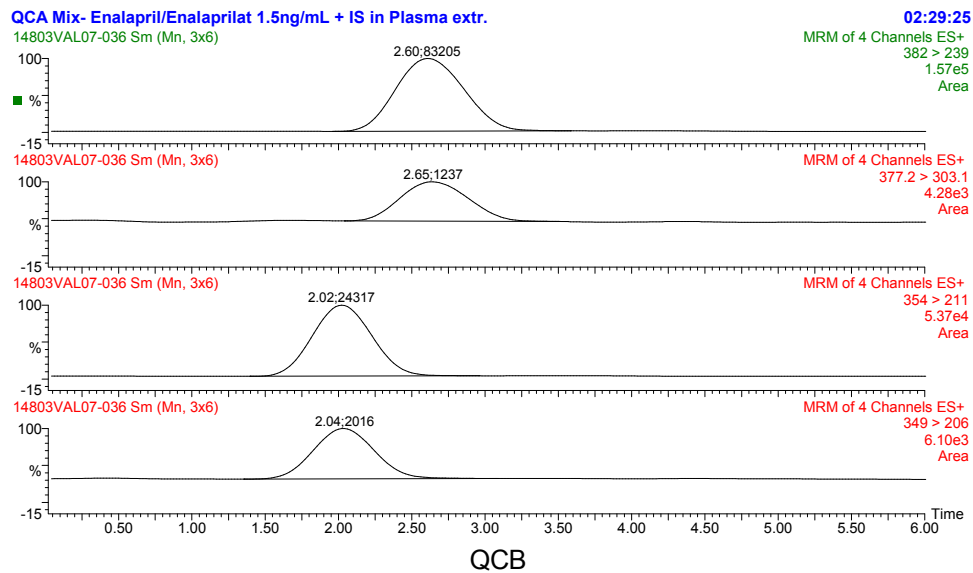
23:48:14



QCA

Resultados

- 100 -



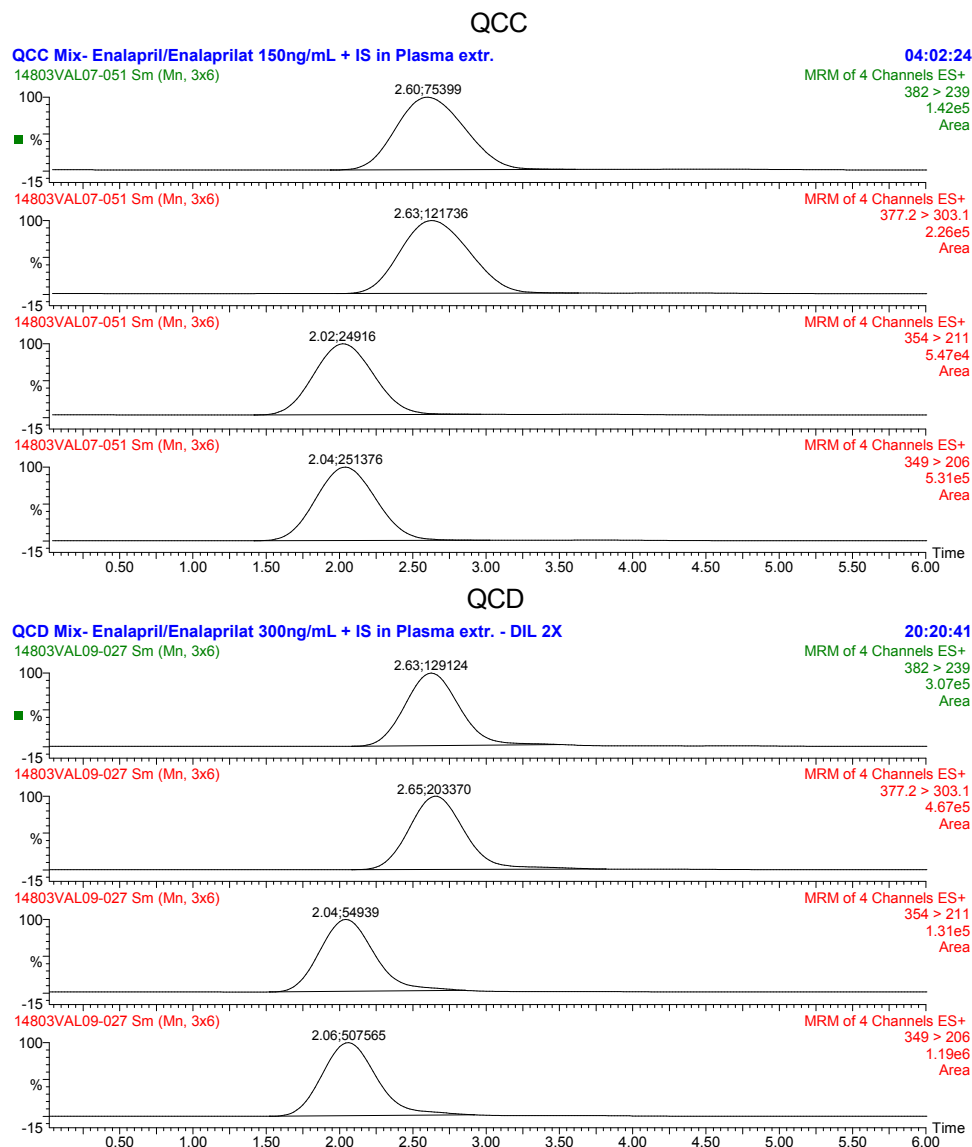


Figura 12: Picos representativos para as amostras de zero, LIQ, QCA, QCB, QCC e QCD (Analito e padrão interno)

4.2.1.2 Curva de calibração

Para definir a relação entre concentração e resposta, curvas de calibração contendo 8 pontos diferentes de zero foram preparadas.

A linearidade da curva de calibração foi desenvolvida para atingir os seguintes critérios:

Desvio <20% a partir da concentração nominal do LIQ para ao menos uma das duplicatas

Desvio <15% dos pontos dos padrões a partir das concentrações nominais, excetuando o LIQ

Ao menos 75% dos pontos dos padrões de cada concentração nominal devem atingir os critérios mencionados anteriormente

Coeficiente de co-relação igual ou superior a 0,98.

Dados específicos de três curvas de calibração são apresentados na seguinte tabela:

Tabela 27: Curvas de calibração de amlodipina

Tabela 27 - Curvas de calibração de ampicilina							
Conc. Nominal (in ng/mL)	Conc. obtida (em ng/mL)			Média (em ng/mL)	Exatidão (%)	CV (%)	Condição de aprovação
	Nome da lista						
	9503VA01A	9503VA02A	9503VA03A				
Modelo de regressão			Y=A+Bx (1/x^2)				
0.500	0.502	0.538	0.504	0.515	102.9	3.9	Yes
	0.508	0.471	0.501	0.493	98.7	4.0	
1.00	1.02	0.989	1.030	1.01	101.3	2.1	Yes
	0.952	0.987	0.995	0.978	97.8	2.3	
2.00	1.97	2.01	1.930	1.97	98.5	2.0	Yes
	2.00	1.96	1.910	1.96	97.8	2.3	
10.0	10.0	10.1	9.890	10.00	100.0	1.1	Yes
	10.1	9.960	10.1	10.1	100.5	0.8	
20.0	17.3	19.4	20.1	18.9	94.7	7.7	Yes
	20.1	19.3	19.6	19.7	98.3	2.1	
50.0	50.8	50.8	51.8	51.1	102.3	1.1	Yes
	51.7	49.9	49.1	50.2	100.5	2.7	
100	102	101	103	102	102.0	1.0	Yes
	102	102	98.9	101	101.0	1.8	
200	206	203	203	204	102.0	0.8	Yes
	204	205	204	204	102.2	0.3	
Corr.	0.99988	0.99999	0.99996	-			-

Compound 1 name: ENALAPRIL Method File: 9503VA03A
Coefficient of Determination: 0.999525
Calibration curve: $0.0388195 \cdot x + -0.000103167$
Response type: Internal Std (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None

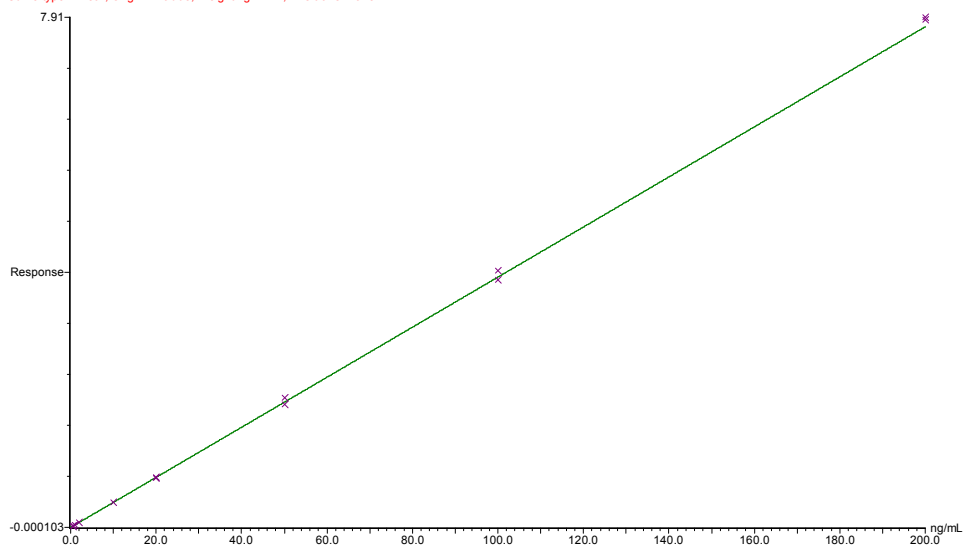


Figura 13: Curva de calibração representativa para enalapril.

O método teve um LIQ (limite inferior de quantificação) de 0,5 ng/mL e se comportou de forma linear ($y=a+bx$, com peso $1/x^2$) entre 0,5 ng/mL e 200 ng/mL.

Compound 2 name: ENALAPRILAT Method File: 9503VA03A
Coefficient of Determination: 0.996729
Calibration curve: $0.0494797 \cdot x + -0.00174954$
Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x², Axis trans: None

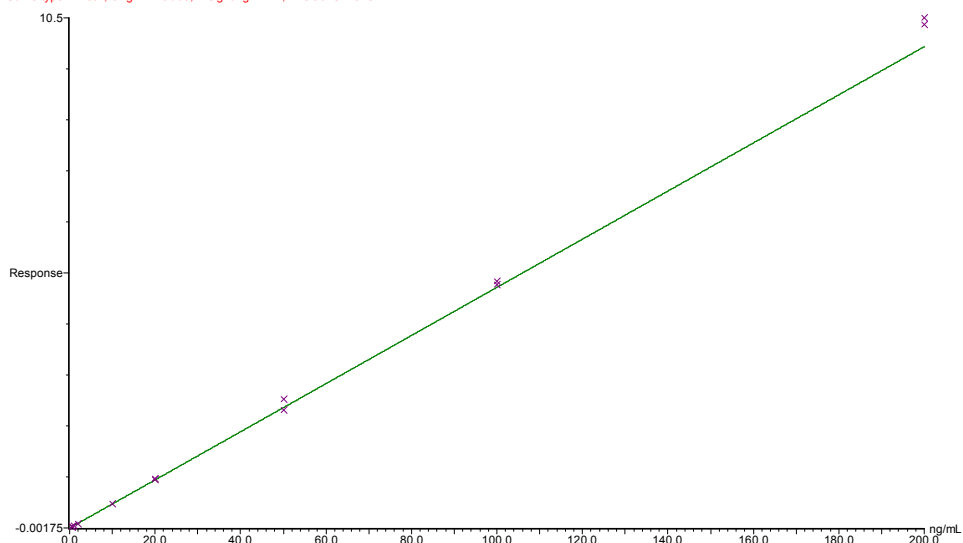


Figura 14: Curva de calibração representativa para enalaprilato

4.2.1.3 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão do método analítico, três concentrações diferentes na faixa de concentrações esperadas foram avaliadas, usando oito determinações por concentração.

Tabela 28: listas de validação de enalapril

Amostra	QCA			QCB			QCC		
Lista	9503VA01A	9503VA02A	9503VA03A	9503VA01A	9503VA02A	9503VA03A	9503VA01A	9503VA02A	9503VA03A
Concentração medida (ng/mL)	1.38	1.50	1.60	14.3	15.3	15.5	142	150	162
	1.34	1.53	1.61	14.0	14.8	15.7	142	152	154
	1.31	1.45	1.51	14.0	14.9	16.0	144	150	158
	1.43	1.51	1.58	13.9	14.6	16.0	141	151	162
	1.33	1.52	1.56	14.1	14.8	15.6	142	150	166
	1.31	1.48	1.57	14.2	14.8	15.3	141	151	155
	1.35	1.48	1.61	13.7	14.8	15.7	141	148	156
	1.38	1.53	1.55	14.0	14.8	15.3	141	150	158
Média intra-lista (ng/mL)	1.35	1.5	1.57	14.0	14.8	15.6	142	150	159
Precisão intra-lista (CV %)	3.0	1.9	2.2	1.3	1.3	1.7	0.7	0.8	2.6
Exatidão intra-lista (%)	90.3	100.0	104.9	93.5	99.0	104.3	94.5	100.2	105.9
Média inter-lista (ng/mL)	1.48			14.8			150		
Precisão inter-lista (CV%)	6.7			4.8			5.0		
Exatidão inter-lista (%)	98.4			98.9			100.2		

O método teve um LIQ (limite inferior de quantificação) de 0,5 ng/mL e se comportou de forma linear ($y=a+bx$, com peso $1/x^2$) entre 0,5 ng/mL e 200 ng/mL.

Tabela 29: listas de validação de enalaprilato

Amostra	QCA			QCB			QCC		
Lista	9503VA01A	9503VA02A	9503VA03A	9503VA01A	9503VA02A	9503VA03A	9503VA01A	9503VA02A	9503VA03A
Concentração medida (ng/mL)	1.34	1.47	1.46	14.5	15.4	15.9	148	152	162
	1.37	1.38	1.37	14.7	15.4	15.1	148	150	162
	1.34	1.45	1.48	14.8	14.7	16.1	145	150	164
	1.4	1.42	1.56	14.3	15.2	16.4	148	152	163
	1.32	1.38	1.47	15.2	15.3	15.7	149	151	172
	1.40	1.50	1.43	14.3	14.8	15.8	147	152	160
	1.45	1.52	1.47	14.5	15.1	15.7	146	150	156
	1.4	1.42	1.45	15.0	14.8	15.1	147	149	167
Média intra-lista (ng/mL)	1.38	1.44	1.46	14.7	15.1	15.7	147	151	163
Precisão intra-lista (CV %)	3.1	3.6	3.6	2.2	1.9	2.9	0.9	0.8	2.9
Exatidão intra-lista (%)	91.8	96.2	97.4	97.8	100.6	104.8	98.2	100.5	108.8
Média inter-lista (ng/mL)	1.43			15.2			154		
Precisão inter-lista (CV%)	4.2			3.7			4.9		
Exatidão inter-lista (%)	95.1			101.1			102.5		

O método teve um LIQ (limite inferior de quantificação) de 0,5 ng/mL e se comportou de forma linear ($y=a+bx$, com peso $1/x^2$) entre 0,5 ng/mL e 200 ng/mL.

4.2.1.4 Determinação do Limite inferior de quantificação do método para enalapril

O limite inferior de quantificação foi definido considerando a sensibilidade, precisão e exatidão do método. Para avaliar precisão e exatidão, controles de qualidade específicos foram incluídos no processo de validação. Embora a sensibilidade foi suficientemente boa para quantificar valores ainda menores, as medidas foram tomadas para garantir um LIQ próximo a 1-3% do Cmax previsto:

Tabela 30: Validação de LIQ para enalapril

Valor esperado	0.500 ng/mL		
Nome da lista	9503VA01A	9503VA02A	9503VA03A
Concentração média (em ng/mL)	0.457	0.531	0.558
	0.465	0.538	0.544
	0.83	0.491	0.524
	0.461	0.496	0.535
	0.488	0.51	0.536
	0.479	0.496	0.549
	0.443	0.474	0.499
	0.453	0.505	0.499
Média(em ng/mL)	0.51	0.505	0.53
Precisão (CV%)	25.6	4.2	4.1
Exatidão (%)	101.9	101.0	106.1
Média inter-lista (in ng/mL)	0.515		
CV inter-lista (%)	14.5		
Exatidão Inter-lista (%)	103.0		

Tabela 31: Validação de LIQ para enalaprilato

Valor esperado	0.500 ng/mL		
Nome da lista	9503VA01A	9503VA02A	9503VA03A
Concentração medida (em ng/mL)	0.588	0.696	0.759
	0.505	0.641	0.719
	0.473	0.523	0.621
	0.609	0.500	0.565
	0.479	0.533	0.59
	0.466	0.516	0.489
	0.487	0.465	0.516
	0.426	0.503	0.509
Média(em ng/mL)	0.504	0.547	0.596
Precisão (CV%)	12.4	14.4	16.6
Exatidão (%)	100.8	109.4	119.2
Média inter-lista (in ng/mL)	0.549		
CV inter-lista (%)	15.8		
Exatidão Inter-lista (%)	109.8		

4.2.1.5 Considerações de estabilidade para enalapril e enalaprilato

Os testes de estabilidade provaram que o método foi estável para ao menos 72 (pós-processamento), 3 ciclos de congelamento e descongelamento, 6 horas (curta duração), 114 dias (longa duração) e a solução mãe não sofreu degradação significativa pelo menos durante 114 dias.

4.2.2 Quantificação enalapríl

Tabela 32: Sequência de voluntários quantificados por lista para enalapríl

Código de lista das amostras	Voluntários quantificados na lista	Tamanho da lista	Status
14803LAD01	Vols. 01-02-03-04	138	Aprovado
14803LAD02	Vols. 06-08-09-10	140	Aprovado
14803LAD03	Vols. 11-12-13-14	138	Aprovado
14803LAD04	Vols. 15-16-17-18	141	Aprovado
14803LAD05	Vols. 19-20-21-22	139	Aprovado
14803LAD06	Vols. 23-24-25-26	139	Aprovado
14803LAD07	Vols. 27-28-29-30	140	Aprovado
14803LAD08	Vols. 31-32-33-35	151	Aprovado
14803LRE01	Pontos de diluição	42	Aprovado

Tabela 33: Sequência de voluntários quantificados por lista para enalaprílato

Código de lista das amostras	Voluntários quantificados na lista	Tamanho da lista	Status
14803LAD01	Vols. 01-02-03-04	138	Aprovado
14803LAD02	Vols. 06-08-09-10	140	Aprovado
14803LAD03	Vols. 11-12-13-14	138	Aprovado
14803LAD04	Vols. 15-16-17-18	141	Aprovado
14803LAD05	Vols. 19-20-21-22	139	Aprovado
14803LAD06	Vols. 23-24-25-26-34	139	Aprovado
14803LAD07	Vols. 27-28-29-30	140	Aprovado
14803LAD08	Vols. 31-32-33-35-36	151	Aprovado

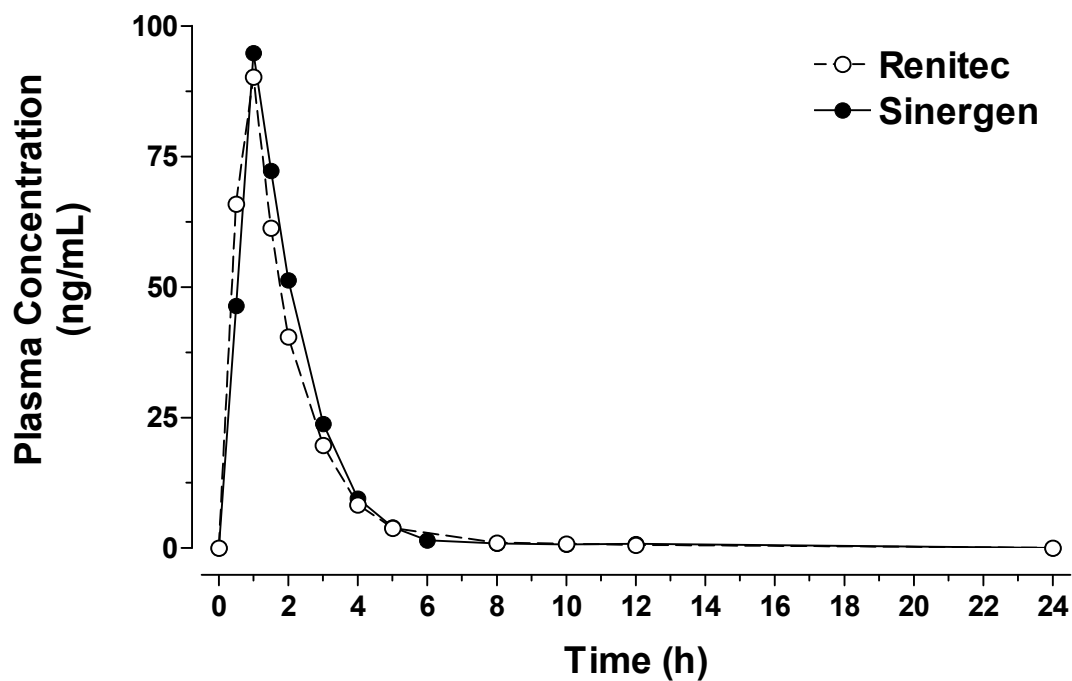


Figura 15: Curva cinética média de enalapril

Tabela 34: parâmetros obtidos para enalapril

	Renitec				Sinergen			
	Média	DP	Min	Max	Média	DP	Min	Max
AUC0-inf	170.04	61.49	67.35	304.48	182.81	73.88	66.21	382.18
AUC 0-Tlast	168.46	61.38	66.15	301.30	181.20	73.87	65.45	380.39
AUC 0-all	175.65	61.54	67.79	304.75	189.13	74.33	65.97	386.33
Cmax	100.78	37.57	35.80	203.00	111.62	45.58	26.10	209.00
Clast	1.08	0.60	0.53	2.45	0.96	0.78	0.50	3.74
Tlast (h)	8.00	2.60	5.00	12.02	8.00	2.21	5.00	12.00
Tmax (h)	1.00	0.52	0.50	3.00	1.00	0.44	0.50	2.00
T/2 (h)	1.23	0.77	0.64	3.83	0.64	0.24	0.13	1.12
Ke(1/h)	0.70	0.27	0.18	1.08	1.34	0.90	0.62	5.34

4.2.3 Quantificação enalaprilato

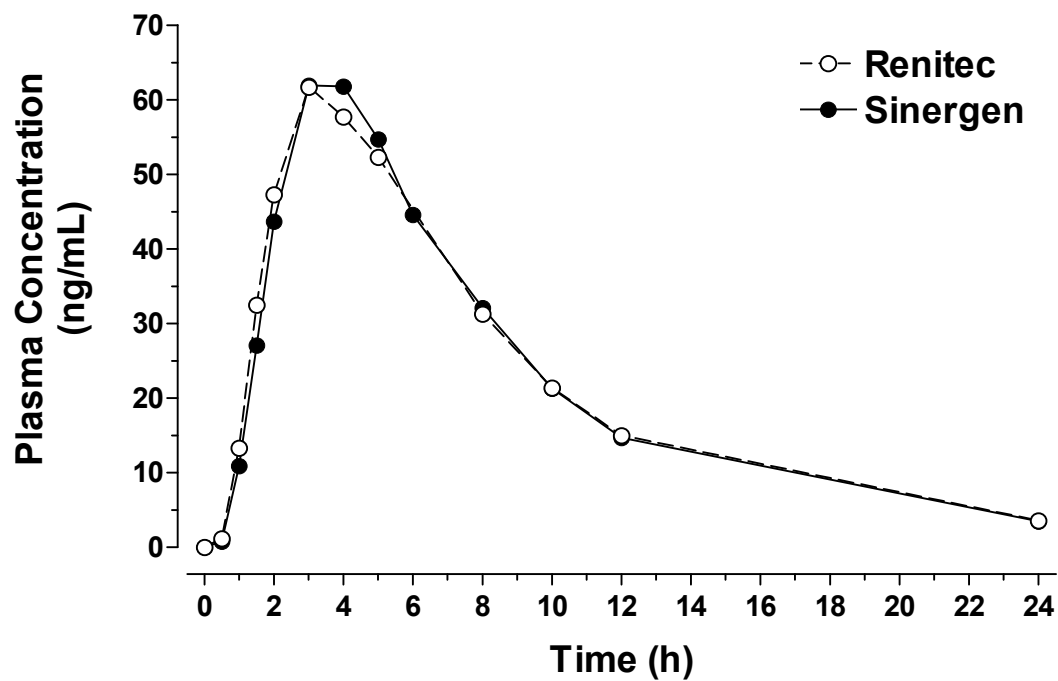


Figura 16: Curva cinética média para enalaprilato

Tabela 35: parâmetros obtidos para enalaprilato

	Renitec				Sinergen			
	Média	DP	Min	Max	Média	DP	Min	Max
AUC0-inf	535	141	263	889	539	142	306	1007
AUC 0-Tlast	506	138	247	867	510	144	289	994
AUC 0-all	526	138	247	867	530	144	289	994
Cmax	65.28	26.25	28.00	166.00	66.96	32.05	28.90	190.00
Clast	3.53	1.49	1.60	6.67	3.46	1.43	1.74	7.33
Tlast (h)	24.00	0.00	24.00	24.00	24.00	0.00	24.00	24.00
Tmax (h)	3.00	1.26	2.00	8.00	4.00	0.92	2.00	5.02
T/2 (h)	5.54	0.74	4.44	7.20	0.13	0.02	0.10	0.18
Ke(1/h)	0.13	0.02	0.10	0.16	5.53	0.99	3.88	7.28

Trinta e um voluntários foram incluídos na avaliação de bioequivalência.

A conclusão de bioequivalência baseou-se somente na análise estatística de enalapril.

A relação da média geométrica do Cmax de Enalapril em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) foi 102.01% (90% CI= 91.01 - 114.35) referente a Enalapril em Renitec® (20 mg - Enalapril comprimido).

A relação da média geométrica do AUClast de Enalapril em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) foi 102.88% (90% CI= 94.81 - 111.64) referente a Enalapril em Renitec® (20 mg - Enalapril comprimido)

A relação da média geométrica do AUC0-24h de Enalapril em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) foi 103.11% (90% CI= 95.04 - 111.87) referente a Enalapril em Renitec® (20 mg - Enalapril comprimido).

A relação da média geométrica do AUCinf de Enalapril em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – capsule) foi de 102.90% (90% CI= 94.92 - 111.56) referente a Enalapril em Renitec® (20 mg - Enalapril tablet).

A relação da média geométrica do Cmax Enalaprilato em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – capsule) foi 101.62% (90% CI= 92.00 - 112.24) referente a Enalaprilato em Renitec® (20 mg - Enalapril comprimido).

A relação da média geométrica do AUClast do Enalaprilato em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) foi 101.81% (90% CI= 93.94 - 110.34) referente a Enalaprilato em Renitec® (20 mg - Enalapril comprimido).

A relação da média geométrica do AUC0-24h do Enalaprilato in Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) foi 101.63% (90% CI= 93.46 - 110.51) referente a Enalaprilato em Renitec® (20 mg - Enalapril comprimido).

A relação da média geométrica do AUCinf Enalaprilat in Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) foi 101.61% (90% CI= 93.38 - 110.57) referente a Enalaprilato em Renitec® (20 mg - Enalapril comprimido).

Considerando que a relação de Cmax e AUClast (90% CI) esteve dentro do intervalo de 80-125% proposto pela Food and Drug Administration Agency (FDA) e ANVISA, conclui-se que a formulação de Enalapril em Sinergen (5/20 mg – Amlodipina/Enalapril – cápsula) elaborada por Laboratórios Biosintética Ltda é bioequivalente a Enalapril em Renitec®

(20 mg - Enalapril comprimido) para taxa e velocidade de absorção de enalapril.

4.3 ACHADOS FARMACODINÂMICOS

Embora não tenha sido um dos objetivos primários do estudo em questão, valores pressóricos foram obtidos no decorrer das internações como dado de segurança. O seguinte gráfico ilustra as pressões sistólica e diastólica no decorrer em função do tempo.

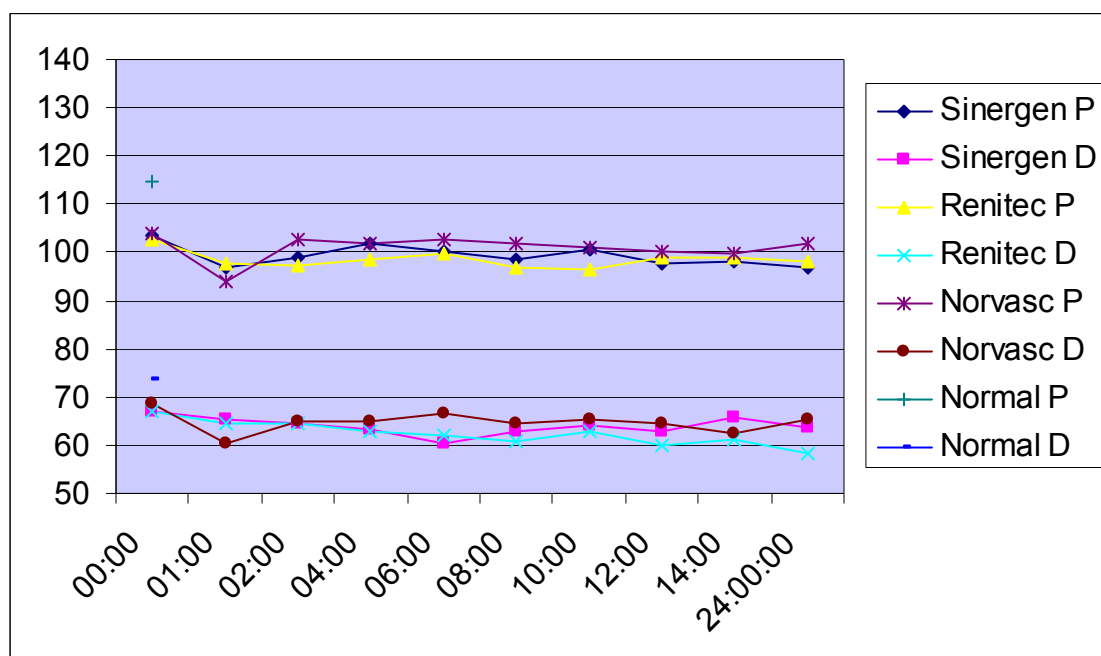


Figura 17: Pressão arterial em função do tempo durante a internação

Não foram registradas variações estatisticamente significativas entre as formulações quando aplicadas em voluntários saudáveis.

5. DISCUSSÃO

A combinação de cromatografia de alta performance (HPLC) e espectrometria de massas é atualmente aceite como o meio mais potente para a determinação de moléculas orgânicas de matrizes biológicas complexas.

As amostras de plasma foram analisadas para avaliar o conteúdo de amlodipina, enalapril e enalaprilato por HPLC/MS-MS devido a que esta técnica fornece as condições necessárias de especificidade e sensibilidade, precisão e exatidão, além de permitir uma excelente velocidade de análise, condição essencial para estudos de bioequivalência.

Padrões internos são essenciais em espectrometria de massas quantitativa para corrigir a possível variabilidade no processo de extração e ionização na fonte. Uma quantidade fixa de padrão interno é adicionada na amostra no processo inicial da extração. O analisador detecta tanto o analito quanto o padrão interno e a resposta é registrada como a relação entre ambos os dois, de forma tal que qualquer variação na extração ou ionização entre as amostras é compensada. É importante que o analito e o padrão interno tenham uma estrutura química e propriedades físicas suficientemente similares para que se comportem de forma análoga e estejam submetidas aos mesmos efeitos matriz.

A escolha de padrão interno deuterado no caso do enalapril e enalaprilato, enalapril D5 e enalaprilato D5 respectivamente, é altamente apropriada para o estudo em questão, particularmente no metabólito. O grande obstáculo potencial na obtenção de análogos isotópicos foi contornado devido à disponibilidade comercial do composto em questão.

O método bioanalítico descrito aqui para quantificação de drogas está em conformidade com o preconizado tanto pela FDA (*Food and Drug Administration*) quanto pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para estudos de bioequivalência.

Baseado nos resultados obtidos, o método descrito para quantificação em plasma humano atinge as necessidades para este tipo de estudo de biodisponibilidade comparativa de uma grande quantidade de amostras (high throuput).

Em pacientes, intercambiar as formulações farmacêuticas de uma mesma droga pode levar à falha terapêutica em alguns casos. Para minimizar o risco e evitar problemas no que diz respeito à substituição nas formulações, estudos farmacocinéticos cuidadosos são requeridos no período de pré-registro e inclusive após ele.

A cada dia mais informações têm sido acrescentadas com relação aos benefícios obtidos no tratamento da hipertensão arterial, com as associações fixas, via de regra em baixas doses de seus componentes. Uma das maiores vantagens das associações das drogas é a maior adesão ao tratamento; há estudos que demonstram que a omissão da dose de um bloqueador de canais de cálcio ou um bloqueador β resultaram em um aumento significativo das pressões sistólica e diastólica, inclusive com hipertensão rebote (86).

Uma revisão de 13 estudos mostrou que as taxas de adesão ao tratamento têm uma média de 76% (87). Sabe-se que a adesão do paciente ao tratamento é influenciada por inúmeros fatores, tais como a relação médico-paciente, conhecimento da doença, ausência de sintomas, desenvolvimento de efeitos adversos com a medicação hipotensora e número de comprimidos a serem ingeridos, dentre outros (88).

A falta de adesão ao tratamento da hipertensão arterial é o maior desafio para todos os que trabalham e investigam esta área. Aumenta os custos e os riscos de eventos cardiovasculares em consequência do controle inadequado da pressão, provocado por esta prática. Diversas teorias que procuravam explicar e orientar formas de abordagem, para se obter o comprometimento dos pacientes

com doenças crônicas com seu próprio cuidado, passaram então a ser investigadas com entusiasmo, sem entretanto, conseguir uma explicação que atendesse à maioria das situações e que justificasse a baixa adesão ao tratamento (89).

Nos cuidados com a hipertensão, o abandono da terapêutica por efeitos indesejados de drogas é avaliado de diversas maneiras. Vários estudos mostram que o grau de adesão varia com as diferentes classes de anti-hipertensivos. Antagonistas de receptor de angiotensina têm as melhores taxas de adesão, seguidos pelos inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores de canais de cálcio, betabloqueadores e diuréticos (91, 92).

Quanto maior o número de comprimidos ou drogas anti-hipertensivas, menor a adesão. Eisen et al. Mostraram, em população de 105 pacientes hipertensos, que a aderência caiu de 83,6% em tomadas únicas para 53% tomadas três vezes ao dia (90).

A associação de amlodipina e enalapril pode ser usada de forma segura no que diz respeito à sua interação entre as duas drogas. Este fato foi confirmado por diversos estudos nacionais e internacionais, sendo o mais importantes no Brasil, o EMBATES.

O estudo EMBATES (Estudo aberto, multicêntrico de avaliação em médio prazo da eficácia anti-hipertensiva e tolerabilidade da combinação fixa de amlodipino e enalapril no tratamento de pacientes hipertensos primários estágios 1 e 2) teve por sua vez diversos sub-estudos em diferentes populações (idosos, diabéticos), de uso a longo prazo, de relação com o metabolismo de lípidos e glicose, comparativo vs clortalidona e atenolol, etc. Este estudo demonstrou a melhora na eficácia e adesão ao tratamento da hipertensão com esta associação.

No nosso estudo foi aplicado um design cruzado com três semanas de período de wash out entre as administrações para a obtenção de amostras em tempos apropriados até 24 hs para enalapril e 144 hs para amlodipina.

A farmacocinética e biodisponibilidade relative da nova apresentação (Sinergen) da associação de amlodipina e enalapril foi comparada com as formulações individuais.

Este tipo de estudo demanda métodos analíticos altamente seletivos e sensíveis que forneçam também alta exatidão e precisão para a determinação de níveis plasmáticos das drogas em questão e dos seus metabólitos.

O método de preparação da amostra descrito neste estudo é de extrações líquido-líquido no caso da amlodipina ou sólido-líquido no caso do enalapril que proporcionaram pureza e reprodutividade das amostras extraídas, o que satisfaz as necessidades em estudos farmacocinéticos dos analitos em plasma humano.

6. CONCLUSÃO

Considerando que as relações de T/R de Cmax e AUC estavam dentro do intervalo proposto por organismos regulatórios (80-125%) para um intervalo de confiança de 90%, se conclui que a formulação Singergen é bioequivalente tanto com respeito à Amlodipina (Norvasc) quanto ao Enalapril (Renitec) para taxa e extensão de concentração.

Após análise estatística da comparação da associação Singergen vs. as medicações individuais, conclui-se que a co-administração de enalapril não influencia a absorção nem a eliminação de amlodipina e vice-versa.

A cromatografia líquida acompanhada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) utilizada para quantificar os fármacos nas dosagens das formulações (5mg para amlodipina e 20 mg para enalapril) em plasma humano foi altamente satisfatória e está de acordo com as especificações exigidas pelo órgão regulador e a validação de acordo com a resolução 899 para estudos de bioequivalência.

Para finalizar, pode-se concluir que a associação de amlodipino e enalapril em formulação galênica única constitui-se em uma excelente opção terapêutica para o paciente com hipertensão arterial essencial em todos os seus estágios, desde as formas leves até aquelas mais severas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jardim, P.C.B.V.S., Ana Luiza Lima, Historical aspects and current tendencies in blood pressure measurement. *Revista Brasileira de Hipertensão*, 2000. **7**(1): p. 6.
2. Messerli, F.H., This day 50 years ago. *N Engl J Med*, 1995. **332**(15): p. 1038-9.
3. Hamdy, R.C., Hypertension: a turning point in the history of medicine...and mankind. *South Med J*, 2001. **94**(11): p. 1045-7.
4. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R.,
- 5- V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial, *Rev Bras Hipertens*, vol 13(4): 256-312, 2006
- 6- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. O sistema vascular, cap 15 em *Farmacologia*, 4a ed, 1999, ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- 4.Kannel, W.B., Historic perspectives on the relative contributions of diastolic and systolic blood pressure elevation to cardiovascular risk profile. *Am Heart J*, 1999. **138**(3 Pt 2): p. 205-10.
- 10- Beresford A P, Macrae P V, Stopher D A, Wood B A 1987. Analysis of amlodipine in human plasma by gas chromatography. *Journal of Chromatography* 420:178-183
- 11- Faulkner J K, McGibney D, Chasseaud L F, Perry J L, Taylor I W 1986. The pharmacokinetics of amlodipine in healthy volunteers after a single intravenous and oral doses and after 14 repeated oral doses given daily. *British J. Clin. Pharmacol.* 22: 21-25

- 12- Reid J L, Meredith P A, Donnelly R, Elliot H L 1988 Pharmacokinetics of calcium antagonists Journal of Cardiovascular Pharmacology 12 (suppl 7): S22-S26.
- 13- Williams D M, Cubeddu L X 1988 Amlodipine pharmacokinetics in healthy volunteers, Journal of Clinical Pharmacology 28: 990-994.
- 14- Abernethy D R, Gutkowska J, Winterbottom I M 1990 Effects of amlodipine a long acting dihydropyridine calcium antagonist in ageing hypertension: pharmacodynamics in relation to disposition. Clinical Pharmacology and Therapeutics 48: 76-86.
- 15- Pfizer Center Research. Data on file.
- 16- Laher M S, Kelly J G, Doyle G D, Carmody M, Donohoe J F, Greb H, Volz M 1988 Pharmacokinetics of amlodipine in renal impairment. Journal of Cardiovascular Pharmacology 12 (suppl 7): S60-S63.
- 17- Elliott H L, Meredith P A, Reid J L, Faulkner J K 1988 A comparison of the disposition of single oral doses of amlodipine in young and elderly subjects. Journal of Cardiovascular Pharmacology 12 (suppl 7): S64-S66.
- 18- Taylor S H, Lee P, Jackson N, Cocco G 1989. A four week double-blind placebo-controlled, parallel dose- response study of amlodipine in young and elderly subjects.
- 19- Thedani U and The Amlodipine Study Group 1989. Amlodipine: a once daily calcium antagonist in the treatment of angina-pectoris- a parallel dose- response placebo controlled study. American Heart Journal 118 (5, Pt 2): 1133-1135.

- 20-Stopher D A, Beresford A P, Macrae P E, HUnfrey M J 1988. The Metabolism and pharmacokinetics of amlodipine in humans and animals. *Journal of cardiovascular Pharmacology* 12 (suppl 7) S55-S59
- 21- Webster J, Robb O J, Jeffers T A, Scott A K, Petrie J C, Towler H M 1987 Once daily amlodipine in the treatment of mild to moderate hypertension. *British J. Clin. Pharmacol.*24: 713-719.
- 22- Julius S 1988. Amlodipine in hypertension: an overview of the clinical dossier. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 12 (suppl 7): S27-S33.
- 14- Heber M E, Brigden G, Al-Khawaja I, Raftery E B. 1989 24h blood pressure control with the once daily calcium antagonist, amlodipine. *British J. Clin. Pharmacol.* 27: 359-365.
- 23- Glasser S P, Chrysant S G, Graves J, Rofman B, Koehn D K 1989 Safety and efficacy of amlodipine added to hydrochlorothiazide therapy in essential hypertension. *American Journal of Hypertension* 2:154-157.
- 16- Maclean D, Mitchell E T, Wilcox R G, Walker P, Tyler H M. 1988. Amlodipine and captopril in moderate -severe essential hypertension. *J. Human Hypertension* 2: 127-132.
- 24- Burges R A, Gardiner D G, Gwilt M et al 1987 Calcium channel blocking properties of amlodipine in vascular smooth muscle and cardiac muscle in vitro: evidence for voltage modulation of vascular dihydropyridine receptors. *J. Cardiovas. Pharmacology* 9: 110-119.
- 25- Mason R P, Campbell S F, Wang S D, Herbette L G 1989. Comparison of location and binding for the positively charged 1,4 dihydropyridine calcium channel

antagonist amlodipine with uncharged drugs of this class in cardiac membranes. Molecular Pharmacology 36: 634- 640.

26- Kinnard D R, Harris M, Hossak K F 1988 Endurance testing for evaluation of antianginal therapy with amlodipine, a channel calcium blocking agent. Journal of American College of cardiology 12: 791-796.

27- Glasser S P, West T W 1988 Clinical safety and efficacy of once-a- day amlodipine for chronic stable angina pectoris. American Journal of Cardiology 62: 518-522..

28- Taylor S H, Lee P, Jackson N, Cocco G 1989. A four week double-blind, placebo-controlled, parallel dose response study of amlodipine in patients with stable exertional angina pectoris. American Heart Journal 118 (5Pt 2) 1133-1135.

29- Pfizer Central Research. Data on file.

30- Chahine R A, Feldman R L, Giles T D, Raizner A E, Weiss R J, Nicod P 1989 Efficacy and safety of amlodipine in vasospastic angina an interim report of a multicenter, placebo-controlled trial. American Heart Journal 118 (5 Pt 2) 1128-1130.

31- Osterloh I 1989 The safety of amlodipine. Am. Heart Journal 118 (5Pt2): 1114-1120

32. Merck Sharp & Dohme. Vasotec (enalapril maleate) prescribing information. West Point, PA; 1990 Dec.

33. Merck Sharp & Dohme. Vasotec (enalapril maleate) formulary information monograph. West Point, PA; 1986.

34. Todd PA, Heel RC. Enalapril: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs*. 1986; 31:198-248. (IDIS 212831)
35. Cleary JD, Taylor JW. Enalapril: a new angiotensin converting enzyme inhibitor. *Drug Intell Clin Pharm*. 1986; 20:177-86. (IDIS 211909)
36. Vlasses PH, Larijani GE, Conner DP et al. Enalapril, a nonsulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Clin Pharm*. 1985; 4:27-40. (IDIS 19)
37. Dal Pino AE. (Merck Sharp & Dohme, West Point, PA): Personal communication; 1986 Dec.245. Merck Sharp & Dohme. Vasotec (enalapril maleate) prescribing infnion. West Point, PA; 1989 Aug.
38. Chen DS, Brunner HR, Waeber B. In-vitro response of plasma angiotensin converting enzyme to precursors and active forms of converting enzyme inhibitors. *Curr Ther Res*. 1984; 35:253-62.
39. Gross DM, Sweet CS, Ulm EH et al. Effect of N-[[[(S)-1-Carboxy-3-phenylpropyl]]-L-Ala-L-Pro and its ethyl ester (MK-421) on angiotensin converting enzyme in vitro and angiotensin I pressor responses in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981; 216:552-7.
40. Patchett AA, Harris E, Tristram EW et al. A new class of aensin-converting enzyme inhibitors. *Nature*. 1980; 288:280-3.
41. Attwood MR, Francis RJ, Hassall CH et al. New potent inhibitors of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett*. 1984; 165:201-6.

42. Dzau VJ. Significance of the vascular renin-angiotensin pathway. Hypertension. 1986; 8:553-9. Editorial.
43. Unger T, Ganten D, Lang RE et al. Persistent tissue converting enzyme inhibition following chronic treatment with Hoe498 and MK421 in spontaneously hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol. 1985; 7:36-41.
44. Given BD, Taylor T, Hollenberg NK et al. Duration of action and s-term hormonal responses to enalapril (MK 421) in normal subjects. J Cardiovasc Pharmacol. 1984; 6:436-41.
45. Morioka S, Simon G, Cohn JN. Cardiac and hormonal effects of enalapril in hypertension. Clin Pharmacol Ther. 1983; 34:583-9. (IDIS 17)
46. Ibsen H, Egan B, Osterziel K et al. Reflex-hemodynamic adjustments and baroreflex sensitivity during converting enzyme inhibition with MK-421 in humans. Hypertension. 1983; 5:184-91.
47. Ibsen H, Egan B, Julius S. Baroreflex sensitivity during converting enzyme inhibition with enalapril (MK-421) in normal man. J Hypertens. 1983; 1(Suppl 2):222-4.
48. Nakashima N, Angus JA, Johnston CI. Comparison of angiotensin converting enzyme inhibitors captopril and MK 421-diacid in guinea pig atria. Eur J Pharmacol. 1982; 81:487-92.
49. Johnston CI, Jackson BJ, Larmour I et al. Plasma enalapril levels and hormonal effects after short- and long-term administration in essential hypertension. Br J Clin Pharmacol. 1984; 18:233-9S. (IDIS 198611)

50. Shoback DM, Williams GH, Hollenberg NK et al. Endogenous angiotensin II as a determinant of sodium-modulated changes in tissue responsiveness to angiotensin II in normal man. *J Clin Endocrin Metab.* 1983; 57:764-70.
51. Reynolds CH. Kinetics of inhibition of angiotensin converting enzyme byaptopril and by enalapril diacid. *Biochem Pharmacol.* 1984; 33:1273-6.
52. Velletri P, Bean BL. The effects of captopril on rat aortic angiotensin-converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1982; 4:315-25.
53. Biollaz J, Brunner HR, Gavras I et al. Antihypertensive therapy with MK 421: angiotensin II-renin relationships to evaluate efficacy of converting enzyme blockade. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1982; 4:966-72.
54. Hodsman GP, Brown JJ, Cumming AMM et al. Enalapril in the treatment of hypertension with renal artery stenosis. *Br Med J.* 1983; 287:1413-7. (IDIS 178988)
55. Shoback DM, Williams GH, Swartz SL et al. Time course and effect of so intake on vascular and hormonal responses to enalapril (MK 421) in normal subjects. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1983; 5:1010-18.
56. Oparil S, Horton R, Wilkins LH et al. Antihypertensive effect of enalapril (MK-421) in low renin essential hypertension: role of vasodilator prlandins. *Clin Res.* 1983; 31:538A. Abstract.
57. Golub M, Eggena P, Barrett J et al. Cyclooxygenase inhibitors do not influence the blood pressure response to the converting enzyme inhibitor enalapril. Paper presented at 10th scientific meeting of the International Society of Hypertension. Interlaken, Switzerland: 1984 June 17-21. Abstract No. 398.2

58. Levine TB, Olivari MT, Garberg V et al. Hemodynamic and clinical response to enalapril, a long-acting converting-enzyme inhibitor, in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1984; 69:548-53.
18. Natoff IL, Nixon JS, Francis RJ et al. Biological properties of the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril. *J Cardiovasc Pharmacol*. 198;69-80.
59. Bauer JH, Gaddy P. Effects of enalapril alone, and in combination with hydrochlorothiazide, on renin-angiotensin-aldosterone, renal function, salt and water excretion, and body fluid composition. *Am J Kidney Dis*. 5; 6:222-32.
60. Freier PA, Wollam GL, Hall WD et al. Blood pressure, plasma volume, and catecholamine levels during enalapril therapy in blacks with hypertension. *Clin Pharmacol Ther*. 1984; 36:731-7. (IDIS 194060)
61. Hodsman GP, Zabudowski JR, Zoccali C et al. Enalapril (MK421) and itsine analogue (MK521): a comparison of acute and chronic effects on blood pressure, renin-angiotensin system and sodium excretion in normal man. *Br J Clin Pharmacol*. 1984; 17:233-41. (IDIS 184077)
62. Giudicelli JF, Berdeaux A, Edouard A et al. The effect of enalapril on baroreceptor mediated reflex function in normotensive subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 1985; 20:211-8.
63. Fouad FM, Tarazi RC, Bravo EL et al. Hemodynamic and antihypertensive effects of the new oral angiotensin-converting-enzyme inhibitor MK-421 (enalapril). *Hypertension*. 1984; 6:167-74.
64. Dunn FG, Oigman W, Ventura HO et al. Enalapril improves systemic and renal hemodynamics and allows regression of left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Cardiol*. 1984; 53:105-8. (IDIS 179629)

65. Cody RJ. Clinical and hemodynamic experience with enalapril in congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1985; 55:36-40. (IDIS 195165)
66. Kjekshus IK, Soyland E, Dickstein K et al. Acute and long-term response to enalapril in congestive failure. *Br J Clin Pharmacol.* 1984; 18:169-74S.
67. Hodsman GP, Brown JJ, Cumming AMM et al. Enalapril in treatment of hypertension with renal artery stenosis: changes in blood pressure, renin, angiotensin I and II, renal function, and body composition. *Am J Med.* 1984; 77:52-60.
68. Packer M, Lee WH, Kessler PD. Preservation of glomerular filtration rate in human heart failure by activation of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 1986; 74:766-74.
69. Till AE, Gomez HJ, Hichens M et al. Pharmacokinetics of repeated oral doses of enalapril maleate (MK-421) in normal volunteers. *Biopharm Drug Dispos.* 1984; 5:273-80.
70. Rocci ML, Shaw EW, Vlasses PH et al. Bioactivation of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril in cirrhosis. *Clin Res.* 1986; 34:406A. Abstract.
71. Semplicini A, Rossi GP, Bongiovi S et al. Time course of changes in blood pressure, aldosterone and body fluids during enalapril treatment: a double-blind randomized study vs hydrochlorothiazide plus propranolol in essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1986; 13:17-24.
72. Packer M, Lee WH, Yushak M et al. Comparison of captopril and enalapril in patients with severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1986; 315:847-53.

73. McGrath BP, Arnold L, Matthews PG et al. Controlled trial of enalapril in congestive cardiac failure. *Br Heart J*. 1985; 54:405-14.
74. Kelly JG, Doyle G, Donohue DJ et al. Pharmacokinetics of enalapril in normal subjects and patients with renal impairment. *Br J Clin Pharmacol*. 1986; 21:63-9. (IDIS 211155)
75. Lowenthal DT, Irvin JD, Merrill D et al. The effect of renal function on enalapril kinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 1985; 38:661-6. (IDIS 208986)
76. Schwartz JB, Taylor A, Abernethy D et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of enalapril in patients with congestive heart failure and patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1985; 7:767-76.
77. Burnier M, Biollaz J, Brunner HR et al. Comparison in normal volunteers of three converting enzyme inhibitors: RHC 3659, MK 421 and captopril. *Am J Cardiol*. 1982; 49:1550-1. (IDIS 149124)
78. Guthrie GP Jr, Hammond J, Kotchen TA. Abrupt cessation of enalapril (MK-421) in essential hypertension. *Clin Res*. 1982; 30:733A. Abstract.
79. Thind GS, Johnson A, Bhatnagar D et al. A parallel study of enalapril and captopril and 1 year of experience with enalapril treatment in moderate-to-severe essential hypertension. *Am Heart J*. 1985; 109:852-8. (IDIS 197998)
80. Marre M, Leblanc H, Passa P. Effects of converting enzyme inhibition with enalapril administered to hypertensive insulin-dependent diabetics (IDD). *J Hypertens*. 1985; 3:552. Abstract No. 45.

81. McMurray J, Fraser DM. Captopril, enalapril, and blood glucose. *Lancet*. 1986; 1:1035. Letter. (IDIS 215116)
82. Taguma Y, Kitamoto Y, Futaki G et al. Effect of captopril on heavy prnuria in azotemic diabetics. *N Engl J Med*. 1985; 313:1617-20.
83. Murphy BF, Whitworth JA, Kincaid-Smith P. Renal insufficiency with coations of angiotensin converting enzyme inhibitors and diuretics. *Br Med J*. 1984; 299:844-5.
84. Letter.The Consensus Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the cooperative North Scandinavian enalapril survival study (consensus). *N Engl J Med*. 1987; 316:1429-34.
85. Capoten prescribing information. In: Huff BB, ed. *Physicians' desk rnce*. 40th ed. Oradell, NJ: Medical Economics Co, Inc; 1986:1736-8.
86. Johnson BF, Whelton A. A study design for comparing the effects of missing daily doses of antihypertensive drugs. *Am J Therapeutics* 1994;1:260–7.
- 87 Cramer JA. Consequences of intermittent treatment for hypertension: the case for medication compliance and persistence. *Am J Managed Care* 1999;4:1563–8.
88. Basile JN. Combination agents as a means of improving adherence and other aspects of the sixth Joint National Committee Report. *South Med J* 1000;93(5):534-6
89. Paulo César B. Veiga Jardim, Thiago de Souza Veiga Jardim. Modelos de estudos de adesão ao tratamento anti-hipertensivo. *Rev Bras Hipertens* vol.13(1): 26-29, 2006.

90. Eisen SA, Woodward RS, Miller D, Spitznagel E, Windham CA. The effect of medication compliance on the control of hypertension. *J Gen Intern Med* 1987;2(5):298-305.
91. Alderman MH, Budner N, Cohen H, Lamport B, Ooi WL. Prevalence of drug resistant hypertension. *Hypertension* 1988;11 (suppl II):II71-75.
92. Monane M, Bohn RL, Gurwitz JH, Glynn RJ, Levin R, Avorn J. The effects of initial drug choice and co-morbidity on antihypertensive therapy compliance. Results from a population-based study in the elderly. *Am J Hypertens* 1997;10:697-704.

ANEXOS



ANEXO I

Lista de randomização

Estudo de Biodisponibilidade Comparativa de uma Formulação de Amlodipina + Maleato de Enalapril (5 mg/20 mg) em cápsula *versus* uma Formulação de Amlodipina (5 mg, produto referência -Norvasc®) e *versus* uma Formulação de Maleato de Enalapril (20 mg Produto referência - Renitec®) em voluntários sadios de ambos os sexos

Vol.	Sexo	Seq.	Período I	Período II	Período III
1	M	3	Sinergen [□]	NORVASC [□]	RENITEC [□]
2	M	1	NORVASC [□]	Sinergen [□]	RENITEC [□]
3	M	4	Sinergen [□]	RENITEC [□]	NORVASC [□]
4	M	6	RENITEC [□]	Sinergen [□]	NORVASC [□]
5	M	1	NORVASC [□]	Sinergen [□]	RENITEC [□]
6	M	6	RENITEC [□]	Sinergen [□]	NORVASC [□]
7	M	2	NORVASC [□]	RENITEC [□]	Sinergen [□]
8	M	2	NORVASC [□]	RENITEC [□]	Sinergen [□]
9	M	3	Sinergen [□]	NORVASC [□]	RENITEC [□]
10	M	5	RENITEC [□]	NORVASC [□]	Sinergen [□]
11	M	6	RENITEC [□]	Sinergen [□]	NORVASC [□]
12	M	4	Sinergen [□]	RENITEC [□]	NORVASC [□]
13	M	3	Sinergen [□]	NORVASC [□]	RENITEC [□]
14	M	1	NORVASC [□]	Sinergen [□]	RENITEC [□]
15	M	2	NORVASC [□]	RENITEC [□]	Sinergen [□]
16	M	5	RENITEC [□]	NORVASC [□]	Sinergen [□]
17	M	5	RENITEC [□]	NORVASC [□]	Sinergen [□]
18	M	4	Sinergen [□]	RENITEC [□]	NORVASC [□]
19	F	1	NORVASC [□]	Sinergen [□]	RENITEC [□]
20	F	1	NORVASC [□]	Sinergen [□]	RENITEC [□]
21	F	5	RENITEC [□]	NORVASC [□]	Sinergen [□]
22	F	3	Sinergen [□]	NORVASC [□]	RENITEC [□]
23	F	4	Sinergen [□]	RENITEC [□]	NORVASC [□]
24	F	6	RENITEC [□]	Sinergen [□]	NORVASC [□]
25	F	2	NORVASC [□]	RENITEC [□]	Sinergen [□]
26	F	4	Sinergen [□]	RENITEC [□]	NORVASC [□]
27	F	3	Sinergen [□]	NORVASC [□]	RENITEC [□]
28	F	5	RENITEC [□]	NORVASC [□]	Sinergen [□]
29	F	6	RENITEC [□]	Sinergen [□]	NORVASC [□]
30	F	2	NORVASC [□]	RENITEC [□]	Sinergen [□]

Vol.	Sexo	Seq.	Período I	Período II	Período III
31	F	6	RENITEC [□]	Sinergen [□]	NORVASC [□]
32	F	2	NORVASC [□]	RENITEC [□]	Sinergen [□]
33	F	4	Sinergen [□]	RENITEC [□]	NORVASC [□]
34	F	3	Sinergen [□]	NORVASC [□]	RENITEC [□]
35	F	5	RENITEC [□]	NORVASC [□]	Sinergen [□]
36	F	1	NORVASC [□]	Sinergen [□]	RENITEC [□]

ANEXO II

Valores quantificados obtidos

	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6
Time (h)	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test
00:00	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	BLOQ
01:00	0.4	N/A	0.72	0.496	N/A	0.355	0.369	N/A	0.387	0.647	N/A	0.497	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	0.583
02:00	0.784	N/A	1.39	1.04	N/A	1.01	1.22	N/A	1.38	1.41	N/A	1.48	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	0.994
04:00	1.65	N/A	1.75	1.99	N/A	2.13	1.53	N/A	2.29	2.44	N/A	2.73	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	1.99
06:00	1.2	N/A	1.55	2.18	N/A	1.47	1.96	N/A	2.22	2.49	N/A	2.48	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	1.94
08:00	1.44	N/A	1.26	1.66	N/A	2.04	1.63	N/A	2.28	2.13	N/A	2.16	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	1.65
10:00	1.44	N/A	1.16	1.55	N/A	2.67	1.73	N/A	2.46	2.27	N/A	2.05	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	1.48
12:00	0.939	N/A	1.06	1.64	N/A	2.25	1.64	N/A	1.82	2.45	N/A	1.81	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	1.39
14:00	0.899	N/A	0.903	1.34	N/A	1.7	1.43	N/A	1.81	1.96	N/A	1.78	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	1.34
24:00:00	0.602	N/A	0.727	N/A	N/A	1.1	1.25	N/A	1.11	1.69	N/A	1.17	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	1.07
48:00:00	0.334	N/A	0.591	0.796	N/A	0.854	0.874	N/A	1.07	1.49	N/A	0.971	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	0.799
96:00:00	0.172	N/A	0.245	0.334	N/A	0.357	0.355	N/A	0.602	0.707	N/A	0.599	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	N/A
120:00:00	BLOQ	N/A	N/A	0.379	N/A	N/A	0.221	N/A	N/A	N/A	N/A	0.42	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	0.145
144:00:00	BLOQ	N/A	0.106	0.129	N/A	0.142	N/A	N/A	0.221	0.419	N/A	0.301	Drop-out	Drop-out	Drop-out	Drop-out	N/A	0.132

7	7	7	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12
Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test
BLOQ	N/A	Drop-out	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ
0.397	N/A	Drop-out	0.103	N/A	0.442	0.419	N/A	0.121	0.175	N/A	0.184	0.445	N/A	0.868	0.314	N/A	0.248
1.32	N/A	Drop-out	0.612	N/A	1.12	0.872	N/A	0.722	0.387	N/A	0.386	1.21	N/A	1.67	0.823	N/A	0.469
2.41	N/A	Drop-out	1.6	N/A	2.08	2.42	N/A	2.04	1.73	N/A	1.6	2.62	N/A	3.28	1.62	N/A	1.36
2.16	N/A	Drop-out	1.65	N/A	2.25	2.34	N/A	2.23	1.81	N/A	1.87	2.43	N/A	2.44	2.34	N/A	1.91
1.98	N/A	Drop-out	1.73	N/A	2.3	2.52	N/A	2.38	1.86	N/A	1.8	2.96	N/A	2.44	2.6	N/A	1.68
1.6	N/A	Drop-out	1.67	N/A	1.79	2.42	N/A	2.62	1.63	N/A	1.62	1.78	N/A	2.11	2.06	N/A	1.59
1.39	N/A	Drop-out	1.48	N/A	2.13	2	N/A	2.5	1.56	N/A	1.4	1.77	N/A	2.31	2.11	N/A	1.55
1.22	N/A	Drop-out	1.37	N/A	1.66	1.96	N/A	2.73	1.25	N/A	1.2	1.44	N/A	1.76	1.82	N/A	1.42
0.96	N/A	Drop-out	1.33	N/A	1.43	1.63	N/A	1.49	0.892	N/A	1.02	0.988	N/A	1.84	1.34	N/A	0.921
0.572	N/A	Drop-out	0.921	N/A	0.985	1.35	N/A	1.51	0.686	N/A	0.761	0.816	N/A	0.807	N/A	N/A	0.828
0.353	N/A	Drop-out	0.452	N/A	0.615	0.916	N/A	0.843	0.298	N/A	0.363	0.258	N/A	0.294	0.399	N/A	0.22
0.254	N/A	Drop-out	0.33	N/A	0.386	0.898	N/A	0.663	0.159	N/A	0.23	0.108	N/A	0.141	0.201	N/A	BLOQ
0.173	N/A	Drop-out	0.213	N/A	0.3	0.488	N/A	0.558	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.114	N/A	BLOQ

13 Reference 1	13 Reference 2	13 Test	14 Reference 1	14 Reference 2	14 Test	15 Reference 1	15 Reference 2	15 Test	16 Reference 1	16 Reference 2	16 Test	17 Reference 1	17 Reference 2	17 Test	18 Reference 1	18 Reference 2	18 Test
BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ
0.318	N/A	0.629	0.21	N/A	0.324	0.423	N/A	0.352	0.548	N/A	0.105	0.395	N/A	0.372	0.541	N/A	0.552
0.623	N/A	0.822	0.777	N/A	0.713	1.33	N/A	1.1	1.04	N/A	0.643	1.33	N/A	1.35	1.17	N/A	0.653
2.06	N/A	2.05	1.55	N/A	1.97	2.81	N/A	3.79	2.4	N/A	2.93	1.79	N/A	2.73	1.98	N/A	1.74
2.55	N/A	2.37	2.27	N/A	2.58	2.27	N/A	3.35	2.41	N/A	2.9	1.5	N/A	2.82	2.41	N/A	1.94
2.53	N/A	2.09	2.09	N/A	2.2	1.92	N/A	2.34	2.47	N/A	3.48	1.58	N/A	1.89	2.12	N/A	2.02
1.9	N/A	2.17	1.94	N/A	2.07	1.64	N/A	1.87	2.25	N/A	2.78	1.52	N/A	1.55	1.95	N/A	1.88
1.78	N/A	2.03	1.8	N/A	1.72	1.48	N/A	1.94	2.08	N/A	2.38	1.18	N/A	1.49	1.7	N/A	1.85
1.66	N/A	1.7	1.67	N/A	1.42	1.45	N/A	1.61	1.8	N/A	2.16	1.3	N/A	1.3	1.49	N/A	2.13
1.08	N/A	1.68	1.92	N/A	1.18	1.62	N/A	1.56	1.3	N/A	1.74	1.1	N/A	1.07	1.23	N/A	0.985
0.787	N/A	1.14	0.81	N/A	0.712	0.719	N/A	0.901	1.48	N/A	1.22	0.642	N/A	0.546	1.14	N/A	0.626
0.569	N/A	0.601	0.498	N/A	0.49	0.343	N/A	0.398	0.481	N/A	0.531	0.22	N/A	0.277	0.348	N/A	0.274
0.401	N/A	0.453	0.415	N/A	N/A	0.157	N/A	N/A	0.369	N/A	0.327	0.167	N/A	0.132	0.269	N/A	0.158
0.39	N/A	0.342	N/A	N/A	N/A	0.115	N/A	N/A	0.246	N/A	0.203	BLOQ	N/A	0.136	0.143	N/A	0.103

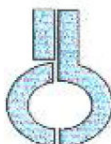
19 Reference 1	19 Reference 2	19 Test	20 Reference 1	20 Reference 2	20 Test	21 Reference 1	21 Reference 2	21 Test	22 Reference 1	22 Reference 2	22 Test	23 Reference 1	23 Reference 2	23 Test	24 Reference 1	24 Reference 2	24 Test
BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	Drop-out	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ
0.788	N/A	0.613	1.13	N/A	0.583	0.743	N/A	0.976	0.535	N/A	0.784	Drop-out	N/A	0.747	0.204	N/A	0.442
2.06	N/A	1.26	1.55	N/A	0.869	1.35	N/A	1.68	1.55	N/A	1.78	Drop-out	N/A	1.21	0.975	N/A	0.964
3.41	N/A	2.21	2.8	N/A	2.28	4.13	N/A	5.19	3.35	N/A	3.03	Drop-out	N/A	1.83	2.68	N/A	2.1
3.16	N/A	2.41	2.6	N/A	3.13	3.98	N/A	6.1	2.56	N/A	2.54	Drop-out	N/A	1.95	2.83	N/A	2.22
2.34	N/A	2.25	2.18	N/A	2.6	3.71	N/A	4.85	2.45	N/A	2.54	Drop-out	N/A	1.59	2.43	N/A	2.04
2.22	N/A	1.9	1.96	N/A	2.36	3.04	N/A	5	1.88	N/A	2.53	Drop-out	N/A	1.84	2.19	N/A	2.9
2.2	N/A	1.68	1.84	N/A	1.94	2.87	N/A	4.56	1.93	N/A	2.23	Drop-out	N/A	1.19	2.35	N/A	1.97
1.97	N/A	1.43	1.74	N/A	1.45	3.32	N/A	4.22	1.36	N/A	2.78	Drop-out	N/A	1.33	1.53	N/A	1.41
1.63	N/A	1.11	1.61	N/A	1.18	2.19	N/A	2.79	1.01	N/A	1.31	Drop-out	N/A	1.04	1.32	N/A	0.981
1.11	N/A	0.789	0.93	N/A	0.727	1.62	N/A	2.11	0.618	N/A	0.939	Drop-out	N/A	0.672	0.792	N/A	0.628
0.396	N/A	0.326	0.491	N/A	0.358	0.915	N/A	0.866	0.219	N/A	0.296	Drop-out	N/A	0.239	0.368	N/A	0.291
0.218	N/A	0.195	0.25	N/A	0.244	0.625	N/A	0.68	0.131	N/A	0.204	Drop-out	N/A	N/A	0.317	N/A	N/A
0.141	N/A	0.137	0.21	N/A	0.22	N/A	N/A	0.505	BLOQ	N/A	0.11	Drop-out	N/A	BLOQ	0.146	N/A	N/A

5	25	25	26	26	26	27	27	27	28	28	28	29	29	29	30	30	30
Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test
BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ
0.138	N/A	0.306	0.561	N/A	0.223	0.256	N/A	0.508	0.767	N/A	0.593	0.367	N/A	BLOQ	0.107	N/A	0.27
0.41	N/A	0.79	0.985	N/A	1.02	0.69	N/A	0.815	1.58	N/A	1.67	0.9	N/A	0.129	0.535	N/A	0.749
0.898	N/A	1.52	2.16	N/A	2.26	1.86	N/A	1.63	2.88	N/A	2.64	2.28	N/A	0.792	1.28	N/A	2.32
1.22	N/A	1.77	2.32	N/A	2.48	2.27	N/A	1.98	2.27	N/A	4.29	2.91	N/A	1.35	1.58	N/A	1.78
1.27	N/A	1.78	1.89	N/A	1.84	3.45	N/A	1.7	1.82	N/A	3.14	2.22	N/A	1.67	1.15	N/A	1.62
1.41	N/A	1.66	1.57	N/A	1.88	2.73	N/A	2.57	1.57	N/A	2.48	2.02	N/A	1.56	1.17	N/A	1.21
1.65	N/A	1.58	1.35	N/A	1.57	2.28	N/A	2.44	1.33	N/A	1.91	1.9	N/A	1.53	1.34	N/A	1.01
1.19	N/A	1.25	1.3	N/A	1.23	2.19	N/A	1.66	1.04	N/A	1.68	1.48	N/A	1.86	1.11	N/A	0.986
0.941	N/A	1.08	0.632	N/A	0.796	1.6	N/A	1.51	1.3	N/A	1.25	1.31	N/A	1.28	0.677	N/A	0.797
0.55	N/A	0.602	N/A	N/A	N/A	1.16	N/A	1.31	0.704	N/A	0.773	0.594	N/A	0.718	0.459	N/A	0.469
0.188	N/A	0.34	0.217	N/A	0.184	0.658	N/A	0.611	0.195	N/A	0.237	0.289	N/A	0.271	0.176	N/A	0.221
BLOQ	N/A	0.175	N/A	N/A	N/A	0.511	N/A	0.343	BLOQ	N/A	0.122	0.158	N/A	0.124	BLOQ	N/A	0.112
BLOQ	N/A	BLOQ	N/A	N/A	0.108	0.258	N/A	0.247	BLOQ	N/A	0.104	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	N/A

31	31	31	32	32	32	33	33	33	34	34	34	35	35	35	36	36	36
Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test	Reference 1	Reference 2	Test
BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	BLOQ	N/A	BLOQ	Drop-out	N/A	BLOQ	Drop-out	Drop-out	Drop-out	BLOQ	N/A	BLOQ
0.239	N/A	0.548	0.857	N/A	0.877	0.402	N/A	0.25	Drop-out	N/A	0.35	Drop-out	Drop-out	Drop-out	0.305	N/A	0.472
0.949	N/A	1.35	1.51	N/A	1.82	0.704	N/A	0.505	Drop-out	N/A	1.75	Drop-out	Drop-out	Drop-out	0.91	N/A	1.15
1.68	N/A	2.17	N/A	N/A	2.77	2.11	N/A	2.45	Drop-out	N/A	1.56	Drop-out	Drop-out	Drop-out	2.19	N/A	1.71
2.29	N/A	2.04	2.17	N/A	2.08	2.88	N/A	2.62	Drop-out	N/A	1.51	Drop-out	Drop-out	Drop-out	1.93	N/A	1.9
2.47	N/A	1.75	2.01	N/A	2.48	2.3	N/A	2.1	Drop-out	N/A	2.06	Drop-out	Drop-out	Drop-out	2.25	N/A	1.92
1.76	N/A	1.58	1.93	N/A	1.81	2.14	N/A	2.12	Drop-out	N/A	1.93	Drop-out	Drop-out	Drop-out	1.93	N/A	1.95
1.64	N/A	1.57	1.95	N/A	1.59	2.09	N/A	2.33	Drop-out	N/A	1.88	Drop-out	Drop-out	Drop-out	1.68	N/A	1.91
1.31	N/A	1.22	1.7	N/A	1.24	2.13	N/A	1.77	Drop-out	N/A	1.63	Drop-out	Drop-out	Drop-out	1.48	N/A	1.71
0.788	N/A	0.753	1.35	N/A	1.26	1.59	N/A	1.74	Drop-out	N/A	1.09	Drop-out	Drop-out	Drop-out	1.33	N/A	1.17
0.514	N/A	0.473	1.43	N/A	0.844	0.833	N/A	0.896	Drop-out	N/A	0.901	Drop-out	Drop-out	Drop-out	0.915	N/A	0.977
0.13	N/A	0.159	0.6	N/A	0.488	0.336	N/A	0.37	Drop-out	N/A	0.36	Drop-out	Drop-out	Drop-out	0.493	N/A	0.483
BLOQ	N/A	BLOQ	0.413	N/A	0.312	0.218	N/A	N/A	Drop-out	N/A	0.208	Drop-out	Drop-out	Drop-out	0.407	N/A	0.349
BLOQ	N/A	BLOQ	0.306	N/A	0.272	N/A	N/A	0.161	Drop-out	N/A	0.136	Drop-out	Drop-out	Drop-out	0.349	N/A	0.314

ANEXO III

PARECER DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 06506-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3081.7733 - telefax : (55) (11) 3081.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 05 de fevereiro de 2004

PARECER 543/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua quadragésima segunda, realizada no dia 04 de fevereiro-04, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Estudo de Biodisponibilidade Comparativa de uma Formulação de Anlodipina+Maleato de Enalapril(10mg/20mg) em cápsula dos Laboratórios Biosintética Ltda.(Sinergen®) versus uma Formulação de Anlodipina em comprimidos de 10mg do Produto de Referência do Laboratório Pfizer Ltda.(Norvasc®) e versus uma Formulação de Maleato de Enalapril em comprimidos de 20mg do Produto de Referência da Merck Sharp Dohme(Renitec®) em Voluntários Sadios de Ambos os Sexos"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. GILBERTO DE NUCCI
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP1

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP
Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998